



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA
INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO"



**ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE
LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+**

AUTOR: Jesús. G. Luzardo. F.

Ci: 18.979.292.

TUTOR: Dra. Eddy. V. Mora.

Ci: 8.726.223

Valencia, Junio 2021



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA
INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO"**



ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+

Trabajo de Investigación. Requisito parcial para obtener el Título de
Especialista en Cirugía Oncológica

Tutora: Dra. Eddy Verónica Mora

Autor: Jesús. G. Luzardo. F.

CI: 18979292.

Valencia, Junio 2021



ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo Especial de Grado titulado:

ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+

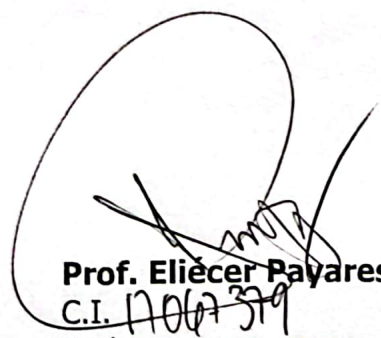
Presentado para optar al grado de **Especialista en Cirugía Oncológica** por el (la) aspirante:

LUZARDO F., JESUS GABRIEL M.
C.I. V – 18979292

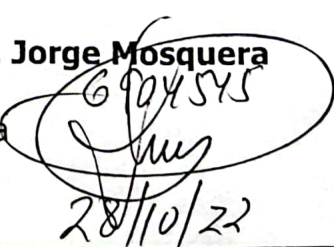
Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Eddy Verónica Mora C.I. 8726223, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Acta que se expide en valencia, en fecha: **28/10/2022**


Prof. Ivan Tortolero
(Pdte)
C.I. 7067378
Fecha 28-10-22.


Prof. Eliécer Payares
C.I. 17067379
Fecha 28-10-2022

TG:61-22


Prof. Jorge Mosquera
C.I. 6904545
Fecha 28/10/22



Bárbula – Módulo N° 13 – dirección de Asuntos Estudiantiles, correo: dae.postgrado.fcs@uc.edu.ve – daefcspost@gmail.com



TG-CS: 61-22

ACTA DE CONSTITUCIÓN DE JURADO Y DE APROBACIÓN DEL TRABAJO

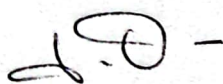
Quienes suscriben esta Acta, Jurados del Trabajo Especial de Grado titulado:

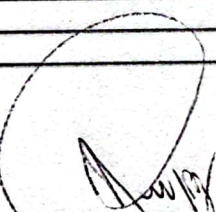
"ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+" Presentado por el (la) ciudadano (a): **LUZARDO F., JESUS GABRIEL M.** titular de la cédula de identidad N° **V-18979292**, Nos damos como constituidos durante el día de hoy: 07.6.2022 y convenimos en citar al alumno para la discusión de su Trabajo el día: 28.6.2022.

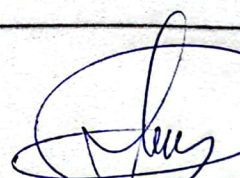
RESOLUCIÓN

Aprobado: _____ Fecha: _____, *Reprobado: _____ Fecha: _____.

Observación: _____


Presidente del Jurado
Nombre: Ivan Pardo
C.I. 7067378


Miembro del Jurado
Nombre: Juan Pizarro
C.I. 17.067379


Miembro del Jurado
Nombre: Jorge Masquera
C.I. 6904545



Nota:

1. Esta Acta debe ser consignada en la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de la Salud (Sede Carabobo), inmediatamente después de la constitución del Jurado y/o de tener un veredicto definitivo, debidamente firmada por los tres miembros, para agilizar los trámites correspondientes a la elaboración del Acta de Aprobación del Trabajo.
2. *En caso de que el Trabajo sea reprobado, se debe anexar un informe explicativo, firmado por los tres miembros del Jurado.



ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo Especial de Grado titulado:

ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+

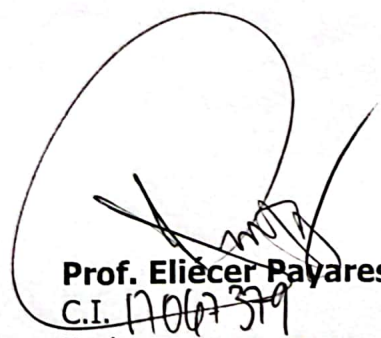
Presentado para optar al grado de **Especialista en Cirugía Oncológica** por el (la) aspirante:

LUZARDO F., JESUS GABRIEL M.
C.I. V – 18979292

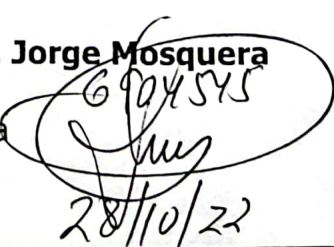
Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Eddy Verónica Mora C.I. 8726223, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Acta que se expide en valencia, en fecha: **28/10/2022**


Prof. Ivan Tortolero
(Pdte)
C.I. 7067378
Fecha 28-10-22.


Prof. Eliécer Payares
C.I. 17067379
Fecha 28-10-2022

TG:61-22


Prof. Jorge Mosquera
C.I. 6904545
Fecha 28/10/22





TG-CS: 61-22

ACTA DE CONSTITUCIÓN DE JURADO Y DE APROBACIÓN DEL TRABAJO

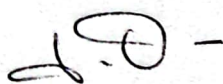
Quienes suscriben esta Acta, Jurados del Trabajo Especial de Grado titulado:

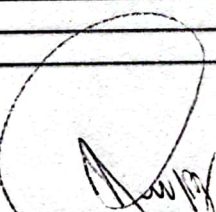
"ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+" Presentado por el (la) ciudadano (a): **LUZARDO F., JESUS GABRIEL M.** titular de la pólula de identidad N° **V-18979292**, Nos damos como constituidos durante el día de hoy: 07.10.2022 y convenimos en citar al alumno para la discusión de su Trabajo el día: 28.10.2022.

RESOLUCIÓN

Aprobado: _____ Fecha: _____, *Reprobado: _____ Fecha: _____.

Observación: _____


Presidente del Jurado
Nombre: IVAN FERNANDEZ
C.I. 7067378


Miembro del Jurado
Nombre: IVAN FERNANDEZ
C.I. 17.067379


Miembro del Jurado
Nombre: IVAN FERNANDEZ
C.I. 6904545



Nota:

1. Esta Acta debe ser consignada en la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de la Salud (Sede Carabobo), inmediatamente después de la constitución del Jurado y/o de tener un veredicto definitivo, debidamente firmada por los tres miembros, para agilizar los trámites correspondientes a la elaboración del Acta de Aprobación del Trabajo.
2. *En caso de que el Trabajo sea reprobado, se debe anexar un informe explicativo, firmado por los tres miembros del Jurado.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Verónica Mora, Medico Patólogo y Coordinadora de Postgrado de Cirugía Oncológica del Instituto Oncológico Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, por dedicarle tanto tiempo a la tutoría de esta tesis de manera incondicional y por haberme ofrecido esa gama de conocimientos que sin ellos este trabajo de investigación no hubiera sido posible.

Al Dr. Iván Tortolero, Cirujano Oncólogo y Jefe del Servicio de Tumores Mixtos del Instituto Oncológico Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, por ofrecer siempre esa mano amiga, dando ejemplo de rectitud y honradez.

Al Dr. Daniel Verdecchia, Cirujano Oncólogo, Coordinador de Postgrado de Cirugía Oncológica y Adjunto del Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto Oncológico Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, por apoyarme y guiarme en estos años de postgrado, dando lo mejor de sí.

Al Dr. Jorge Mosquera, Cirujano Oncólogo y Adjunto del Servicio de Tumores Mixtos del Instituto Oncológico Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia por haberme aportado los mejores conocimientos para la práctica de la Cirugía Oncológica.

A todos los médicos y enfermeras que laboran en el Instituto Oncológico Dr. Miguel Pérez Carreño de Valencia, que se llenaron de paciencia para guiarme y enseñarme en el camino de la Oncología.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA
INSTITUTO DE ONCOLOGÍA “DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO”



**ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONOSTICO DE
 LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+**

Autor: Jesús. G. Luzardo. F.
Tutora: Dra. Eddy Verónica Mora
Año: 2021

RESUMEN

Los pacientes con cáncer de colon (CC) en estadios iniciales tienen un pronóstico favorable. El tratamiento con quimioterapia adyuvante es controversial y discutible; debido a ello, la necesidad de identificar marcadores de pronóstico adicionales para la estratificación adecuada de los pacientes con Adenocarcinoma de colon y recto que se beneficiarían de dicho tratamiento, por lo que se han evaluado numerosos biomarcadores. En este contexto, el infiltrado inflamatorio de los tumores (TILs) según sus siglas en inglés, es un marcador prometedor en numerosos tumores.

Objetivo: Establecer el valor pronóstico del infiltrado linfocitario CD4+ y CD8+ en el adenocarcinoma de colon y recto.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrospectivo, en donde se evaluaron 120 casos diagnosticados con carcinoma de colon y recto atendidos en el Servicio de Tumores Mixtos, sección digestivo del Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, durante el período del 2003 hasta 2018 y que fueron intervenidos quirúrgicamente. Se excluyeron 93 casos y se incluyeron 11 casos extrahospitalario para un total de 38. Las muestras fueron sometidas a Inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación del TILs.

Resultados: Solo se evidenciaron marcaje del infiltrado inflamatorio en 17 de 38 pacientes, esto se mide de acuerdo al grado de infiltración en porcentaje (%) y solo 8 presentaron recaídas; 3 fueron hepáticas, 3 colon y 2 en región perianal. En lo que corresponde a los TILs, solo 2 casos se demostraron su presencia y fueron estos quienes tuvieron repuesta al tratamiento de rescate a diferencia del resto que no la presentaron y fallecieron.

Conclusión: El presente estudio muestra que la expresión de los TILs (CD4+-CD8+) se correlaciona con bajo índice de recaídas y metástasis así como mayor índice libre de enfermedad (ILE), apoyado por el valor de los resultados obtenidos en otros estudios con mayor número de muestras.

Palabras clave: Adenocarcinoma colorectal, linfocitos T, linfocitos infiltrantes tumorales.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA
INSTITUTO DE ONCOLOGÍA “DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO”**



**ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO: VALOR PRONÓSTICO DE
LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+**

Autor: Jesús. G. Luzardo. F.

Tutora: Dra. Eddy Verónica Mora

Año: 2021

ABSTRACT

Patients with early-stage colon cancer (CC) have a favorable prognosis. Treatment with adjuvant chemotherapy is controversial and debatable. Due to this, the need to identify additional prognostic markers for the adequate stratification of patients with Adenocarcinoma of the colon and rectum who would benefit from this treatment, for this reason numerous biomarkers have been evaluated. In this context, tumor inflammatory infiltrate (TIL) is a promising marker in numerous tumors.

Objective: To establish the prognostic value of CD4+ and CD8+ lymphocytic infiltrate in adenocarcinoma of the colon and rectum.

Materials and methods: A descriptive, cross-sectional, retrospective study was carried out, where 120 cases diagnosed with colon and rectal carcinoma were evaluated, treated in the Mixed Tumors Service, digestive section of the Dr. Miguel Pérez Carreño Institute of Oncology, during the period from 2003 to 2018 and who underwent surgery. 93 cases were excluded and 11 out-of-hospital cases were included. The samples were subjected to Immunohistochemistry (IHC) for the determination of TILs.

Results: Marking of the inflammatory infiltrate was only evidenced in 17 of 38 patients, this is measured according to the degree of infiltration in percentage (%) and only 8 presented relapses; 3 were liver, 3 colon and 2 in the perianal region. In what corresponds to the TILs, only 2 cases were demonstrated its presence and it was these who had a response to rescue treatment, unlike the rest who did not present it and died.

Conclusion: The present study shows that the expression of TILs (CD4+-CD8+) is correlated with a low rate of relapses and metastasis and a higher disease-free interval (ILE), supported by the value of the results obtained in other studies with a greater number of samples.

Key words: Colorectal adenocarcinoma, T lymphocytes, tumor infiltrating lymphocytes

ÍNDICE GENERAL

	Pag
AGRADECIMIENTO	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS	24
ANEXOS	27

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con cáncer de colon (CC) en estadios iniciales tienen un pronóstico favorable, con una supervivencia general (SG) a los 5 años de 70% a 80% únicamente con tratamiento quirúrgico; en contraste con estadios avanzado cuyo pronóstico es desfavorable. El tratamiento con quimioterapia adyuvante es controversial y discutible, (1) las guías actuales vigentes tanto de American Society of clinical Oncology (ASCO) como de European Society for Medical Oncology (ESMO) no recomiendan la quimioterapia adyuvante de rutina, su empleo, debe estar limitado a pacientes con alto riesgo de recurrencia (1,2); sin embargo, los factores de riesgo definidos hasta los momentos, son insuficientes para la selección ideal de aquellos pacientes que se beneficiarían del tratamiento con quimioterapia adyuvante (4). Debido a la necesidad de identificación de marcadores de pronóstico adicionales para la estratificación adecuada de los pacientes con Adenocarcinoma (ADC) de colon y recto (CCR), se han evaluado numerosos biomarcadores (5). En este contexto, el infiltrado inflamatorio de los tumores (TILs) según sus siglas en inglés, es un marcador prometedor en numerosos tumores (6).

Hasta ahora, la clasificación TNM es considerada el sistema más valioso para la estratificación de riesgo de estos pacientes, y los TILs se han propuesto como un componente para la clasificación de carcinomas de colon y recto. Adicionalmente los TILs han sido investigados en diversos entornos en CCR, pero la mayoría de los estudios incluyen poblaciones heterogéneas con CC.

El tratamiento del CC es básicamente quirúrgico, pero es conocido que la radioterapia en los casos que se utiliza como Neoadyuvante, disminuye el número de linfocitos CD3 así como CD8 razón por la cual se convierten en un marcador potencialmente valioso (24).

Para facilitar la interpretación de los TILs como biomarcador clínico en CCR, se ha propuesto un sistema de inmunoanálisis, en el cual, se identifican y cuantifican dos poblaciones de linfocitos T en dos áreas diferentes del tumor, definidas como frente central y el invasor. Los TILs consisten principalmente en células inflamatorias mononucleares, específicamente linfocitos T (CD3+) y un subgrupo de células T citotóxicas (CD8+) que tienen la capacidad de interactuar con las células diana (5).

Algunos estudios han demostrado la asociación entre la presencia de linfocitos T CD3+ y CD8+ en CCR con evolución de la enfermedad (sobrevida global e intervalo libre de enfermedad) (8). Sin embargo, el valor pronóstico CD4+ y CD8+ en los pacientes con CC sigue siendo en gran parte desconocida. Debido a esto, el objetivo del presente proyecto es evaluar el impacto pronóstico de la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con carcinoma de colon y recto.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General:

Establecer el valor pronóstico del infiltrado linfocitario CD4+ y CD8+ en el adenocarcinoma de colon y recto en el IOMPC de Valencia entre el 2003 y 2018.

Objetivos específicos:

1. Identificar los pacientes, según grupo etario, sexo, histología y estadio clínico, con adenocarcinoma colon y recto desde 15 de enero del 2003 hasta el 16 de diciembre del 2018 en Servicio de Tumores Mixtos del IOMPC.
2. Correlacionar la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ con las variables clínico/patológicas.
3. Evaluar la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ como predictores de recaída y metástasis en los pacientes.
4. Identificar la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ como predictores de mortalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, en donde se evaluaron 131 historias con diagnóstico de carcinoma de colon y recto atendidos en el Servicio de Tumores Mixtos Sección Digestivo del Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño desde enero del 2003 hasta diciembre del 2018 y que fueron intervenidos quirúrgicamente.

Los pacientes tuvieron un seguimiento en la consulta entre 24 a 60 meses aproximadamente.

Se establecieron los siguientes criterios en el estudio:

Criterios de inclusión:

- a) Pacientes adultos (mayores de 18 años de edad) que ingresaron en el IOMPC fueron sometidos a cirugía electiva y cuyas biopsias definitivas fueron procesadas en la institución (IOMPC).
- b) Disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del IOMPC.

Criterios de exclusión:

- a) Pacientes menores a 18 años de edad, que presentaron cáncer de colon y recto complicado (oclusión completa, perforación o hemorragia) y quienes fueron intervenidos de forma urgente o presentaban un proceso infeccioso de colon o de otra localización.
- b) Casos en los cuales no hubo disponibilidad de los bloques de parafina.

Se revisaron un total de 120 historias en el servicio durante ese periodo donde solo 27 cumplieron con los criterios de inclusión. Se excluyeron 93 historias por no cumplir con los criterios antes mencionados, este grupo

estaba conformado por: 22 historias tenían muestras dañadas o extraviadas y 71 se procesaron fuera de la institución sin poder obtener material de muestra. En vista de la muestra escasa, se incluyeron 11 historias no pertenecientes al IOMPC. En estos pacientes, se obtuvo acceso a la información pertinente incluyendo historias, láminas y bloques de parafina, los cuales fueron revisados por el mismo patólogo encargado de la revisión de todas las muestras.

Este estudio se efectuó con la aprobación de la Subdirección médica y de la Comisión de Investigación del Instituto de Oncología Dr. "Miguel Pérez Carreño" siguiendo las normas de Bioética y Bioseguridad del Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias y Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (Manual del 2008) así como Proyecto De Reglamento De La Comisión Permanente De Bioética Y Bioseguridad De La Universidad De Carabobo (CPBB-UC). Según el manual del 2008, la realización de pruebas clínicas en muestras tomadas no requiere la firma de un consentimiento informado (CI) específico, esto aplica a los bloques de parafina, siempre que no se obtenga un beneficio económico.

Seguidamente se procedió a la descripción de las variables clínico - patológicas representadas por: sexo, edad, localización del tumor, tipo histológico, estadio e ILE. Por otra parte, se cuantificaron los linfocitos presentes en las muestras de tumores y se analizó la expresión por

inmunohistoquímica de CD4+ y CD8+ en los linfocitos. Se relacionaron los resultados con las variables clínicopatológicas así como la evolución.

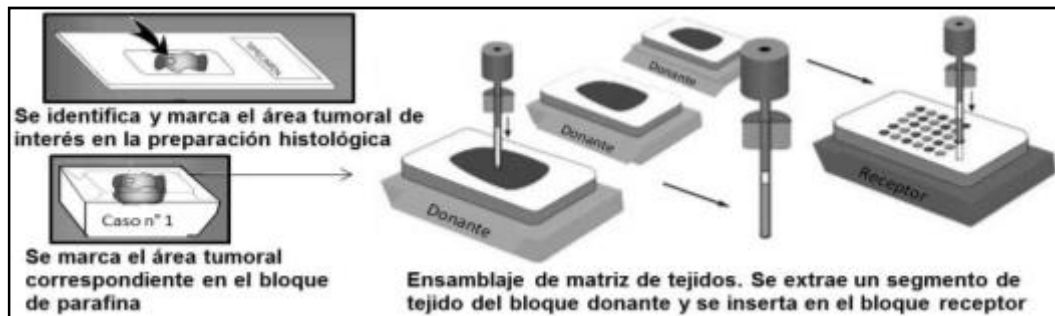
CONSTRUCCION DE MATRICES DE TEJIDO (TISSUE MICROARRAY).

En el Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC) de Valencia, Estado Carabobo, se preparó un bloque de parafina, se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Asimismo, se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionó cuidadosamente las zonas con tumor; marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina; posteriormente, se tomó muestra del tumor y se prepararon las matrices de tejido (*tissue arrays*, TMA).

Se preparó un bloque receptor o bloque únicamente de parafina, de un tamaño aproximado de 5 x 4 cm. La serie completa de bloques donantes se incluyó en un bloque receptor. En cada tumor se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido (donante). Se estableció el orden de estos bloques en una plantilla que sirvió después para su lectura en el microscopio. El procedimiento consta de dos agujas de distintos calibres con lo que se realiza el troquelado de los bloques: a) con la aguja de 25 G se extrae un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes; b) con la aguja de 23 G se obtiene el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introduce en el bloque receptor. Para asegurar la zona

elegida para el estudio se realizó un duplicado de la plantilla en el mismo bloque, obteniéndose así dos cilindros de 1 mm de diámetro de cada caso (Figura 1).

Figura 1. Representación esquemática de la construcción de matrices de tejidos (25).



Una vez terminado el proceso de troquelado, se introdujo el nuevo bloque en la estufa a una temperatura de 45° durante 5 minutos, para que la parafina de los cilindros y del bloque receptor se amolde y la superficie se alise. Los cortes de los bloques se realizaron de 4 μ m en un micrótopo de rotación (Microm HM350S) en cristales tratados con Poli-L-Lysina para evitar el desprendimiento de los cortes y se introdujeron durante 30 minutos a 65° en estufa para secarlos. Se construyeron 2 bloques con 38 casos; cada cilindro de los TMA fue analizado en dos ocasiones y los datos recogidos se anotaron en tablas diseñadas para tal fin. Se consideró como valor definitivo el promedio de las observaciones.

INMUNOHISTOQUIMICA:

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios de ratón M7310 clon 4B12, de Dako[®] a una dilución 1:80 para la detección inmunohistoquímica de la proteína CD4, de ratón M7103 clon C8/144B, de Dako[®] a una dilución 1:100 para la detección inmunohistoquímica de la proteína CD8. Se consideró como positivo la coloración marrón dorado y citoplasmática y de membrana. Se realizaron cortes histológicos de 4 micras de espesor obtenidos de la TMA. La recuperación antigénica se efectuó en el *Isotemp Water Bath* (modelo Isotemp 205, *Fisher Scientific*[®]) con un tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9,0) a 95°C durante 40 minutos. Seguidamente, los cortes se lavaron en agua destilada y a continuación en tampón Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) a temperatura ambiente. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó colocando 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 minutos, seguido de 3 lavados en tampón Tris-HCl.

Consecutivamente, se efectuó la incubación con el anticuerpo primario por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron en tampón Tris-HCl y se añadió el anticuerpo secundario (Envision, Dako) durante 30 minutos en las mismas condiciones del paso anterior. Posteriormente, las muestras se lavaron en tampón Tris-HCl y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina (0,05% tetrahidrocloreto de diaminobencidina, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) durante 5

minutos. Con el fin de visualizar los núcleos, se efectuó la tinción nuclear con hematoxilina. Por último, se realizó la deshidratación de los cortes con alcohol isopropílico en concentración creciente (70, 95 y 100%) y luego en xilol. El montaje de los cortes se realizó con resina sintética (DPX), para su visualización posterior en el microscopio óptico (marca *Nikkon Modelo Eclipse E200*)

Se utilizó como control positivo del método inmunohistoquímico un corte de ganglio linfático.

Los linfocitos fueron identificados en el frente tumoral de adenocarcinomas, tanto de brotes como en islas tumorales las cuales fueron incluidas en los TMA, por cuantificación manual de los linfocitos en el área correspondiente de 1 mm² en los cortes coloreados con Hematoxilina y Eosina. Se incluyeron linfocitos tanto en el epitelio tumoral como en el estroma peritumoral. Se excluyeron artefactos tales como pliegues, hendiduras, moco y mucina.

Se realizó el mismo procedimiento para los linfocitos CD4+ y CD8+, cuantificándose su densidad de forma manual por milímetro cuadrado.

Los datos fueron registrados mediante el programa Microsoft Office Excel 2019 y fueron procesados para el análisis estadístico de las variables estudiadas usando el paquete estadístico (Statistical Package for Social Sciences) versión 22.0 para Windows. En la descripción de la información se

usaron porcentajes, promedios y desviaciones estándar; asimismo, para la determinación de la asociación y análisis de la expresión por inmunohistoquímica de los 2 biomarcadores (CD4+ y CD8+).

RESULTADOS

Características de las muestras.

Se describen en el Tabla 1. Los pacientes (N=38) estudiados se distribuyeron según el sexo en 15 mujeres (38%) y 23 hombres (61%), con edades comprendidas entre 18 y 86 años y una media de 54.6 años. Se encontró que el 84,2% (32) fueron diagnosticados con ADC. Los tumores estudiados fueron encontrados más frecuentemente en colon derecho (52.6%), seguido del colon izquierdo (31.6%). Según el estadio, los más frecuentes fueron el estadio IIA con 12 casos (31,58%) y el estadio IIIB con 11 casos (28.95%). El seguimiento promedio fue de 60 meses aproximadamente.

Análisis de subgrupos

Del total de 22 muestra que marcaron TILS/CD4, 15 (87,3%) presentaron positividad y 3 (16,7%) resultaron negativas. Para el marcador CD8 (N=22) 15 (78,9%) tuvieron resultados positivo y 4 (21,1%) negativas.

Linfocitos infiltrante en el tumor

Se midió de acuerdo al grado de infiltración medido en porcentaje (%), se consideró negativo si éste se mostraba por debajo de 30% y positivo por

encima de este valor, tanto para CD4+ como para CD8+. Se agruparon las muestras según:

Edad: menor a 52 años y mayor a 52 años.

1. En individuos sin otros factores predisponentes, el riesgo de presentar CCR antes de los 40 años es muy bajo, siendo prácticamente todos los casos diagnosticados a esta edad atribuibles a los síndromes hereditarios. A partir de los 50 años el riesgo aumenta progresivamente, duplicándose la incidencia con cada década alcanzando el pico de máximo riesgo entre los 70-74 años (24).
2. Patrón histológico: ADC bien, moderado y mal diferenciado.

Subconjunto de linfocitos CD4+

- Los TILs se encontraron en 7 casos en menores de 50 años y 7 en mayores de 50 años (cuadro 2).
- Según el patrón histológico (cuadro 4), 87,5% reportaron positivo para ADC, donde se encontró que el grado de diferenciación se distribuyó en 6 G1, 5 G2 y 1 G3.
- Según el estadio se dividieron de la siguiente manera: 5 casos en St IIA, 2 en St IIIA, 5 en St IIIB, 1 en St IIIC y 1 en St IV (cuadro 6).
- En cuanto al intervalo libre de enfermedad (ILE) (cuadro 8): 6 casos menor a 5 años y 3 presentaron mayor a 5 años.

Subconjunto de linfocitos CD8+:

- Los linfocitos CD8+ se encontraron 6 casos (40%) menores de 52 años y 9 en mayores de 52 (60%) (cuadro 3).

- El patrón histológico (cuadro 5), 86,7% (13) reportaron positivo para ADC. De acuerdo al grado de diferenciación; 8 G1, 4 G2 y 1 G3.
- Según el estadio se dividieron de la siguiente manera; 1 caso en St I, 7 casos en St IIA, 2 en St IIIA, 4 en St IIIB y 1 en St IIIC (cuadro 7). Siendo los más frecuentes el St IIA que representa el 36.8%, seguido del St IIIB con un 31.6%.
- Intervalo libre de enfermedad (cuadro 9): 7 casos con un ILE menor a 5 años y 3 presentaron un ILE mayor a 5 años.

Relación entre TILs, progresión y mortalidad:

Como se puede observar de 38 casos, solo 8 presentaron recaídas, de los cuales 3 fueron hepáticas, 3 en colon y 2 en región perianal. En lo que corresponde a los TILs, de estos 8 casos en 2 se demostró la presencia y fueron estos los que tuvieron repuesta al tratamiento de rescate (Quimioterapia) a diferencia del resto y fallecieron.

DISCUSIÓN

El Cáncer de Colon y Recto es una entidad patológica que afecta significativamente a la población y que hasta nuestros días, a pesar del desarrollo tecnológico, la implementación de nuevas terapéuticas y el avance farmacológico esto no siempre se traduce en una mejora en la calidad de vida del paciente, alcanzándose incluso altos índices de mortalidad.

El CCR a nivel mundial es una de las entidades neoplásicas más importantes y afecta tanto a países desarrollados como subdesarrollado, hoy en día su evolución depende de múltiples factores pronósticos muchos ya conocidos y otros en estudio (7).

Aunque se ha reconocido desde hace mucho tiempo que la contextura inmune juega un papel vital en la iniciación y el desarrollo del tumor (20), estos conocimientos no han tenido un impacto significativo en la aplicación clínica de rutina. La infiltración de células T CD3+ y CD8 + se informó como marcadores predictivos positivos de supervivencia en pacientes con CCR (8, 9). En este estudio se analizó la importancia del TILs identificados en el estudio histopatológico para establecer el valor pronóstico de los TILs CD4+ y CD8+ en pacientes con cáncer de colon y recto y correlacionarlo con las características anatomopatológicas, proporcionado por estos marcadores.

El CD4 es una glucoproteína de 55 kDa con cinco dominios externos de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular altamente conservado. CD4 actúa como correceptor en la activación de las células T inducida por antígeno restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y puede incrementar la adhesión celular (15).

El CD8 es una glucoproteína transmembrana con una masa molecular de 68 kDa. Se expresa como un heterodímero unido por puentes disulfuro que comprende una cadena α de 32-34 kDa y una cadena β de 30-32 kDa, o como un homodímero que comprende dos cadenas α . Tanto la CD8 α como la CD8 β tienen un dominio variable de inmunoglobulina típico, de tipo región, en una porción extracelular N-terminal, que las convierte en miembros de la

superfamilia de los genes de la inmunoglobulina. La CD8 se expresa principalmente como el heterodímero $\alpha\beta$ en la mayoría de los timocitos y en las células T supresoras/citotóxicas maduras restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Una proporción de células T $\gamma\delta$ y NK expresan la CD8 como homodímero $\alpha\alpha$ (16).

Se encontró coincidencias en la literatura con los resultados de las características clínico-patológicas reportadas en esta investigación, donde se refiere que TILs representan un factor pronóstico favorable en pacientes con CCR independientemente el estadio, pero nuestra data no es lo suficientemente grande para hacer una comparación.

Sin embargo existen análisis que agrupan una amplia recopilación de estudios que sugieren que los recuentos de TIL generalizados altos y la densidad de células T CD4+ tienen la asociación más fuerte con el beneficio de supervivencia para los pacientes en comparación con los recuentos de TILs generalizados bajos y la densidad de células T CD4+ en lo que respecta a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y sobrevida global (SG). En nuestro estudio 8 presentaron progresión del cual 6 carentes de TILs fallecieron mientras que el resto (2) actualmente están vivos, dando como resultado que el Infiltrado inflamatoria favorece en la SG.

El efecto del sistema inmunológico en el CCR todavía se está dilucidando, ya que varios estudios prospectivos y retrospectivos demuestran que una sólida inmunidad antitumoral se asocia con un pronóstico favorable en pacientes con CCR.

Las dificultades institucionales, se tradujeron en un número insospechadamente pequeño de la muestra, lo cual hace prácticamente imposible cumplir con los objetivos planteados. Nuestro estudio no

demuestra que la densidad de los TILs generalizada se traduzca en un biomarcador de supervivencia en pacientes con cáncer colon y recto. Sin embargo los resultados descriptivos sugieren, semejante a lo observado en otras investigaciones la asociación de los TILs con una mayor supervivencia (10). En este estudio pudiéramos incluir la adición de grandes estudios retrospectivos de Rozek *et al* (11) y Sinicrope *et al* (12), que incluyó a 2.369 pacientes y 2.293 pacientes respectivamente, lo que agrega mayor precisión y generalización al reconocimiento de que los TILs confieren una ventaja pronóstica con una probabilidad máxima de HR = 0,65 para la supervivencia general.

Numerosos estudios han destacado recientemente los efectos del microambiente inmunológico sobre la tumorigénesis, el desarrollo y la metástasis del cáncer (17). De hecho, se demostró que la evaluación del enriquecimiento de los TILs es un importante papel complementario del sistema de estadificación TNM para la predicción de recaídas y mortalidad en CCR (18, 19). Estudios detectaron TILs mediante micromatrices de tejido, mientras que otros utilizaron secciones histológicas completas. Estas diferencias podrían ser responsables de la variabilidad para alcanzar un método estandarizado de evaluación TILs. Galon *y col.* junto con otros grupos, incluidos Robinset *et al* (13) están haciendo esfuerzos para desarrollar métodos estandarizados para evaluar TILs con el fin de mejorar la consistencia y reproducibilidad de las mediciones de los TILs para futuros estudios de diagnóstico, sin embargo, estas técnicas no se han adaptado lo suficiente como para resumir con metaanálisis de estos enfoques específicos (14). Dado nuestros resultados y la extensa literatura que demuestra el infiltrado de células inmunes intratumorales como un indicador pronóstico altamente informativo, se justifica un estudio, con una muestra significativa, con el objetivo de obtener resultados que confieran validez.

Si bien son cierto los cánceres de recto se someten a un algoritmo de tratamiento diferente en el entorno curativo que puede, además de sus diferencias biológicas con los cánceres de colon, confundir la interpretación de estos estudios correlativos. Un estudio publicado en el 2014 por STEPHANIE H. LIM y Col donde evaluaron el efecto de la quimiorradiación Neoadyuvante sobre los TILs en de Ca Recto avanzado. El estudio demostró que los recuentos de linfocitos CD3+ aumentan con la quimiorradioterapia. Los datos también sugieren que el subconjunto de CD8+ es probablemente responsable de este aumento, que es evidente después de la quimiorradioterapia de larga duración. Este aumento de CD8+ también parece correlacionarse con la regresión del tumor. Esto concuerda con estudios que han demostrado que las células T CD4+ y CD8+ se correlacionan significativamente con el grado histológico después de la quimiorradioterapia y con la respuesta completa después del tratamiento (21). El grupo de trabajo de la iniciativa *IMMUNOSCORE* actualmente busca incorporar la puntuación de la respuesta inmune del huésped en sistema de estadificación TNM, basándose en la creencia de que la progresión del tumor no es un proceso autónomo de las células (23). Esta puntuación se basa en CD3+ y CD8+. Un estudio reciente en cáncer de recto que utiliza esta puntuación inmunológica ha demostrado que las puntuaciones altas de CD3+ y CD8+ en muestras quirúrgicas no tratadas se asociaron con un ILE superior y una SG (22). También encontraron que los recuentos de CD3+ y CD8+ eran más altos en las muestras de biopsia de un grupo separado de 55 pacientes que respondieron al tratamiento neoadyuvante.

CONCLUSIONES

La evaluación inmunohistoquímica de la expresión de CD4+ - CD8+ en CCR, el tamaño de la muestra no nos permitió evidenciar que hubo asociación significativa con recaída y metástasis.

En nuestro estudio 8 de 38 casos, presentaron recaídas y metástasis, de los cuales solo 2 casos se evaluó la presencia de TILs siendo estos positivos donde respondieron de forma positiva al tratamiento de rescate por tanto puede considerarse como factor pronóstico favorable en relación SG.

Se demostró que expresión de los TILs (CD4+ - CD8+) se correlaciona con bajo índice de recaídas y metástasis y mayor ILE.

En nuestra investigación la expresión del infiltrado inflamatorio, con el fin de dilucidar si estos se pueden usar como factor pronóstico en el comportamiento de recaídas y metástasis en CCR no es posible ya que con la poca muestra no se pudo realizar un cuadro comparativo.

El infiltrado inflamatorio se define como un facto pronóstico favorable que puede presagiar la evolución del paciente con CCR.

Recomendaciones

Promover estudios multiinstitucionales o revisiones sistemáticas/metaanálisis, que permitan acumular una mayor cantidad de casos relacionado con el tema.

Diseños de ensayos clínicos prospectivos para la evaluación de estos biomarcadores en nuestro medio.

Divulgar resultados a través de publicaciones en revistas indexadas, arbitradas; congresos u otros eventos que permitan el intercambio de experiencias de la investigación como actividad académica.

Por otro lado, explorar otros potenciales biomarcadores para explorar su valor en la predicción del curso clínico de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Morris M, Platell C, McCaul K, Millward M, Van Hazel G, Bayliss E, et al. Survival rates for stage II colon cancer patients treated with or without chemotherapy in a population-based setting. *Int J Colorectal Dis* [internet]. 2007 [citado 20 Dic 2018]; 22, 887–895. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00384-006-0262-y>.
- 2) Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [internet]. 2013 [citado 20 Dic 2018]; 24, 64–72. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt354>.
- 3) Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* [internet]. 2004 [citado 20 Dic 2018]; 22, 3408–3419. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.063>
- 4) O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* [internet]. 2011 [citado 20 Dic 2018]; 29, 3381–3388. Disponible en: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.3426>.
- 5) Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* [internet]. 2012 [citado 20 Dic 2018];10(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-1>.
- 6) Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, et al. Short-term preoperative radiotherapy interferes with the determination of pathological parameters in rectal cancer. *J Pathol* [internet]. 2002 [citado 20 Dic 2018];197, 20–27. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/path.1098>.
- 7) Ferreira EJ, Díaz JA, Herrera AA, García E. Cáncer de colon y recto. *Medicas UIS* 2007; 20: 174-84.
- 8) Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol* [internet]. 2010 [citado 20 Dic 2018]; 11, 19. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-19>.
- 9) Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y, et al. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer*. octubre de 2019;121(8):659-65

- 10) Cremonesi, E. *et al* . La microbiota intestinal modula el tráfico de células T hacia el cáncer colorrectal humano. *Gut* **67** , 1984–1994, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313498> (2018).
 - 11) Rozek, LS y *col* . Linfocitos infiltrantes de tumores, reacción linfoide similar a la de Crohn y supervivencia del cáncer colorrectal. *J Natl Cancer Inst* **108** , <https://doi.org/10.1093/jnci/djw027> (2016).
-
- 12) Sinicrope, FA *et al* . Asociación de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) con subtipo molecular y pronóstico en cánceres de colon (CC) en estadio III de un ensayo de quimioterapia adyuvante basado en FOLFOX. *J. Clin. Oncol* . **34** (2016).
 - 13) Sherwood, AM y *col* . Los linfocitos que infiltran el tumor en los tumores colorrectales muestran una diversidad de secuencias de receptores de células T que difieren de las células T en el tejido mucoso adyacente. *Inmunología del cáncer, inmunoterapia: CII* **62** , 1453–1461, <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1446-2> (2013).
-
- 14) Pages, F. *et al* . Validación internacional del Immunoscore de consenso para la clasificación del cáncer de colon: un estudio de pronóstico y precisión. *Lancet* **391** , 2128–2139, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30789-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30789-X) (2018).
 - 15) Leong A S-Y, Cooper K and Leong F J W-M eds. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology, second ed 2003. Greenwich Medical Media Ltd: p. 65-6.
 - 16) Nakauchi H. TC9. CD8 Workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10- 14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 65-7.
 - 17) Mahajan UM, Langhoff E, Goni E, Costello E, Greenhalf W, Halloran C, et al. Firma de células inmunes y estroma asociada con la supervivencia libre de progresión de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático resecado. *Gastroenterología*. (2018) 155: 1625–39.e2. doi: 10.1053 / j.gastro.2018.08.009
 - 18) Galon J, Costes A, Sánchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. El tipo, la densidad y la ubicación de las células inmunitarias dentro de los tumores colorrectales humanos predicen el resultado clínico. *Ciencias*. (2006) 313: 1960–4. doi: 10.1126 / science.1129139
 - 19) Páginas F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. Validación internacional del inmunoscore de consenso para la clasificación del cáncer de colon: un estudio de pronóstico y precisión. *Lanceta*. (2018) 391: 2128–39. doi: 10.1016 / S0140-6736 (18) 30789-X.

- 20) <https://www.google.com/search?q=Li+X%2C+Wen+D%2C+Li+X%2C+Yao+C%2C+Chong+W%2C+Chen+H.+Identification+of+an+Immune+Signature+Predicting+Prognosis+Risk+and+Lymphocyte+Infiltration+in+Colon+Cancer.+Front+Immunol.+2020%3B11%3A1678.&og=Li+X%2C+Wen+D%2C+Li+X%2C+Yao+C%2C+Chong+W%2C+Chen+H.+Identification+of+an+Immune+Signature+Predicting+Prognosis+Risk+and+Lymphocyte+Infiltration+in+Colon+Cancer.+Front+Immunol.+2020%3B11%3A1678.&aq=chrome..69i57.549j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

- 21) Yasuda K , Nirei T, Sunami E, Nagawa H , Kitayama J. La densidad de linfocitos T CD4 (+) y CD8 (+) en muestras de biopsia puede ser un predictor de la respuesta patológica a la quimiorradioterapia (TRC) para el cáncer de recto . Radiat Oncol **6** : 49 , 2011.

- 22) Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, Marliot F, Haicheur N, Todosi AM, Kirilovsky A, Lagorce C, Bindea G, Ferariu D, Danciu M, Bruneval P, Scripcariu V, Chevallier JM, Zinzindohoue FBerger A, Galon J, Pages F: Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin Cancer Res **20**(7): 1891-1899, 2014.

- 23) Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bif C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, VidalVanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, HafezBakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascito PA, Marincola FM, Fox BA, Pages F: Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol **232**(2): 199-209, 2014.

- 24) Sata-About J, et al. Associations of micronutrients with colon cancer risk in African Americans and whites: results from the North Carolina Colon Cancer Study. Cancer Epidemiol Biomarkers P, rev. 2003 Aug;12(8):747-54.

- 25) Rademakers S, Rijken P, Peeters W, Nijkamp M, Barber P, Van der Laak J, et al. Parametric mapping of immunohistochemically stained tissue sections; a method to quantify the colocalization of tumor markers. Cell Oncol (Dordr). 2011;34:119-129.

ANEXOS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas básicas de pacientes con ADC de CCR.

		media	rango	frecuencia	porcentaje
Edad		54,6	(18-86)		
Sexo	Femenino			15	39,5%
	Masculino			23	60,5%
Ubicación	DERECHO			20	52,6%
	IZQUIERDO			12	31,6%
	RECTO BAJO			4	10,5%
	RECTO MEDIO			2	5,3%
CD4	Negativo			3	16,7%
	Positivo			15	87,3%
CD8	Negativo			4	21,1%
	Positivo			15	78,9%
Histología	ADC			32	84,2%
	CELULAS ANILLO			2	5,3%
	MUCINOSO			4	10,5%
Grado	1			17	44,7%
Diferenciación	2			17	44,7%
	3			4	10,5%
Invasión	NA			2	5,3%
Linfática	NO			25	65,8%
	SI			11	28,9%
Invasión	NA			2	5,3%
Vascular	NO			29	76,3%
	SI			7	18,4%
Invasión	NA			2	5,3%
Perineural	NO			35	92,1%
	SI			1	2,6%
pT	NA			2	5,3%
	T1			1	2,6%
	T2			7	18,4%
	T3			24	63,2%
	T4A			3	7,9%
	T4b			1	2,6%
pN	0			14	38,9%
	1A			6	16,7%
	1B			1	2,8%
	2A			3	8,3%
	2B			5	13,9%
	IA			2	5,6%
	Mx			1	2,8%
	NA			3	8,3%
	NO			1	2,8%
M	NA			2	5,3%
	NO			35	92,1%
	SI			1	2,6%
Estadio	I			4	10,5%
	IIA			12	31,6%
	IIIA			3	7,9%
	IIIB			11	28,9%
	IIIC			5	13,2%
	IV			3	7,9%

Cuadro 1. Recuento según el tipo histológico.

		Tipo Histológico		Total
		ADC	OTRO	
Grupos etarios	-52	13	4	17
	+52	19	2	21
Total		32	6	38

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 3. Expresión TILS CD4 según grupo etario.

			EDAD (Agrupada)		Total
			-52	+52	
CD4	N	Recuento	0	3	3
		%	0,0%	100,0%	100,0%
	P	Recuento	7	7	14
		%	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Recuento	7	10	17	
	%	41,2%	58,8%	100,0%	

(p<0.05 – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 3. Expresión TILs CD8 según grupo etario.

			EDAD (Agrupada)		
			-52	+52	Total
CD8	N	Recuento	1	2	3
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	P	Recuento	6	9	15
		%	40,0%	60,0%	100,0%
Total	Recuento	7	11	18	
	%	38,9%	61,1%	100,0%	

(p<0.05 – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 4. Expresión de CD4 según el tipo histológico

			HIST		Total
			ADC	OTRO	
CD4	N	Recuento	3	0	3
		%	100,0%	0,0%	100,0%
	P	Recuento	12	2	14
		%	85,7%	14,3%	100,0%
Total		Recuento	15	2	17
		%	88,2%	11,8%	100,0%

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 5. Expresión de CD8 según el tipo histológico.

			HIST		Total
			ADC	OTRO	
CD8	N	Recuento	3	0	3
		%	100,0%	0,0%	100,0%
	P	Recuento	13	2	15
		%	86,7%	13,3%	100,0%
Total		Recuento	16	2	18
		%	88,9%	11,1%	100,0%

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 6. Expresión y correlación del CD4 según el Estadio clínico.

		ESTADIO						Total
			IIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV	
CD4	N	Recuento	0	2	0	1	0	3
		%	0,0%	66,7%	0,0%	33,3%	0,0%	100,0%
P	Recuento	1	5	2	5	1	1	15
	%	6,7%	33,3%	13,3%	33,3%	6,7%	6,7%	100,0%
Total	Recuento	1	7	2	6	1	1	18
	%	5,6%	38,9%	11,1%	33,3%	5,6%	5,6%	100,0%

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 7. Expresión y correlación del CD8 según el Estadio clínico.

				ESTADIO						
				I	IIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV	Total
CD8	N	Recuento	1	1	0	0	2	0	0	4
		%	25,0%	25,0%	0,0%	0,0%	50,0%	0,0%	0,0%	100,0%
	P	Recuento	0	0	7	2	4	1	1	15
		%	0,0%	0,0%	46,7%	13,3%	26,7%	6,7%	6,7%	100,0%
Total	Recuento	1	1	7	2	6	1	1	19	
	%	5,3%	5,3%	36,8%	10,5%	31,6%	5,3%	5,3%	100,0%	

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Cuadro 8 y 9. Correlación del intervalo libre de enfermedad mayor o menor de 5 años según TILs CD4-CD8

			Intervalo Libre de Enfermedad		
			-5a	+5a	Total
CD4	N	Recuento	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	P	Recuento	6	3	9
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Total	Recuento	7	4	11	
	%	63,6%	36,4%	100,0%	

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

			-5a	+5a	Total
CD8	N	Recuento	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	P	Recuento	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total	Recuento	8	4	12	
	%	66,7%	33,3%	100,0%	

($p < 0.05$ – No se encontró correlación entre las variables)

Figura 1. Especificaciones de CD4.



**Monoclonal Mouse
Anti-Human CD4
Clone 4B12**

Número de catálogo M7310

Uso previsto	Para uso en diagnóstico in vitro. Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, Clone 4B12, está indicado para su uso en inmunohistoquímica (IHC). Este anticuerpo marca los timocitos y las células T cooperadoras (1). Los resultados facilitan la clasificación de linfomas de células grandes anaplásicas (2). La interpretación de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse mediante estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está indicado para su uso después de realizar el diagnóstico primario del tumor mediante histopatología convencional con tinciones histoquímicas no inmunológicas.
Resumen y explicación	CD4 es una glucoproteína de 55 kDa con cinco dominios externos de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular altamente conservado. CD4 actúa como coreceptor en la activación de las células T inducida por antígeno restringida por el MHC de clase II y puede incrementar la adhesión celular (1). La molécula CD4 también actúa como receptor para el virus de la inmunodeficiencia humana en las células T y en los monocitos/macrófagos (4). CD4 se expresa durante el desarrollo de las células T, pero no está presente en los timocitos inmaduros (3). Se expresa en las células T cooperadoras, en aproximadamente el 80-90% de los timocitos maduros y en 55-65% de las células T periféricas maduras. Asimismo, está presente en un subconjunto de células T supresoras o citotóxicas. CD4 también se expresa en monocitos/macrófagos, células de Langerhans y otras células dendríticas, pero no se expresa en las células B (1). CD4 desempeña una función importante en el inmunofenotipo de los linfocitos reactivos, así como en los trastornos linfoproliferativos. La mayoría de linfomas de células T periféricas se derivan del subgrupo de células T cooperadoras (1). Los anticuerpos contra CD4 también pueden facilitar la clasificación de micosis fungoides y linfomas de células T periféricas inespecíficos (3-5). Consulte el documento de Dako <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica) o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHC para: Principio del procedimiento, Material necesario, pero no suministrado, Almacenamiento, Preparación de las muestras, Procedimiento de tinción, Control de calidad, Solución de problemas, Interpretación de la tinción, Limitaciones generales.
Reactivo suministrado	Se suministra anticuerpo de ratón monoclonal en forma líquida como sobrenadante de cultivo de células en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/l de azida sódica. <u>Clone:</u> 4B12. <u>Isótipo:</u> IgG1, kappa. <u>Concentración de IgG1 de ratón en mg/l:</u> Consulte la etiqueta del vial. La concentración de proteína puede variar de un lote a otro, pero este cambio no afecta a la dilución óptima de uso. El título de cada lote se compara y ajusta mediante un lote de referencia para asegurar que el resultado de la tinción inmunohistoquímica sea consistente entre los distintos lotes.
Inmunógeno	Proteína recombinante correspondiente al dominio externo de la molécula CD4.
Precauciones	1. Para uso en diagnóstico in vitro. 2. Para usuarios profesionales. 3. Este producto contiene azida sódica (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en las que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, lo que formará acumulaciones de azidas metálicas muy explosivas. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas. 4. Como con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deben utilizarse los procedimientos de manipulación apropiados. 5. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. 6. La solución no utilizada debe desecharse de acuerdo a las normativas locales, nacionales y de la UE.
Almacenamiento	Almacénelo a una temperatura de 2 a 8 °C. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad que aparece impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobarlas. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad en este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. Si observa tinciones inesperadas que no puedan atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio

Preparación de las muestrasCortes de parafina:

El anticuerpo se puede utilizar para la marcación de cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina.

Se requiere el pretratamiento de los cortes de tejidos desparafinados* con recuperación del epitopo inducida por calor (HIER). Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos mediante HIER con Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) diluido (n.º de catálogo K8004).

Se recomienda el pretratamiento de los cortes de tejido desparafinados, en parafina y fijados en formol con Dako PT Link. Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link. Para PT Link se deben aplicar los siguientes parámetros: temperatura de precalentamiento: 65 °C; temperatura y tiempo de recuperación del epitopo: 97 °C para 20 (±1) minutos; enfriar a 65 °C. Extraiga la gradilla de portaobjetos del tanque PT e introduzca los portaobjetos inmediatamente en un bote o tanque (p. ej., PT Link Rinse Station, n.º de catálogo PT109) que contenga EnVision FLEX Wash Buffer (20X), diluido y a temperatura ambiente (n.º de catálogo K8007). Deje los portaobjetos en Wash Buffer durante 1-5 minutos.

*Cortes de tejido en parafina: Como método alternativo de preparación de una muestra, tanto la desparafinización como la rehidratación y recuperación del epitopo se pueden realizar en el PT Link con un procedimiento modificado. Consulte las instrucciones en la Guía del usuario de PT Link. Después de finalizado el procedimiento de tinción, se deben deshidratar, enjuagar y montar los cortes usando un método de montaje permanente.

No permita que las secciones de tejido se sequen durante el tratamiento ni durante el procedimiento de tinción inmunohistoquímica siguiente. Para una mejor adherencia de los cortes de tejidos a los portaobjetos, se recomienda el uso de Dako Sitarized Slides (n.º de catálogo S3003).

Procedimiento de tinción

Estas solo son pautas orientativas. Las condiciones óptimas pueden variar en función del tipo de muestra y del método de preparación y deberán ser validadas individualmente en cada laboratorio. El rendimiento de este anticuerpo debe ser establecido por parte del usuario si se utiliza con otros sistemas de tinción manual o plataformas automatizadas.

Dilución: Monoclonal Mouse Anti-Human CD4, número de catálogo M7310, puede utilizarse a un rango de dilución de 1:40-1:80 al aplicarlo en cortes pretratados, en parafina y fijados en formol con una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Se recomienda diluir el anticuerpo con EnVision FLEX Antibody Diluent (n.º de catálogo K8006) o Dako Antibody Diluent (n.º de catálogo S0809). El reactivo de control negativo recomendado es Dako Negative Control, Mouse IgG1 (n.º de catálogo X0931), diluido en la misma concentración de IgG que el anticuerpo primario. A menos que se haya establecido la estabilidad del anticuerpo y del control negativo diluidos en el procedimiento de tinción actual, se recomienda diluir estos reactivos inmediatamente antes de su uso.

Control de calidad: Los tejidos de control positivo y negativo, así como el reactivo de control negativo, deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El tejido de control positivo debe incluir las amígdalas y el hígado y las células/estructuras deben mostrar patrones de reacción como se describe para este tejido en "Características de resultados".

Visualización: Se recomienda EnVision FLEX, High pH, (número de catálogo K8000/K8010) con una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Siga el procedimiento correspondiente al sistema o sistemas de visualización seleccionados.

Interpretación de la tinción

Las células marcadas con el anticuerpo muestran una tinción de membrana.

Características de resultados

Tejidos normales: En la amígdala, las células T cooperadoras, tanto numerosas como aisladas, muestran una reacción de tinción de moderada a fuerte. En el hígado, las células de Kupffer y endoteliales de los sinusoides muestran una reacción de tinción de débil a moderada.

Tejidos anómalos: El anticuerpo marcó 1/1 micosis fungoides y 2/2 linfomas de células T periféricas. En un estudio en 75 pacientes pediátricos, el anticuerpo marcó 22/51 linfomas anaplásicos de células grandes (2).

Figura 2. Especificaciones CD8.



Monoclonal Mouse
Anti-Human CD8
Clone C8/144B

N.º de catálogo M7103

Uso previsto	Para uso diagnóstico in vitro. Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C8/144B, está indicado para su uso en inmunohistoquímica (IHC). El anticuerpo marca las células T citotóxicas/supresoras. Los resultados facilitan la clasificación de linfomas de células T (1) y micosis fungoides (2). La clasificación diferencial se complementa con los resultados de un panel de anticuerpos. La interpretación de los resultados de cualquier tinción, o su ausencia, debe complementarse mediante estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas. Este anticuerpo está indicado para su uso después de realizar el diagnóstico primario del tumor mediante histopatología convencional con tinciones histoquímicas no inmunológicas.
Resumen y explicación	La CD8 es una glucoproteína transmembrana con una masa molecular de 68 kDa. Se expresa como un heterodímero unido por puentes disulfuro que comprende una cadena α de 32-34 kDa y una cadena β de 30-32 kDa, o como un homodímero que comprende dos cadenas α. Tanto la CD8α como la CD8β tienen un dominio variable de inmunoglobulina típico, de tipo región, en una porción extracelular N-terminal, que las convierte en miembros de la superfamilia de los genes de la inmunoglobulina. La CD8 se expresa principalmente como el heterodímero $\alpha\beta$ en la mayoría de los timocitos y en las células T supresoras/citotóxicas maduras restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Una proporción de células T $\gamma\delta$ y NK expresan la CD8 como homodímero $\alpha\alpha$ (3). Consulte el documento de <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica) o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHC para: Principio del procedimiento, Material necesario, pero no suministrado, Almacenamiento, Preparación de las muestras, Procedimiento de tinción, Control de calidad, Solución de problemas, Interpretación de la tinción, Limitaciones generales.
Reactivo suministrado	Anticuerpo monoclonal de ratón suministrado en forma líquida como sobrenadante de cultivo celular, dializado contra 0,05 mol/l de Tris/HCl, pH 7,2, y con 15 mmol/l de NaCl. <u>Clon:</u> C8/144B (1). <u>Isótipo:</u> IgG1, kappa. <u>Concentración de IgG de ratón:</u> Consulte la etiqueta del vial. La concentración de proteína puede variar de un lote a otro, pero este cambio no afecta a la dilución óptima de uso. El título de cada lote se compara y ajusta mediante un lote de referencia para asegurar que el resultado de la tinción inmunohistoquímica sea consistente entre los distintos lotes.
Inmunógeno	Péptido sintético correspondiente a los 13 aminoácidos C-terminal del dominio citoplasmático de la CD8α humana unida a la troglobulina (1).
Especificidad	El análisis SDS-PAGE de inmunoprecipitados formados entre lisados de linfoblastos T humanos marcados con ¹²⁵I y el anticuerpo muestra reacción principalmente con un polipéptido de 32 kDa que corresponde a la CD8α (1).
Precauciones	1. Para uso diagnóstico in vitro. 2. Para usuarios profesionales. 3. Este producto contiene azida sódica (NaN₃), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en las que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, lo que formará acumulaciones de azidas metálicas muy explosivas. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas. 4. Al igual que con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deberán aplicarse procedimientos adecuados de manejo. 5. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel. 6. La solución no utilizada debe desecharse de acuerdo a las normativas locales, nacionales y de la UE.
Almacenamiento	Almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad que aparece impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan bajo condiciones distintas de las especificadas, éstas deben ser verificadas por el usuario. No existen signos evidentes que indiquen inestabilidad en este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. Si observa tinciones inesperadas que no puedan atribuirse a las variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha que existe un problema con el anticuerpo, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Dako.
Preparación de la muestra	<u>Cortes de parafina:</u> El anticuerpo puede utilizarse para marcar los cortes de tejido en parafina y fijados en formol o fijador de Bouin (1). Es necesario el pretratamiento de los tejidos desparafinizados con recuperación del epítipo inducida por calor. Para los tejidos fijados en formol, obtendrá resultados óptimos con tampón Tris de 10 mmol/l, tampón EDTA de 1 mmol/l, pH 9,0. Obtendrá resultados menos óptimos con Dako Target Retrieval Solution, n.º de catálogo S1700, o tampón citrato de 10 mmol/l, pH 6,0. El pretratamiento de los tejidos con proteinasa K resultó ser ineficaz. No permita que las secciones de tejido se sequen durante el tratamiento ni durante el procedimiento de tinción inmunohistoquímica siguiente. <u>Cortes congelados y preparaciones de células:</u> El anticuerpo puede utilizarse para marcar los cortes congelados fijados con acetona o las preparaciones de células (1, 2). El usuario debe validar el procedimiento de tinción.

Procedimiento de tinción	Estas solo son pautas orientativas. Las condiciones óptimas pueden variar en función del tipo de muestra y del método de preparación y deberán ser validadas individualmente en cada laboratorio. El rendimiento de este anticuerpo debe ser establecido por parte del usuario si se utiliza con otros sistemas de tinción manual o plataformas automatizadas. <u>Dilución:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, n.º de catálogo M7103, puede utilizarse con un rango de dilución de 1:50-1:100 al aplicarlo en cortes de amígdala humana en parafina y fijados en formol, con una recuperación del epítipo inducida por calor de 20 minutos en tampón Tris de 10 mmol/l, tampón EDTA de 1 mmol/l, pH 9,0, y una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. El control negativo recomendado es Dako Mouse IgG1, n.º de catálogo X0931, diluido a la misma concentración de IgG de ratón que el anticuerpo primario. A menos que se haya establecido la estabilidad del anticuerpo diluido y del control negativo en el procedimiento de tinción propiamente dicho, se recomienda diluir estos reactivos inmediatamente antes de su uso, o bien diluirlos con Dako Antibody Diluent, n.º de catálogo S0809. <u>Control de calidad:</u> Los tejidos de control positivo y negativo, así como el reactivo de control negativo, deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para la muestra del paciente. <u>Visualización:</u> Se recomienda Dako EnVision+ y los kits HRP, por ejemplo, n.º de catálogo K4005. Siga el procedimiento incluido con el kit de visualización seleccionado.
Limitaciones específicas del producto	Este anticuerpo marca la citoqueratina 15 nativa en queratinocitos de la protuberancia del folículo piloso humano y un área aislada de la capa basal de la cubierta exterior de la raíz próxima a la unión del músculo piloerector, sin marcar el resto del folículo piloso (4).
Interpretación de la tinción	Las células marcadas con el anticuerpo por lo general muestran una tinción limitada a la membrana de la célula.
Características de resultados	<u>Tejidos normales:</u> El anticuerpo marca las células T citotóxicas/supresoras en las áreas de células T del bazo y la amígdala, y las células de revestimiento sinusoidal esplénicas (1). En las biopsias colorrectales, el anticuerpo marca las células T citotóxicas/supresoras en el recto, el colon sigmoideo, descendente, transversal, y ascendente, y el ciego (5). <u>Tejidos anormales:</u> En la micosis fungoides, el anticuerpo CD8, junto con el anti-CD4, demostró una relación CD4:CD8 elevada en la epidermis comparada con la proporción en las lesiones inflamatorias (2).