

Expresión inmunohistoquímica de la proteína de multirresistencia a drogas (gp-170) en biopsias de tejido mamario humano normal y tumoral. Su potencial como marcador pronóstico

Angel R. Villasmil-Colina¹, Lorena Atencio-Bracho² y Nola Montiel-Ocando^{1*}

¹Laboratorio de Métodos Inmunológicos, ²Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Recibido: 05-05-11 Aceptado: 31-01-12

Resumen

La sobreexpresión de gp-170 es el mayor determinante de quimiorresistencia en tumores a muchos antineoplásicos. Detectar su expresión radica en asociación de altos niveles de la misma y respuesta adversa al tratamiento. Este trabajo determinó la expresión de gp-170 en 28 biopsias equitativas de tejido mamario tumoral y normal, utilizando la técnica inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales (AcMo) C219 y C494. El primero evidenció 7,14% en expresión de gp-170 tanto en muestras Grado II y grupo histológico con cambios post-terapia, para una positividad de 14,28%; Con el segundo, se obtuvo 57,14% de positividad, evidenciando mayor especificidad y sensibilidad en tumores Grados II y III, y cambios post-terapia, indicando correlación positiva con grado de malignidad. Las biopsias de mama normal resultaron negativas al usar ambos anticuerpos. El análisis estadístico de ambos anticuerpos, mediante la prueba exacta de Fisher, fue significativa ($p < 0,023$), el test Spearman reportó moderada correlación ($r_s = 0,44$), y la prueba Wilcoxon para detección con el AcMo C494 fue $p = 0,043$. No hubo asociación entre expresión de la proteína y la edad ($r_{s_{C219}} = 0,1404$ y $r_{s_{C494}} = -0,1983$). Esto evidencia la necesidad de implementar metodologías para analizar expresión de gp-170 para ser potencialmente utilizada como marcador pronóstico

Palabras clave: gp-170, mdr 1, cáncer de mama, multirresistencia.

Immunohistochemical protein expression of multidrug resistance to drugs (gp-170) in biopsies of normal human breast tissue and tumor. Its potential as a prognostic marker

Abstract

The over-expression of gp-170 is the mayor determinant of chemorresistance in tumors to a lot of antineoplastic agents. To detect its expression, is necessary to observe an association between high levels of the same and an adverse answer to the treatment. In this paper, the expression

* Autor para la correspondencia: nola.montiel@gmail.com

of gp-170 was determined in 28 biopsies, equally distributed in malignant pathology and normal breast tissue, by using the technique of immunohistochemistry with the monoclonal antibodies C219 and C494. The first, showed 7.14% of expression of gp-170 in degree of differentiation II samples and histological group with post-therapy changes, by a total positivity of 14.28%; the second one, obtained 57.14% of positivity, demonstrating greater specificity and sensitivity in tumors degrees II, III and changes post-therapy, indicating a positive correlation with the malignancy degree. The biopsies of normal breast tissue were negative with both antibodies. The statistical analysis of both monoclonals by Fisher's Exact test was significant ($p < 0,023$), Spearman tests reported a moderate correlation ($r_s = 0,44$) and the test of Wilcoxon for the detection with C494 was $p = 0.043$. There was not an association between the expression of the protein with the age (r_s C219= 0,1404 and r_s C494= -0,1983). This evidences the need to implement methodologies for the analysis of expression of gp-170 to be used as potentially prognosis marker.

Key words: gp-170, mdr 1, breast cancer, multiresistance.

Introducción

El Cáncer de Mama (CaM), es el tumor más frecuente en los países desarrollados y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, corresponde al 10,9% de un estimado de 1.38 millones de casos diagnosticados en el 2008 a nivel mundial (1) y aproximadamente 460.000 mujeres murieron por cáncer de mama en ese mismo año (2); afectando una de cada once en el mundo occidental y provocando alrededor del 20% de las muertes por cáncer en las mismas. En Venezuela la prevalencia del CaM entre 1998 y 2002 fue la más alta en relación a otros tipos de cáncer (3).

La quimioterapia es el tratamiento más utilizado en los diferentes estadios de esta enfermedad. Cuando la cirugía no es totalmente exitosa, como en el CaM localmente avanzado, la quimioterapia neoadyuvante logra una alta tasa de remisión de 70-90%; cuando se desarrollan metástasis distantes, la primera instancia de combinación de quimioterapia es efectiva entre 50-70% de respuesta, la misma declina en forma significativa como resultado de la quimiorresistencia en 20-30%, en los subsecuentes regímenes de quimioterapia; estos pacientes, eventualmente mueren por presentar multiresistencia a drogas (MDR) (4), a una amplia variedad de agentes anticancerosos, en las que

se ha reportado la sobreexpresión de una glicoproteína de 170 kDa (gp-170)(5).

La gp-170 es codificada por el gen mdr1 (6), transcrita y procesada a una forma madura mediante glicosilación, con una masa de 170 kDa, constituida por 1280 residuos de aminoácidos con 12 dominios transmembranales y dos sitios de unión para ATP (7); siendo expresada a niveles basales en algunos tejidos normales humanos (glándula adrenal, riñón, células epiteliales de yeyuno, colon y canaliculos biliares); juega un rol importante en procesos de excreción celular (8). Posee la capacidad de disminuir la concentración intracelular de una gran variedad de macromoléculas, relacionadas o no estructuralmente (9).

En tumores malignos resistentes a quimioterapia, se ha demostrado ampliamente la expresión del gen mdr1. Así, la expresión intrínseca del gen mdr1 es encontrada en cánceres derivados de riñón, hígado, páncreas, glándula adrenal (8,10); otros cánceres presentan altos niveles de la proteína y frecuentemente sus tejidos de origen no lo expresan a niveles fácilmente detectables (10).

En el CaM la expresión incrementada de gp-170 surge durante el tratamiento o después del mismo (11); se presume que algunas células gp170 positivas presentes al

inicio de la terapia, sobreviven a la quimioterapia, haciéndose quimiorresistentes, reportándose niveles altos de gp-170 con fenotipo metastásico en células cancerosas de mama, constituyendo un problema crítico en este grupo de pacientes (12).

La baja expresión de gp-170 ha sido asociada a un buen pronóstico, de allí su aplicabilidad como factor predictivo de la respuesta a la quimioterapia en las pacientes con CaM, y marcador de supervivencia, motivando la utilización quimiomoduladora de la actividad de gp170 *in vivo* (13).

Según ciertas investigaciones, se ha reportado niveles de gp-170 en cáncer de mama con un porcentaje entre 40 a 60%, detectados a través de la técnica inmunohistoquímica (14), mientras que otros investigadores reportan aumento de la expresión de 9,1% a 63,6% después de inducción de quimioterapia (15).

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) anti gp-170 utilizados, reconocen diferentes epitopes de la proteína, y algunos dan reactividad cruzada con otras proteínas presentes en los tejidos; los más ampliamente caracterizados son los AcMo C219 y C494, ambos se unen a epitopes intracitoplasmáticos (16), (figura 1) y son menos sensitivos a cambios conformacionales y efectos del medio ambiente,

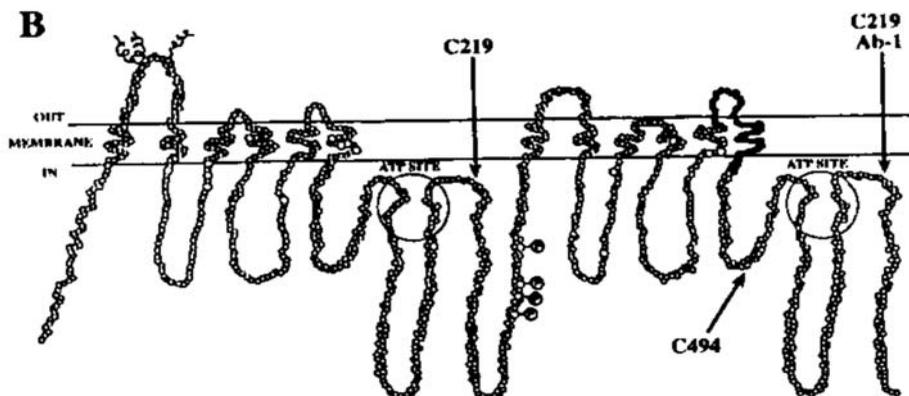
siendo adecuados para el estudio por inmunohistoquímica; su uso en protocolos por separado, tiene el inconveniente de reacciones cruzadas con otras proteínas, dando falsos positivos. El AcMo C219 tiene reacción cruzada con p185 c-erb2 que puede estar presente en muestras de CaM y el AcMo C494 con secuencias peptídicas de la enzima mitocondrial piruvato carboxilasa (17, 18).

En este estudio piloto de la región zuliana, se determinó la expresión de la gp-170 en muestras de tejido mamario normal y con patología maligna de mama en pacientes femeninas, mediante la aplicación de la técnica inmunohistoquímica (19), utilizando los AcMo C219 y C494 para su potencial uso como marcadores de pronóstico en CaM.

Materiales y métodos

Pacientes

Se estudiaron veintiocho (n=28) pacientes de sexo femenino con edades comprendidas entre 31 y 75 años; catorce [14] presentando patología primaria de mama, a quienes se les tomó biopsias de tejido mamario tumoral proveniente de mastectomía parcial o total y sometidas o no a quimioterapia neoadyuvante previa cirugía y como control negativo,



Referencia: Demeule M. y col. Biochemistry 37: 18110-18118, 1998.

Figura 1. Esquema de la molécula gp-170 para mostrar los epitopes que reconocen los anticuerpos monoclonales C219 y C494.

catorce [14] muestras de tejido mamario normal. Se hizo historia clínica, con consentimiento informado y firmado por cada una de las pacientes, provenientes de diferentes hospitales de la localidad de Maracaibo.

Recolección de muestras de tejidos

Las muestras de tejido mamario normal y tumoral obtenidas quirúrgicamente dentro de las primeras 2 horas de intervención, fueron fijadas en formol tamponado al 10% hasta 24 horas, deshidratadas en etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina (20). Se recolectaron como controles positivos de la expresión de gp-170, catorce [14] muestras de tejido renal humano normal, donados por la Unidad de Diálisis y Transplantes y el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), respectivamente.

Procesamiento histológico

Las muestras incluidas en parafina, fueron cortadas en secciones de 5 µm. de espesor mediante un microtomo rotatorio (Shandon INC. USA) y recogidas en láminas portaobjetos previamente tratadas con una solución de poli-L-lisina (Sigma). Dichas secciones fueron desparafinadas e hidratadas para estudio histopatológico utilizando la técnica de coloración con hematoxilina-eosina, y para el estudio inmunohistoquímico fue utilizada la técnica de avidina-biotina peroxidasa, recomendada por Hsu S. y col., 1981(19).

Las muestras de CaM fueron clasificadas histopatológicamente basándose en la nomenclatura acordada por la O.M.S. y la determinación del grado histológico del tumor se utilizó el método de Bloom y Richardson, según el grado de diferenciación celular (21) (tabla 1).

Tabla 1
Caracterización de los casos según la edad, grado de diferenciación y expresión de la gp170

Casos	Edad	Grado Diferenciación*	Expresión de la gp170 **	
			C219	C494
1	35	I	-	-
2	70	Cambios post-terapia	+	++
3	57	II	-	+
4	75	III	-	-
5	47	III	-	+++
6	45	II	++	+++
7	44	II	-	-
8	44	Cambios post-terapia	-	+
9	69	I	-	-
10	57	II	-	++
11	54	II	-	-
12	31	II	-	+++
13	54	II	-	-
14		II	-	+++

*Grado de diferenciación, Método de Bloom y Richardson: I(bien diferenciado), II(moderadamente diferenciado), III(poco diferenciado). Ref: Stemberg S.

Diagnostic Surgical Pathology. Raven Press. New York. 1: 352,1999.

**Grado de inmunotinción: - (0%), +(≤ 10%), ++(≥ 30%), +++(> 30%).

Ref: Soini Y. y col. *J. Clin. Pathol.* 49:470-473: 1996.

Anticuerpos

Como AcMo primarios se utilizaron los clones: C219 y C494 de ratón anti gp170 humano (Lab. Dako) a una dilución de 1/20 y 1/100 respectivamente. Fueron preparados tantos cortes histológicos de tejido mamario tumoral, como cortes de tejidos de mama normal y de riñón humano. El anticuerpo secundario que se utilizó fue el AcMo de caballo anti IgG de ratón (H+L) biotinilado (Lab. Vector) a una dilución de 1/200, dicho anticuerpo tiene un porcentaje de IgG biotinilada de un 98% y de reactividad cruzada con IgM e IgG Humanas de <1%.

Procesamiento inmunohistoquímico

Las secciones de tejido fueron secuencialmente incubadas con suero normal, anticuerpo primario, anticuerpo secundario biotinilado y en una solución de avidina-biotina peroxidasa. Para evidenciar la reacción se utilizó amino-etil-carbazol (AEC), en combinación con H₂O₂ como sustrato de la enzima peroxidasa. Previo al estudio inmunohistoquímico se utilizó la técnica de recuperación antigénica, calentando una solución de buffer citrato 0,1M pH 6.0. Finalmente las secciones de tejido fueron contrastadas con hematoxilina y evaluadas en un microscopio óptico con cámara fotográfica incorporada (Zeiss-Axioscope West Germany).

La reacción inmunohistoquímica se evidenció por un precipitado rojo en los sitios de unión antígeno anticuerpo (19). Los tejidos control positivo y negativo fueron procesados simultáneamente con la muestra. Como control positivo para los anticuerpos contra gp-170 se utilizaron secciones de tejido renal normal; y como control negativo interno del funcionamiento de la técnica el mismo tejido fue incubado sin el anticuerpo primario.

Protocolo

Las secciones de tejido mamario (por duplicado) fueron transferidas a una solución de buffer fosfato salino (PBS), incuba-

das con suero normal durante 20 minutos; y posteriormente con los AcMo C219 (dilución 1/20) y C494 (dilución 1/100) 60 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a aplicar el anticuerpo secundario biotinilado, diluido 1/200 en PBS 60 minutos, seguido por incubación con el complejo de avidina-biotina peroxidasa (Lab. Vector, U.S.A.) 45 minutos; se trataron los cortes de tejido con solución de H₂O₂; y se reveló la reacción con el sustrato amino-etilaminocarbazol (AEC) (Lab. Vector) durante 10-15 minutos hasta obtener una adecuada intensidad de tinción. Finalmente se hizo coloración de contraste con hematoxilina y su montaje con medio acuoso (19).

Al finalizar la Inmunotinción, las láminas se observaron en un microscopio óptico, con objetivos de 10X, 16X y 40X. La estimación del grado de la inmunotinción se realizó según Soini y col 1996 (22) (tabla 1).

Análisis estadístico

La comparación entre los AcMo. C219 y C494 se realizó mediante la prueba Exacta de Fisher; así mismo, la correlación entre ambos anticuerpos monoclonales con el grado de diferenciación histológico y la edad, se analizó utilizando la prueba de correlación de Spearman y la prueba de Wilcoxon. Se consideró significativo una $p < 0,05$. El análisis descriptivo de la edad, fue mediante el promedio y la desviación estándar; para analizar la frecuencias de los casos, se utilizó la distribución porcentual. El programa estadístico empleado fue el Statistix for Windows v.17.0.2.

Resultados

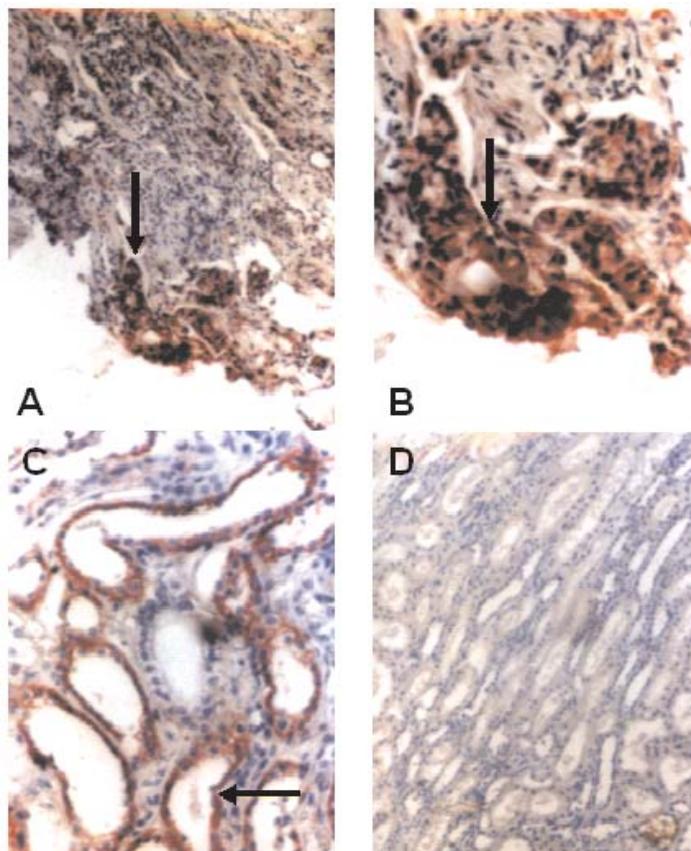
Las catorce [14] muestras de las pacientes bajo el presente estudio con diagnóstico clínico de cáncer de mama, correspondieron al tipo histológico de carcinoma ductal infiltrante (CDI) sin otra especificación según la clasificación histológica modificada de la OMS en 1999 (21), con una edad promedio de 52,462 años. El grado histoló-

gico predominante fue el Grado II (8/14), seguido de una frecuencia equivalente en los Grados I y III (2/14 en cada caso) (tabla 1).

Con el empleo de los AcMo C219 y C494, la inmunotinción predominó a nivel de la membrana plasmática, aunque en algunos cortes se observó en forma difusa en citoplasma (figuras 2 y 3). En relación a la reactividad frente al AcMo C494, el mayor número de casos positivos correspondieron al Grado II y III (6/14), más dos [2] casos de pacientes con cambios post-terapia (8/14) (tabla 1 y figura 2) con una mayor intensi-

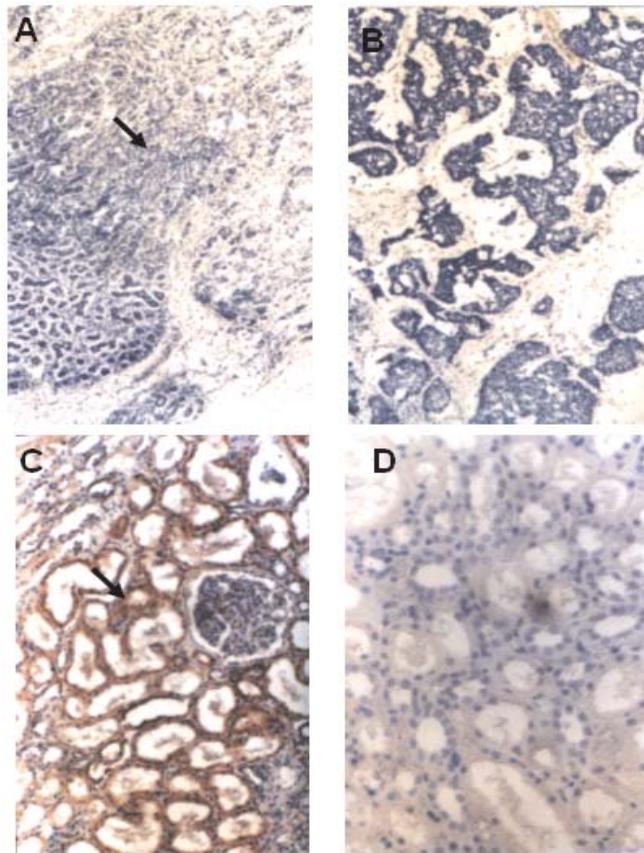
dad (+++). Con el AcMo C219, la reactividad fue menor (+ ó ++) y solo resultaron positivos dos [2] casos (2/14) (tabla 1 y figura 3).

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos con los dos anticuerpos monoclonales, para $n=14$, la prueba exacta de Fisher fue estadísticamente significativo ($p>0,023$); el test de Spearman reportó que el coeficiente de correlación fue moderado ($r_s = 0,44$) (figura 4), presentando para el C494 una distribución normal (0.1167 y -1.7005) y anormal para el C219 (2.4936 y 4.7982); esto hace inferir que el anticuerpo monoclonal



A: Ca ductal infiltrante, Grado III, C494 (+++). 196X
 B: Ca ductal infiltrante, Grado III, C494 (+++). 490X
 C: Tejido renal control C494 (+), 490X
 D: Tejido renal, control interno (-) sin AcMo primario C494 196X

Figura 2. Microfotografía de secciones de cáncer de mama Grado III y tejido renal mostrando la expresión de p170, utilizando el AcMo C494 (técnica inmunohistoquímica).



A: Ca ductal infiltrante Grado II C219(++), se observa cancerización, 196X
 B: Ca ductal infiltrante Grado I, C219 (-) para expresión de gp170, 196X
 C: Tejido renal control C219(+), 196X
 D: Tejido renal, control interno (-), sin AcMo primario C219 490X

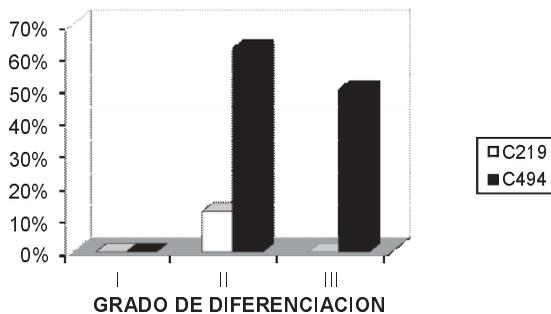
Figura 3. Microfotografía de secciones de cáncer de mama Grados I - II y tejido renal mostrando la expresión de gp170, utilizando el AcMo. C219 (técnica inmunohistoquímica).

C494 resultó más confiable para este estudio. En vista de esto se aplicó la prueba de Wilcoxon, resultando una $p=0,0143$ ($p<0,05$) comprobando que existe diferencia significativa en la detección de la proteína gp-170 entre los dos anticuerpos empleados.

Al correlacionar los resultados obtenidos para la detección de la gp-170 con cada uno de los AcMo comparados con el grado de diferenciación de los tejidos, para C219 ($r_s=0,00$) y para C494 ($r_s=0,3426$), se evidencia que la asociación con este último es mayor que la que se observa con C219 (figura 5).

Al observar las muestras de tejido mamario normal, no se observó inmunotinción tanto a nivel de la membrana plasmática como del citoplasma al utilizar los AcMo C219 y C494, respectivamente.

Por último, al correlacionar los resultados de cada uno de los anticuerpos con la edad, utilizando el test de correlación de Spearman, no hubo asociación entre la expresión de la proteína y la edad ($r_{C219}=0,1404$ y $r_{C494}=-0,1983$).



Ref: Stemberg S. *Diagnostic Surgical Pathology*. Raven Press. New York. 1: 352,1999.

Figura 6. Distribución porcentual del Grado de Inmunotinción Según el Grado de Diferenciación Histológico.

formarse en resistentes a drogas antineoplásicas por presión de selección (8,27), resulta en la ineficacia de la quimioterapia, asociado a la adquisición del fenotipo de multirresistencia a drogas. Determinar la expresión de gp-170 en pacientes con CaM, mediante la técnica inmunohistoquímica, podría ser útil como marcador de supervivencia (15, 23, 24, 27).

Actualmente la evaluación del fenotipo de quimiorresistencia en pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico, no forma parte de los protocolos de rutina para el suministro posterior de drogas antineoplásicas en nuestra región, a pesar de su importancia funcional, es posible que MDR1/gp-170 sea un factor pronóstico independiente en tumores de mama. El conocimiento de la expresión de niveles detectables de la gp-170 podría contribuir a realizar un mejor manejo terapéutico de las pacientes con CaM.

Conclusiones

El grado histológico predominante en la población estudiada fue el Grado II, y la inmunorreactividad obtenida con el AcMo C494 fue significativamente mayor, que la observada con el AcMo C219.

En relación al grado de diferenciación del tumor, el nivel de expresión de la gp170 fué mas alto en las muestras de pacientes con Grado II y III en comparación con el Grado I (bien diferenciado), lo que puede evidenciar una correlación positiva entre la expresión de la proteína con el grado de indiferenciación; de igual manera en las pacientes con cambios post-terapia.

El anticuerpo monoclonal C494 resultó más confiable para este estudio, que el C219, al mostrar una mayor sensibilidad para la detección de la gp170.

Se puede concluir que, no se encontró correlación de los resultados obtenidos de la expresión de la gp170 con relación a la edad.

Se requieren realizar estudios adicionales aumentando la muestra, a fin de validar los resultados obtenidos del presente estudio, y su potencial detección mediante técnica inmunohistoquímica como marcador de pronosis en CaM.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (LUZ), por el cofinanciamiento de este proyecto (CONDES N°1269-98); a la Dra María Elena Vilorio por su asesoría académica y en la evaluación histopatológica de los tejidos; a los médicos oncólogos Dres. Leonardo González y Aulo Ortigoza por su aporte de muestras de cáncer de mama para la realización de este proyecto. A la Unidad de Diálisis y Transplantes y el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), respectivamente, por la donación de las muestras de tejido renal

Referencias bibliográficas

1. FERLAY J., SHIN H-R., BRAY F., FORMAN D., MATHERS C., MAXWELL PARKIN D. *Int J Cancer* 127(12): 2893-2917, 2010.
2. <http://www.who.int/cancer/en> Consultado 21/04/2011.

3. CARRERO N., BETANCOURT L., BERGAMO L. **Rev Venez Oncol** 20 (4):186-191, 2008.
4. BURGER H., FOEKENS J., LOOK M., MEIJER-VAN GELDER M., KLIJN J., WIEMER E., STOTER G., NOOTER K. **Clin Cancer Res** 09: 827-836, 2003.
5. PIWNICA-WORMS D. **Am Soc Clin Onc. Spring 2000 Educational Book**. ASCO Publications and Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 178-84, 2000.
6. TIEN KUO M. **Adv Exp Med Biol** 608:23-30, 2007.
7. http://www.medscape.com/viewarticle/409741_3 Consultado 21/04/2011.
8. GOTTESMAN MM. **Annu Rev Med** 53: 615-27, 2002.
9. MURREN J. **Clin Cancer Res** 8: 633-635, 2002.
10. GOTTESMAN MM., LING V. **Febs Lett.** 580(4): 998-1009, 2005.
11. CORRENTI M., HERRERA O., CAVAZZA M., SALMA N., GUEDEZ N., ARCIA ROMERO F., SUÁREZ R. **Rev Venez Oncol** 10: 4. 149-187, 1998.
12. LINN S., GIACCONE G., VAN DIEST P., BLOKHUIS W., VAN DER VALK P., VAN KALKEN C., KUIPER C., PINEDO H., BAAK J. **Ann Oncol** 6(7):679-685, 1995.
13. HILARY-THOMAS M., HELEN M. **Cancer Cont** 10(2):159-165, 2003.
14. LEHNERT M. **Anticancer Res** 18(3C):2225-2226, 1998.
15. CHINTAMANI J., SINGH JP., MITTAL MK., SAXENA S., BANSAL A., BHATIA A., KULSHRESHTHA P. **World J Surg Oncol** 3:61-70, 2005.
16. DEMEULE M., LAPLANTE A., GERARD F., MURPHI G., WENGER R., BELIVEAU R. **Biochemistry** 37: 18110-18118, 1998.
17. RAO VV., ANTHONY D., PIWNICA-WORN D. **Cancer Res.** 54:1536-1541, 1994.
18. LIU B., SUN D., XIA W., HUNG MC., YU D **J Natl Cancer Inst** 89(20):1524-1529, 1997.
19. HSU S., RAINE L., FANGER H. **J Histochem Cytochem** 29: 77-80, 1981.
20. CORDON C., OBRIEN J., BOCCIA D., CASALS J., BERTINO J., MERALED M. **J Histochem Cytochem** 38: 9. 1277-1287, 1990.
21. STERNBERG S. **Diagnostic Surgical Pathology**. Raven Press. New York, USA. 1: 352, 1999.
22. SOINI Y., VIRKAJARVI N., RAUNIO H., PAAKKO P. **J Clin Pathol** 49: 470- 473, 1996.
23. TROCK B., LEONESSA F., CLARKE R. **J Clin Oncol** 25: 5210-5217, 2007.
24. MICHALAKI V., GENNATAS S., KARVOUNI E., KONDI-PAFITI A., GENNATAS C. **J Clin Oncol** 27: (15S). Abstr. E22206, 2009.
25. FILIPITS M., SUCHOMEL R., DEKAN G., HAIDER K., VALDIMARSSON G., DEPISCH D., PIRKER R. **Clin Cancer Res** 2(7):1231-1237, 1996
26. HEGEWISCH-BECKER S., STAIB F., LONING T., PICHLMEIER U., KROGER N., REY-MANN A., HOSSFELD D. **Ann Oncol** 9(1):85-93, 1998.
27. GONZALEZ-ANGULO A., MORALES-VASQUES F., HORTOBAGYI G. **Adv Exp Med Biol** 608. 1-22. 2007.