

EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES ASSOCIADES A QUIMIORESISTÈNCIA, MRP-1 I LRP EN CÀNCER DE PRÒSTATA

Neus Bergés,¹ Julio E. Diestra,¹ August Vidal,² Enric Condom,² José Fco. Suárez,³ Ferran Aguiló,³ Ricardo Pérez-Tomás,⁴ Pepita Giménez-Bonafé^{1*}

¹ Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Adreça electrònica: pgimenez@ub.edu.

² Servei d'Anatomia Patològica. Ciutat Sanitària i Universitaria de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

³ Servei d'Urologia. Ciutat Sanitària i Universitaria de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

⁴ Departament de Biologia Cel·lular i Patologia. Facultat de Medicina. Campus de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Resum

El càncer de pròstata (CaP) és un dels càncers amb més incidència i mortalitat en la població masculina. En estadis avançats quan el càncer ja ha metastatitzat i com a últim recurs s'aplica la quimioteràpia, però en molts d'aquests casos al cap d'un temps les drogues utilitzades ja no fan efecte; és el fenomen anomenat *quimioresistència* (QR). La QR està associada a la presència d'unes proteïnes de membrana que actuen com a bombes d'*efflux* de substàncies tòxiques per a la cèl·lula, entre les quals hi ha les drogues utilitzades en els tractaments de quimioteràpia. El present treball s'ha centrat en l'estudi de la proteïna MRP-1, pertanyent a la família de les transportadores ABC, i en la proteïna LRP, pertanyent a la família de les proteïnes *vault*, en la progressió del CaP. Per a realitzar aquests estudi s'ha partit de tumors prostàtics humans en els quals les proteïnes que participen en la QR s'han detectat amb tècniques d'immunohistoquímica i la seva expressió s'ha correlacionat amb l'història clínic dels diferents pacients.

Paraules clau Quimioresistència, càncer de pròstata, MRP-1, LRP.

Abstract

Expression of proteins associated to chemoresistance, mrp-1 and lrp, in prostate cancer. Prostate cancer (CaP) is the most prevalent cancer with high mortality among men. In advanced stages, when the cancer has metastasized, chemotherapy is applied as the last resort, but in most of the cases it fails after a while, because the drugs become ineffective, a phenomenon known as chemoresistance (QR). QR is associated to the presence of some membrane proteins that act as efflux pumps of toxic substances for the cell, and among them drugs used in chemotherapy. The present work is focused on the study of MRP-1 protein, a member of the ABC transporter family, and LRP protein, a "vault" protein, involved in CaP progression. For this study we have used human prostate tumors where proteins associated to QR have been detected by immunohistochemistry and its expression correlated to the clinical stage of the different patients.

Key words chemoresistance, prostate cancer, MRP-1, LRP.

INTRODUCCIÓ

El càncer de pròstata (CaP) és una neoplàsia maligna i invasiva originada a partir de les cèl·lules epitelials de la glàndula prostàtica, i una de les més freqüents en la població masculina. A Espanya és el tercer càncer en freqüència i el segon en mortalitat, i a Catalunya és el

segon en freqüència i el tercer en mortalitat (Fernández *et al.*, 2001). Els primers casos acostumen a aparèixer a partir dels cinquanta anys, i augmenten força a partir del seixanta-cinc anys.

Els sistemes utilitzats per a la detecció precoç del CaP es basen en els nivells de PSA (antigen específic de la pròstata) en sang. Si els valors estan per sobre

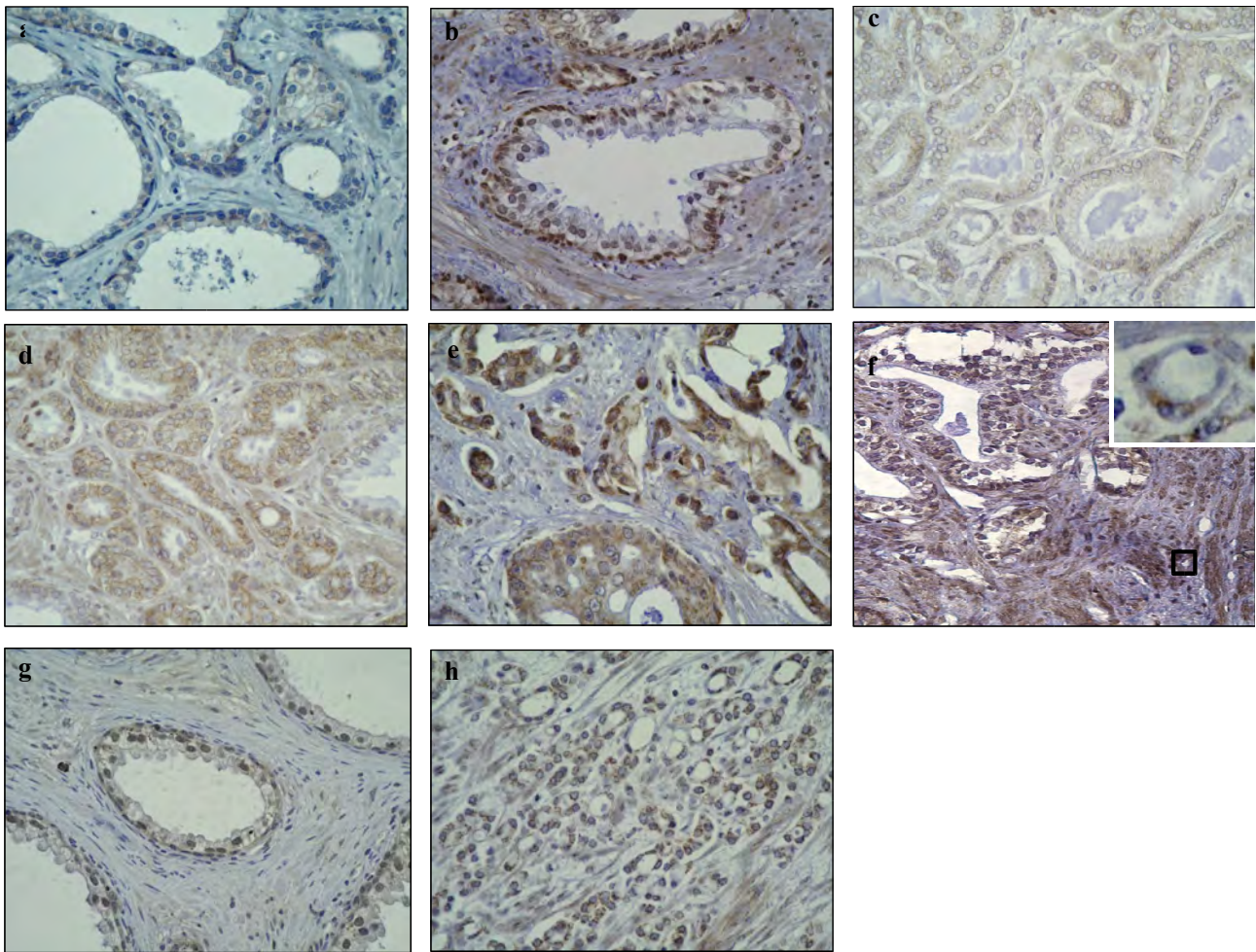


Figura 1 Detecció de MRP-1 en CaP. Amb l'anticòs MRPr1: *a*) teixit normal de pròstata, *b*) hiperplàsia benigna. Estadis progressius de càncer: *c*) grau Gleason 4, *d*) grau Gleason 6, *e*) grau Gleason 7, *f*) grau Gleason 9. Amb l'anticòs MRPm5: *g*) hiperplàsia benigna, *h*) grau Gleason 3.

de 4 ng/ml augmenten les possibilitats de tenir CaP. Un altre mètode és el tacte rectal, en el qual el metge palpa qualsevol irregularitat de la pròstata. Quan les proves anteriors són positives, es fa una biòpsia per a determinar si realment hi ha o no càncer.

Si s'ha trobat un càncer localitzat i sense metastasi es realitza una prostatectomia radical o criocirurgia. Si el tumor és de baix grau i confinat a la pròstata o disseminat a teixits veïns, s'aplica la radioteràpia. Si el tumor ja ha metastatitzat s'aplica la teràpia hormonal, consistent en la supressió d'andrògens, de manera que el càncer es redueix, ja que moltes de les cèl·lules canceroses prostàtiques que depenen dels andrògens per a sobreviure entren en apoptosi quan els en manquen. Però hi ha cèl·lules que sobreviuen indiferents a l'absència d'andrògens; aquestes cèl·lules han adquirit un fenotip d'independència als andrògens, és a dir, el tumor continuarà creixent. En aquests casos i com a últim recurs, s'aplica la quimioteràpia, amb què pacient és tractat amb drogues amb la finalitat d'eliminar

les cèl·lules canceroses independents als andrògens. Al principi fan el seu efecte, però en molts casos el pacient adquireix el fenotip de quimioresistència (QR), en què les cèl·lules no moren en presència de drogues. El fenomen de QR està relacionat amb la presència d'unes proteïnes de membrana que actuen com a bombes d'*efflux* de substàncies tòxiques per a la cèl·lula, entre les quals les drogues utilitzades per als tractaments de quimioteràpia (Gimenez-Bonafé *et al.*, 2004; Gottesman *et al.*, 2002).

S'han trobat diferents molècules implicades en QR, entre les quals s'inclouen membres de la família de proteïnes *ATP-binding cassette (ABC) transporters* (Borst *et al.*, 2002). Aquestes proteïnes es troben en teixits normals i estan involucrades en el transport de diferents substrats endògens, amb funcions de detoxificació en fetge, ronyó o tracte gastrointestinal; i funcions de protecció, amb la regulació de la permeabilitat del sistema nerviós central, testicles o placenta.

Dins la família de transportadors ABC es troben les

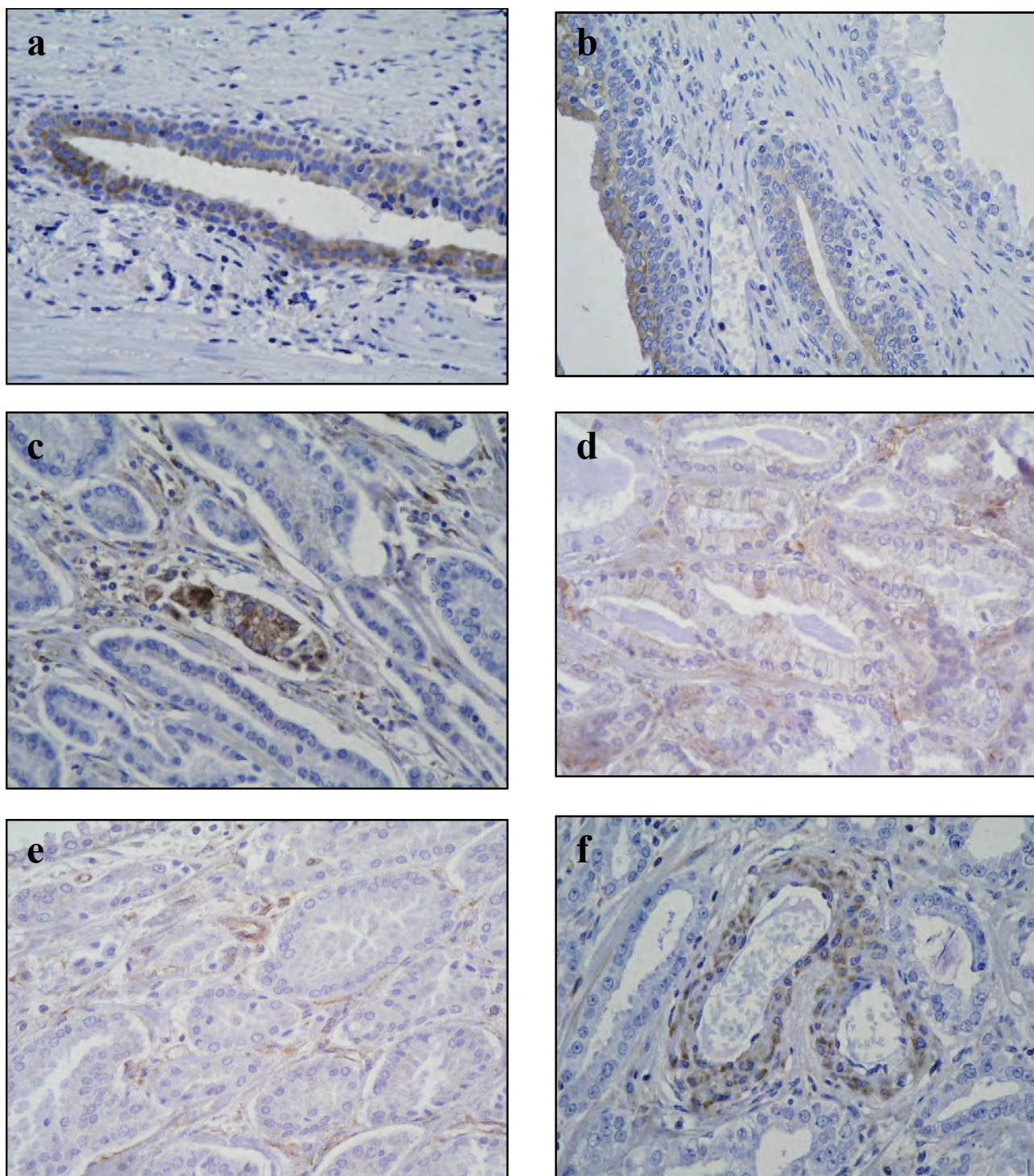


Figura 2 Detecció de LRP en CaP. *a-b*) hiperplàsia benigna, *c-d*) grau Gleason 6, *e*) grau Gleason 7, *f*) grau Gleason 9.

proteïnes associades a resistència múltiple, les MRP (Leslie *et al.*, 2001). El present treball se centra en el membre MRP-1, proteïna àmpliament distribuïda, responsable del transport de gran quantitat de drogues carregades negativament o neutres, conjugades amb glutatió, sulfat o glucoronat, i que s'ha trobat associada

a QR en leucèmies, càncer d'esòfag, de cèl·lules no petites de pulmó.

Una altra proteïna relacionada amb la QR, no pertanyent a la família de les proteïnes transportadores ABC és la LRP (*lung resistance-related protein*) (Diestra *et al.*, 2003), descrita com la *major vault protein* en humans. És una ribonucleoproteïna present en totes les

cèl·lules eucariotes en citoplasma i membrana cel·lular, involucrada en el transport de diversos substrats. Fou descoberta en càncer de cèl·lules no petites de pulmó, i també s'ha vist associada a QR en càncer de mama, ovari, testicle i pròstata (Zurita *et al.*, 2003).

En càncer de pròstata no es coneixen ben bé les proteïnes involucrades en QR. Diferents membres de la família MRP s'han trobat expressats en pròstata tant en línies cel·lulars (Van Brussel *et al.*, 1999) com en tumors procedents de pacients en diferent estat de progressió de la malaltia (Grau Gleason). MRP-1 s'ha trobat sobreexpressada i amb un increment significatiu al llarg de la progressió del CaP (Van Brussel *et al.*, 2003). La LRP també s'ha trobat sobreexpressada en càncers hormonoindependents disseminats (Van Brussel *et al.*, 2001).

L'objectiu del nostre treball s'ha centrat en l'estudi de l'expressió de les proteïnes MRP1 i LRP en CaP, per a poder trobar una relació entre la seva expressió i la progressió del càncer. Hem estudiat la seva expressió en hiperplàsia benigna i en diferents estats de malignitat.

Grau Gleason	G4	G6	G7	G8-9
PSA	6,8	8,13	8,9	14,65
recidiva	0%	66%	50%	50%
marcatge MRP-1	+	++	+++	++++
marcatge LRP	no det.	+++	-	-
nombre pacients	1	2	2	2

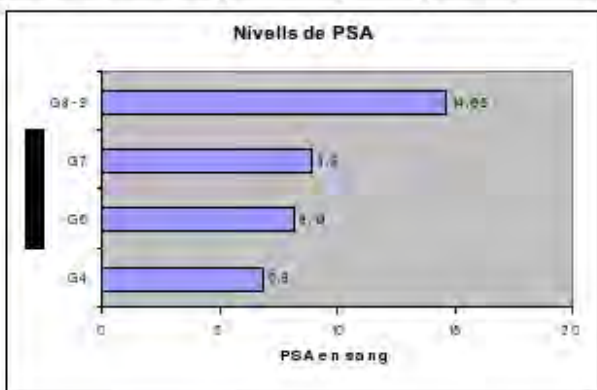


Figura 3 Correlació entre l'estat clínic del pacient i els resultats d'immunohistoquímica: a) nivells de PSA expressats en ng/ml, b) quantificació de l'expressió de MRP-1 i LRP *versus* la recidivitat del pacient.

MATERIAL I MÈTODES

Aquest estudi s'ha realitzat amb tumors parafinats de pacients procedents del Banc de Tumors del Servei d'Anatomia Patològica de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Per a la detecció de les proteïnes associades a QR, MRP1 i LRP s'han realitzat immunohistoquímiques, amb els anticossos monoclonals MRPr1 i LRP, respectivament, cedits pels Drs. R. Scheper i G. Scheffer del Free University Hospital d'Holanda. De tots els pacients s'han fet controls negatius utilitzant com a anticòs primari una IgG irrelevant.

A partir dels blocs de teixit parafinat, es feren talls histològics de 4 µm que es muntaren en portaobjectes tractats amb poly-L-lisina i assecats a l'estufa a 37° C tota la nit. Les làmines es desparafinaren en xilol i rehidrataren en un gradient d'alcohols. La peroxidasa endògena es bloquejà amb un 3 % de H₂O₂ en aigua destil·lada i a fosques durant 10 min, procedit d'un rentat de les làmines en aigua destil·lada. Seguidament, per a poder exposar els epítops de la proteïna a estudiar, es procedí a fer un desemmascarament amb citrat sòdic 0,1 M a pH 6,0 a l'olla a pressió. Les làmines es deixaren refredar a temperatura ambient i es rentaren amb aigua destil·lada i PBS (5 min en cada bany). Seguidament les unions inespecífiques es bloquejaren incubant amb *normal rabbit serum* (NRS) (dilució 1:50) durant 30 min. Després s'eliminà lleugerament l'NRS i es procedí a la col·locació de l'anticòs primari MRPr1 (dilució 1:50) per a MRP1 i LRP (1:100) per a LRP i per als controls negatius IgG (1:100), per a deixar-los incubant a 4° C durant tota la nit en una cambra humida. Després es rentaren en PBS 0,2 % Tritó 100× i dos cops en PBS (5 min/bany), i es procedí a la tinció amb un mètode d'immunoperoxidasa biotina-estreptavidina, incubant a temperatura ambient amb l'anticòs secundari de conill contra rata (1:100) per a MRP1 i de conill contra ratolí (1:150) per a LRP conjugats amb biotina durant 60 min i seguidament amb peroxidasa de rave conjugada amb estreptavidina (1:500) durant 60 min. Les làmines es rentaren amb PBS i es revelaren amb DAB (diaminobencidina). Finalment, totes les làmines foren contrastades amb hematoxilina, deshidratades i muntades amb DPX.

Les observacions han estat realitzades en un microscòpi Olympus BX51, amb un objectiu de 40× i les fotografies fetes a 400× amb una càmera Camedia C5050.

RESULTATS

Hem partit de vuit pacients de l'Hospital Universitari de Bellvitge, amb càncer de pròstata localitzat. D'aquests pacients hem fet immunohistoquímiques per a MRP-1 utilitzant dos anticossos contra dos epítops diferents, el MRPr1 situat a l'extrem N-terminal i el MRPm5 a l'extrem C-terminal; ambdós reconeixen epítops interns d'MRP-1. També hem detectat la proteïna LRP amb l'anticòs LRP, i en aquest cas només s'han utilitzat sis pacients.

Pel que respecta a les immunohistoquímiques realitzades per a MRP-1, l'anticòs que millor resultat ha donat és el MRPr1. En el teixit prostàtic normal, s'observa una tinció tènue i difusa de membrana, i una tinció difusa i granular de citoplasma (vegeu la figura 1a). En el cas de la hiperplàsia benigna (HB) s'observa una tinció molt forta de les cèl·lules basals, i en cèl·lules acinars s'observa tinció de membrana i una tinció de citoplasma granular més forta respecte el teixit normal de pròstata; a més hi ha tinció paranuclear (vegeu la figura 1b).

Els primers estadis de CaP es caracteritzen per una pèrdua de les cèl·lules basals, el nucli és molt més actiu, es fa més gran i apareix nucleol. A mesura que el CaP avança hi ha una desestructuració de les glàndules prostàtiques. En un estadi poc avançat del càncer (Gleason 4) s'observa un clar increment en la intensitat de la tinció en citoplasma respecte del teixit normal i HB, però no pel que fa a la tinció de membrana (vegeu la figura 1c). A mesura que el càncer progressa, paral·lelament amb la desestructuració, s'observa un augment en la intensitat del marcatge granular de citoplasma i paranuclear, mentre el marcatge de membrana no canvia (vegeu la figura 1c-f). Un índex d'estadis avançats de CaP és l'aparició de les cèl·lules d'anell de segell, cèl·lules amb un vacúol molt gran que exerceix una pressió sobre el nucli desplaçant-lo cap a un costat i fent que el citoplasma quedi molt reduït (vegeu el detall de la figura 1f). Amb l'anticòs MRPm5 en zones hiperplàsiques s'observa tinció granular de citoplasma, mentre que en les zones de càncer el marcatge per a tots els casos de CaP és negatiu, exceptuant un pacient que presenta càncer poc avançat (Gleason 3) on s'observa tinció nuclear.

Els resultats obtinguts en les immunohistoquímiques realitzades per a detectar LRP, han estat negatius en zones hiperplàsiques i en zones de càncer per a quatre dels sis pacients estudiats. El marcatge positiu obtingut en els altres dos pacients ha estat focalitzat, amb una tinció granular de citoplasma (vegeu la figura 2c) i de membrana tènue (vegeu la figura 2d). Totes les glàndules atrofiques han donat marcatge positiu per a LRP i s'ha trobat una forta tinció granular citoplasmà-

tica. També s'ha trobat marcatge positiu en les cèl·lules endotelials dels vasos i en múscul esquelètic estriat, estructures que han servit com a control positiu per a l'anticòs.

Discussió

El CaP és mortal quan no s'ha detectat a temps, s'ha donat metàstasi i les cèl·lules canceroses no responen als tractaments de quimioteràpia aplicats. Part d'aquesta falta de resposta a les drogues aplicades és deguda a l'aparició de la QR, associada a la presència de proteïnes de membrana que funcionen com a bombes d'*efflux* de diferents substrats, entre els quals es troben les drogues aplicades en quimioteràpia.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de l'expressió de les proteïnes MRP-1 i LRP, associades al fenotip de QR en d'altres càncers. Ha estat un estudi preliminar en el qual només s'han utilitzat vuit pacients, de tal manera que els resultats obtinguts són la base per a un estudi posterior amb un nombre de pacients més gran ($n = 60$), on els resultats seran estadísticament significatius.

Pel que respecta a MRP-1, s'ha trobat expressada en la pròstata normal en baixes quantitats, i a la bibliografia s'ha descrit que MRP-1 està àmpliament distribuïda amb funció protectora destoxificant. Tant en HB com en CaP s'ha detectat MRP-1, però en diferent localització cel·lular. En el cas de la HB MRP-1 es troba en la membrana citoplasmàtica i en poca quantitat en el citoplasma, mentre que en CaP la localització és inversa, i es troba una tinció granular que s'incrementa gradualment amb la progressió i apareix una tinció paranuclear. Una possible explicació és que la proteïna incrementi la seva síntesi amb l'avenç del CaP i s'acumuli en el reticle endoplasmàtic, d'aquí la localització paranuclear, l'aparell de Golgi, i vesícules d'exocitosi; d'aquí la tinció granular que s'observa en el citoplasma. S'ha descrit que en determinades condicions i depenent del tipus cel·lular, MRP-1 pot estar localitzada a la membrana de les vesícules citoplasmàtiques amb la funció de segrestar la droga i acumular-la dins la vesícula per evitar l'acció de toxicitat. Aquest fet podria estar relacionat amb l'elevada expressió observada en vesícules citoplasmàtiques. També estaria correlacionat amb una menor localització a la membrana citoplasmàtica, ja que la cel·lula no necessitaria tanta activitat d'*efflux*, en no haver-hi droga lliure a l'interior de la cèl·lula. En el cas de la HB, la presència de MRP-1 a la membrana citoplasmàtica tindria la mateixa funció destoxificadora que en la pròstata normal, i el seu increment respecte a la pròstata normal es podria explicar per l'alteració en l'activitat de les cèl·lules hiperplàsiques (augment de la traducció). Cu-

riosa en HB s'ha trobat marcatge nuclear de les cèl·lules basals, i en un cas de CaP poc avançat també s'ha vist tinció nuclear (resultats no mostrats), però de cèl·lules acinars (les cèl·lules basals s'han perdut). Aquests últims són resultats en els quals cal aprofundir.

Una altra proteïna associada a QR és la LRP. Aquesta proteïna, a diferència de MRP-1, es troba bàsicament localitzada en vesícules citoplasmàtiques i una petita proporció als porus nuclears. Dels sis pacients utilitzats per a fer les immunohistoquímiques, quatre han donat negatiu en càncer i els altres dos han donat una positivitat focal tant en membrana com granular citoplasmàtica. Les glàndules atròfiques, tant les presents en la HB com en càncer, han donat un marcatge positiu. Utilitzar sis pacients no és significatiu per a afirmar que LRP estigui sobreexpressada en càncer, tot i que representi un 33 % del total, Van Brussel *et al.* (2001) en un mostreig de dinou pacients obtenen un 32 % d'expressió de LRP en citoplasma, resultats similars als obtinguts en el present treball. Cal concloure que per a arribar a resultats estadísticament significatius cal agafar una representació més àmplia.

La QR és un fenotip no solament degut a una proteïna, sinó a un conjunt de proteïnes. Si es té en compte només l'expressió d'MRP-1 i segons els nivells de PSA dels pacients en el moment de fer la prostatectomia radical, es veu que hi ha un increment dels nivells de PSA, com s'esperava, i també del marcatge d'MRP-1, però no hi ha una correlació entre la recidivitat, que és del 50 %, i l'augment de l'expressió de MRP-1. Ara bé, quan s'estudia conjuntament l'expressió positiva de MRP-1 i LRP, s'observa que en el cas de tres pacients amb Gleason 6, hi ha un 66 % de recidivitat (vegeu la figura 3), és a dir, un nombre superior de pacients ha regenerat el tumor. L'expressió conjunta d'MRP-1 i LRP podria estar relacionada amb la reaparició del càncer. Per a aquest cas (Gleason 6) sí que s'ha trobat una correlació entre l'expressió conjunta de dues proteïnes associades a QR, MRP-1 i LRP i la recidivitat dels pacients.

Els resultats mostrats en aquest treball són molt preliminars. S'ha utilitzat un nombre petit de mostres (vuit pacients totals), de manera que no es poden treure conclusions determinants. S'ha vist, però, que a mesura que el CaP progressa hi ha sobreexpressió de la proteïna MRP-1, i que la seva localització no és solament a la membrana citoplasmàtica, sinó que també es troba dintre del citoplasma en compartiments vesiculars. S'ha de realitzar un estudi més profund de la localització d'MRP-1 (colocalització d'MRP-1 amb proteïnes específiques de vesícules), i conèixer el significat d'aquesta localització en CaP (paper en

la quimioresistència). Utilitzant un nombre major de pacients es podrà determinar si existeix una correlació entre l'expressió de diferents proteïnes transportadores de drogues, i així es podrà establir una relació entre l'expressió conjunta d'aquestes proteïnes i l'aparició *de novo* del càncer en el pacient.

AGRAÏMENTS

Donem les gràcies al Dr. Manel Chiva Royo (BMC-2002-04081-002-02) i al Dr. Jordi Bermúdez (BFI2003-02539; HU02-22) pel seu suport incondicional, i a la Dra. Lourdes Carbonell pels seus consells.

BIBLIOGRAFIA

- BORST, P.; OUDE ELFERINK, R. (2002). «Mammalian ABC transporters in health and disease». *Annual Reviews Biochemistry*, 71:537-592.
- DIESTRA, J. E. [*et al.*](2003). «Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein, and lung resistance-related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications». *J. Urology*, 170:1383-1387.
- FERNÁNDEZ, E. [*et al.*](2001). «Evolución de la mortalidad por cáncer en Cataluña (1975-1998)». *Med. Clin. (Bar.)*, 116:605-609.
- GIMÉNEZ-BONAFÉ, P. [*et al.*](2004). «YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-Glycoprotein expression». *The Prostate*, 59(3):337-49.
- GOTTESMAN, M. [*et al.*](2002). «Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters». *Nature reviews, cancer*, 2:48-58.
- LESLIE, E. [*et al.*](2001). «Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters». *Toxicology*, 167:3-23.
- VAN BRUSSEL, J.; MICKISH, G. (2003). «Multidrug resistance in prostate cancer». *Onkologie*, 23:175-181.
- VAN BRUSSEL, J. [*et al.*](2001). «Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer». *The Journal of Urology*, 165:130-135.
- (1999). «Chemosensitivity of Prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins». *European Journal of Cancer*, 35:664-671.
- ZURITA, A. J.; DIESTRA, J. E. [*et al.*](2003). «Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours». *Br. J. Cancer*, 88:879-886.