

Tesi doctoral presentada per En/Na

Albert SANTAMARIA MARTÍNEZ

amb el títol

**"Identificació, aïllament i caracterització de
cèl.lules mare en models de càncer de pròstata"**

per a l'obtenció del títol de
Doctor per la Universitat de Barcelona

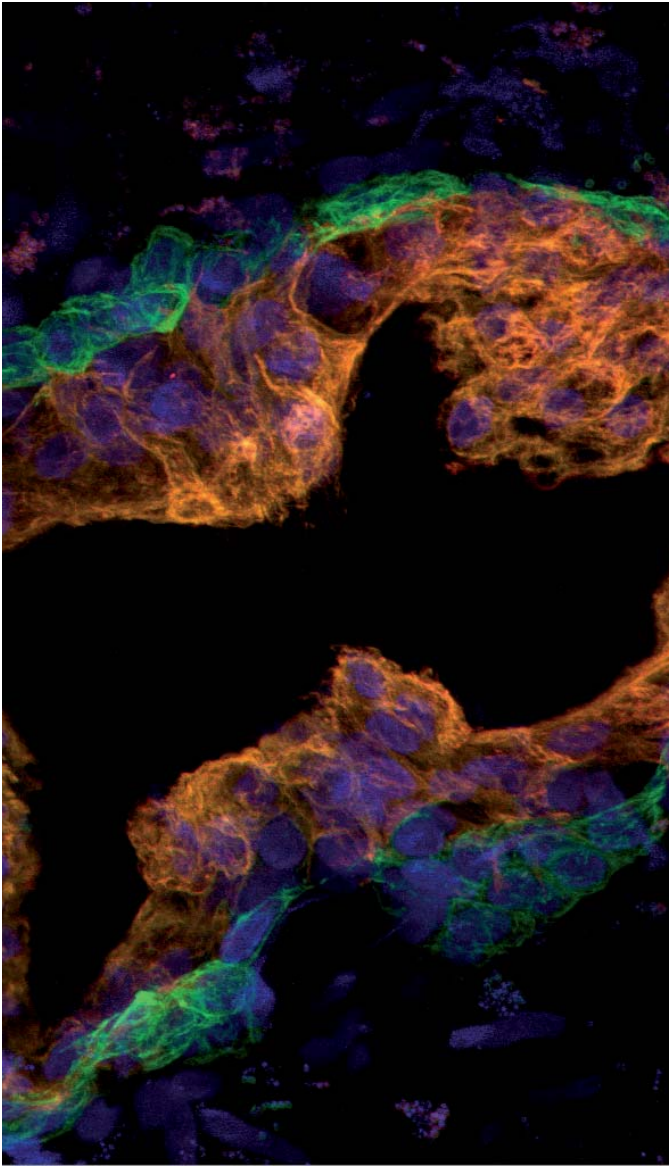
Barcelona, 11 de juny de 2009.

**Facultat de Medicina
Departament de de Biologia Cel.lular,
Immunologia i Neurociències**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

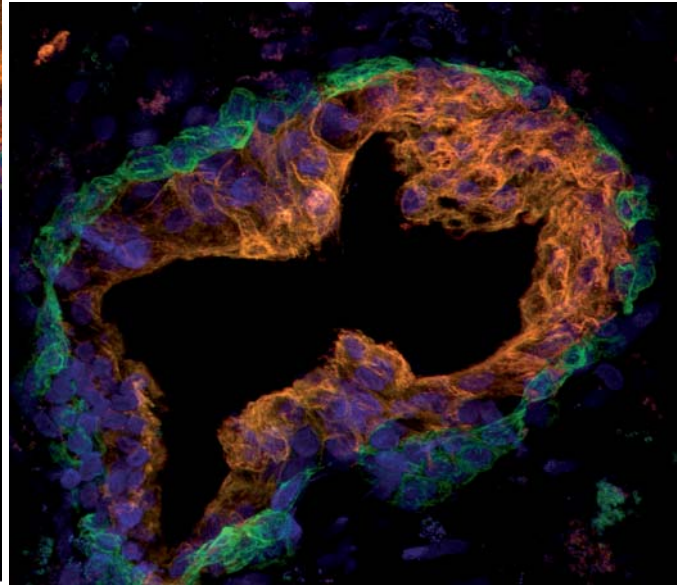




We neglect this subject because positive selection now so rarely occurs at this level in complex metazoans—and for a reason continually emphasized in this chapter: the effectiveness of multicellular organisms in suppressing the differential propagation of subparts as a necessary strategy for maintaining functional integrity, the definitive property of individuality at the organismal level.

This suppression has been so effective, while the consequences of failure remain so devastating, that human organisms have coined a word for the cell lineage's major capacity of escape from this constraint, a name with power to terrify stable human organisms beyond any other threat to integrity and persistence—cancer.

Stephen Jay Gould, *The Structure of Evolutionary Theory*



1. INTRODUCCIÓ

L'ull de l'abisme (Immunohistofluorescència sobre teixit sencer de pròstata humana realitzada per ASM i també coneguda com l'Ull de Sàuron. Captació i reconstrucció tridimensional fetes per MVS, 2004)

1. Introducció

1.1 El càncer de pròstata

1.1.1 Generalitats

El càncer de pròstata és un tipus de càncer de creixement lent i d'estructura heterogènia que es diagnostica generalment en homes d'edat avançada (>50 anys). Representa la segona causa de mort per càncer en els homes dels països occidentals i, excloent el càncer de pell no melanocític, és el tumor més freqüent (19,6%) en els homes a Catalunya (dades del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya). El carcinoma és el tipus més freqüent dels càncers de pròstata, mentre que la resta de tipus signifiquen menys d'un 2% del total.^{1,2}

L'etiologia del càncer de pròstata encara actualment és discutida. S'han proposat diferents hipòtesis sobre el seu origen tot i que, com a càncer, es tracta d'una malaltia multifactorial en què difícilment només hi hagi un factor responsable. Els estudis sobre la seva incidència han dut a la idea que la dieta hi juga un paper important, i que compostos com els fitoestrògens tindrien un paper protector, mentre que la carn i una dieta rica en greixos tindrien l'efecte contrari. El component hereditari del càncer de pròstata no ha pogut ser estudiat d'una manera prou clara, atès el risc tan alt que existeix de patir-lo sense aquest efecte genètic.

El mètode de seguiment i diagnòstic més efectiu és la determinació dels nivells de l'antigen sèric prostàtic (PSA) al sèrum dels homes a partir dels 40 anys, els nivells

normals del qual a la sang oscil·len en el rang de 0-3 ng/ml. Malauradament aquest diagnòstic està lluny de ser perfecte i dona lloc a falsos positius degut a la seva baixa especificitat i també a falsos negatius degut a la seva baixa sensibilitat. Aquests darrers casos podrien ser deguts al fet que la majoria de pacients als quals es fa la prova del PSA presenten uns nivells d'entre 3-10 ng/ml, cosa que desafortunadament no dona massa indicacions sobre el pacient individual. I quant a la baixa especificitat, val a dir que aquests nivells de PSA moderadament elevats també podrien ser causats per altres factors que no fossin el càncer com ara la inflamació o la hiperplàsia benigna de pròstata.

Quan els nivells de PSA són elevats, normalment es practiquen biòpsies i s'examinen histològicament. Bàsicament es fa una anàlisi de l'estat de diferenciació de la biòpsies i se'ls assigna un valor d'acord amb l'anomenat *Gleason Score*, que té una correlació amb la prognosi en cohorts estadístiques grans³ tot i que presenta problemes semblants al del PSA ja que la majoria de pacients diagnosticats tenen *gleasons* de 6-7, i a més, el mostreig poc representatiu desemboca en

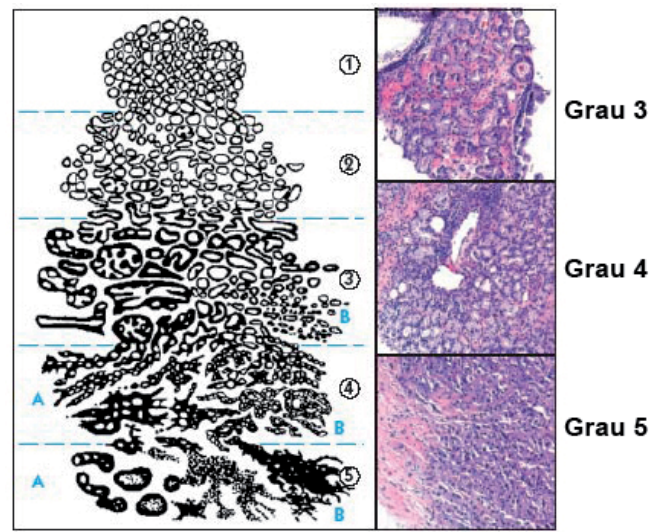


Figura II: Esquema i imatges dels diferents graus de *Gleason* segons l'estadi del tumor.

la determinació inacurada del *Gleason score*. Altres mètodes de diagnòstic inclouen la ressonància magnètica, el tacte rectal i l'escintografia òssia (que no detecta, però, micrometàstasis).

El càncer de pròstata confinat a la pròstata —no invasiu, localitzat exclusivament a la pròstata— es tracta o bé mitjançant cirurgia tot practicant una prostatectomia radical, o bé per radioteràpia, o senzillament es fa un control actiu del pacient. Un cop el càncer de pròstata s'ha estès a altres òrgans (normalment els ossos i els nòduls limfàtics), el tractament és purament pal·liatiu (dels dolors provocats per les metàstasis òssies). La teràpia hormonal amb privació androgènica (castració quirúrgica o química) és efectiva durant un temps limitat —precisament el temps que el tumor roman hormonodependent. Però passat aquest temps el tumor esdevé hormonoindependent —és capaç de créixer en presència de petites quantitats de testosterona a la sang perifèrica— i per tant resistent a aquest tipus de teràpia. Tanmateix, alguns treballs recents demostren que els nivells locals de testosterona dins la pròstata no disminueixen

massa després de la castració, possiblement per una regulació a l'alça de gens que converteixen els andrògens adrenals en testosterona.^{4,5} D'aquesta manera, enzims que estan presents a les cèl·lules tumorals de la pròstata poden convertir els esteroides adrenals en andrògens. A més, l'exèresi del tumor primari no assegura l'eliminació del càncer, atès que les recidives podrien presentar-se a partir de la disseminació primerenca de cèl·lules tumorals disseminades al moll d'os —tema que es discutirà amb més profunditat més endavant.

1.1.2 Mecanismes d'hormonoindpendència

El procés de transició a la independència hormonal és lent i és un dels aspectes més crucials i debatuts del càncer de pròstata, ja que suposa la pèrdua d'efectivitat dels tractaments de quimioteràpia que fan ús de la supressió hormonal. Si bé és cert que les modificacions genètiques, que juguen un paper rellevant en la progressió tumoral també el juguen en aquesta transició,^{6,7} hi ha altres factors implicats com l'epigenètica que

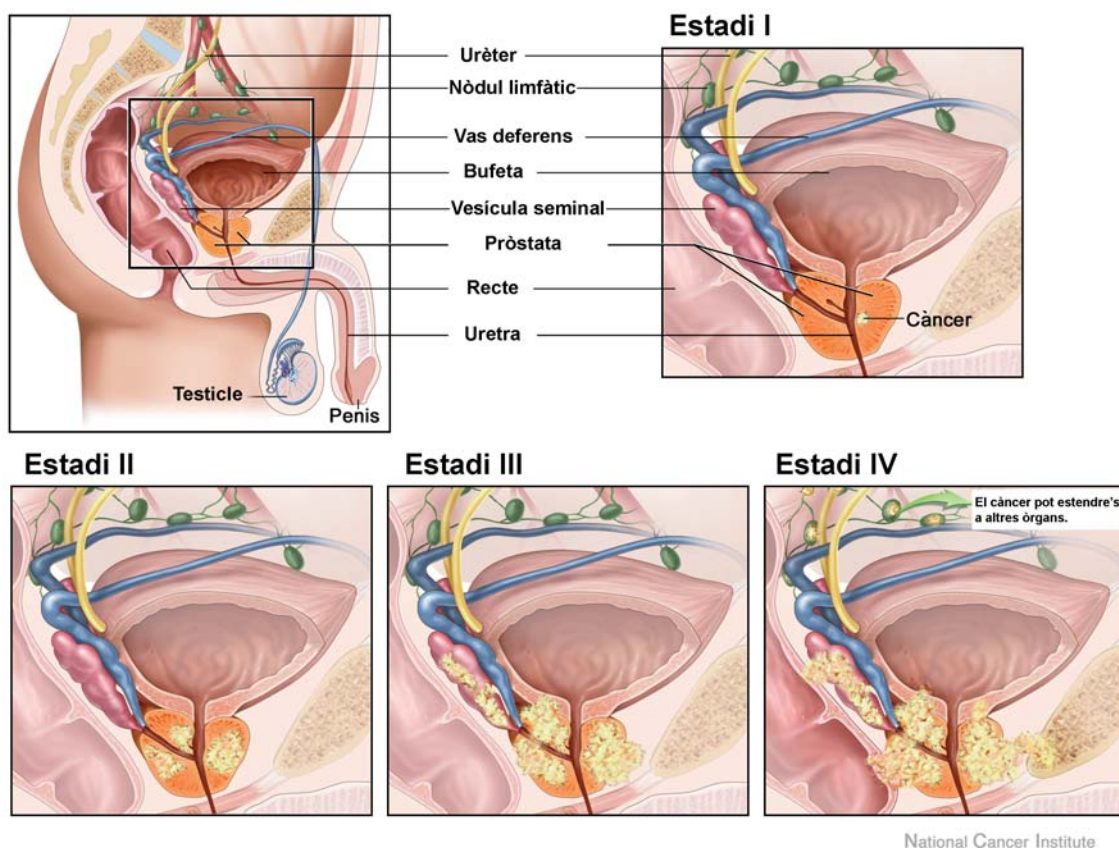


Figura I2: Esquema sobre l'evolució del càncer de pròstata i els seus diferents estadis. (Adaptat de l'NCI)

poden ser tant o més importants. Un exemple d'això és la metilació associada a càncer del promotor del gen de la glutatió-s-transferasa π —que catalitza la detoxificació de diversos compostos, inclosos carcinògens—, que fa que no s'expressi en un 90% dels càncers de pròstata.⁸ Actualment es pensa que aquesta és una de les primeres modificacions genòmiques comunes en el desenvolupament de càncer de pròstata espontani, cosa que situaria a les cèl·lules en una situació més favorable per patir impactes mutacionals que acabessin donant lloc al càncer de pròstata hormonoindependent.^{9,10} De fet, les modificacions epigenètiques que poden comportar l'aparició i progressió del càncer de pròstata,⁹⁻¹² la formació de metàstasis,^{13,14} o la seva evolució cap a l'hormonoindependència¹⁵⁻¹⁷ han estat i són objecte d'estudi.

Diversos treballs sobre el receptor d'andrògens (AR) —probablement el gen més estudiat en càncer de pròstata— han descrit que la presència de mutacions del susdit és molt més freqüent en el càncer de pròstata metastàtic que als tumors primaris.¹⁸ A partir d'aquests estudis, va sorgir la idea que la teràpia amb supressió androgènica provoca una pressió selectiva a la via de senyalització del receptor d'andrògens.¹⁹⁻²² En aquest sentit, si la teràpia antiandrogènica afavoreix l'adquisició de mutacions que donen lloc al càncer de pròstata hormonoindependent, la teràpia de supressió hormonal intermitent pot retardar-ne l'aparició,²³ una qüestió encara en debat.²⁴⁻²⁶

Hom considera cinc possibles mecanismes a través dels quals es pot produir la independència hormonal al càncer de pròstata:²⁷ 1) la via d'hipersensibilitat, deguda a amplificacions del gen de l'AR, un augment de la sensibilitat de l'AR o bé un augment dels nivells d'andrògens; 2) la via promíscua, deguda a mutacions a l'AR que provoquen la seva activació aberrant per altres substrats que no són la testosterona; 3) la via foral·lei, en què l'AR podria ser activat per mecanismes independents de lligand; 4) la via de *bypass*, en què l'acció de l'AR seria sobrepassada per vies alternatives com la de BCL2; i 5) la via de la cèl·lula oculta. En aquesta darrera via, es postula que al tumor ja hi hauria una subpoblació de cèl·lules independents d'andrògens abans de la teràpia.²⁸ Aquest plantejament advoca per la presència d'unes cèl·lules mare transformades, és a dir, cèl·lules mare canceroses, que sobreviurien a la teràpia antiandrogènica, que al seu torn eliminaria només aquelles cèl·lules que responguessin a andrògens, i finalment donarien lloc a un tumor hormonoindependent. En un treball publicat el 1999,²¹ Craft i col·laboradors recolzaven aquesta idea demostrant que un model de càncer de pròstata hormonodependent que ells mateixos van generar hi havia cèl·lules hormonoindependents i que aquestes podien expandir-se clonalment per donar lloc a

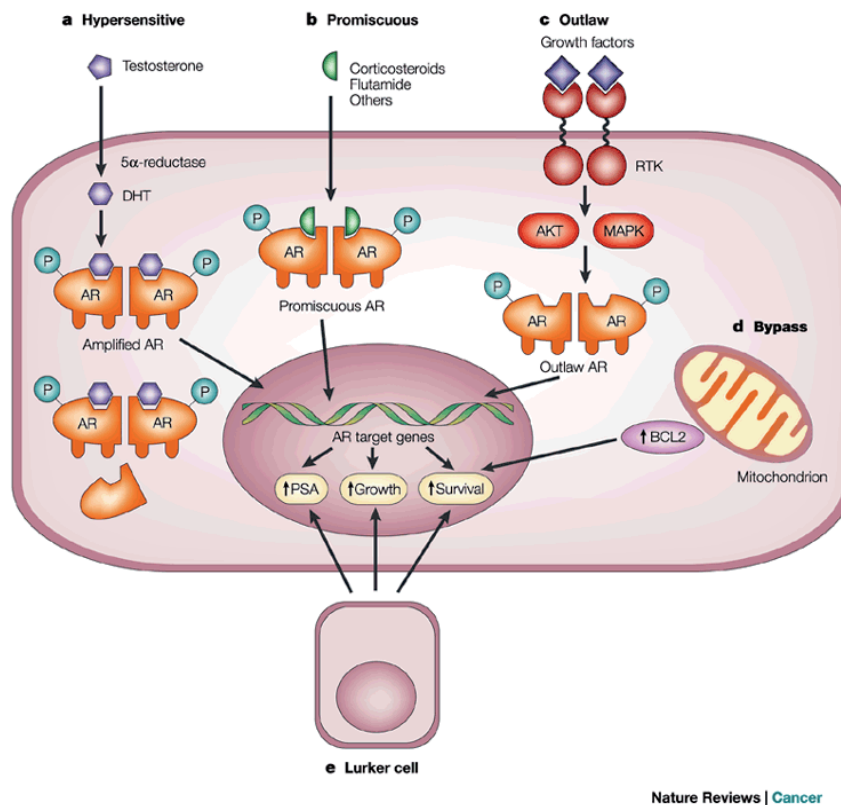


Figura 13: Esquema en què es mostren les 5 diferents vies proposades per a l'hormonoindependència: la hipersensibilitat (a), la promiscua (b), la fora-llei (c), la de *bypass* (d) i la de la cèl·lula oculta (e). (Feldman & Feldman, 2001).

tumors hormonoindependents. Concloïen finalment que la teràpia antiandrogènica podria estar seleccionant aquests subgrups de cèl·lules que són hormonoindependents *ab origine*, amb el consegüent resultat del creixement de tumors hormonoindependents, conclusió a la qual havien arribat també Isaacs i Coffey als anys 80.²⁹

1.1.3 Estroma tumoral

Atès que més del 95% dels càncers de pròstata observats són adenocarcinomes que s'originen a partir de les cèl·lules epitelials glandulars, la major part dels esforços per entendre el càncer de pròstata s'han concentrat en l'estudi de les cèl·lules epitelials. Tanmateix, com s'esdevé en sistemes ecològics més grans, la influència de l'ambient és crucial per al desenvolupament d'individus particulars. En aquest sentit, actualment comença a destacar-se la importància del rol de l'estroma en el desenvolupament i progressió tumors, ja que hi ha proves que indiquen clarament que a mesura que el carcinoma evoluciona, l'estroma pateix canvis associats al tumor, i que aquests canvis poden contribuir o ser decisius en la progressió tumoral. És en aquesta mesura que hom parla de la "cancerització" de l'estroma, pas requerit per a l'evolució del tumor.

L'estroma està compost de diferents tipus cel·lulars, el més abundant dels quals és el múscul llis, que deriva del sinus urogenital embrionari, però que també comprèn fibroblasts, cèl·lules endotelials, pericits i diversos tipus de cèl·lules inflamatòries. Tanmateix, els darrers anys s'ha palesat que l'estroma tumoral, també anomenat estroma reactiu, és diferent de l'estroma normal quant a la seva composició i a l'expressió de factors de creixement, citocines, factors angiogènics i enzims proteolítics, tot i que no sembla presentar alteracions genètiques. Tant és així que el grup de Gerald R. Cunha, especialista i pioner d'aquest camp, va demostrar que un microambient anormal, és a dir, l'estroma canceritzat, pot ser suficient per promoure la transformació maligna de cèl·lules epitelials prostàtiques.^{30,31} Ja als anys 80 havia remarcat la importància de les interaccions estroma-epiteli en el desenvolupament i tumorigènesi de la glàndula prostàtica.³² Mitjançant l'ús de recombinacions tissulars d'epiteli i estroma aïllats, va observar que el factor de creixement de fibroblats (FGF), juga un rol central a l'hora de mitjançar aquestes interaccions epiteli-mesènquima.

Més tard es va observar que el receptor 1 del FGF (FGFR1), que normalment no es troba expressat a l'epiteli benigne prostàtic, està regulat a l'alça en un 40% dels carcinomes de pròstata poc diferenciats.³³ Aquest mateix estudi també descrivia un augment del FGF2 —que s'uneix al FGFR1— a l'estroma del càncer de pròstata. Actualment, diversos treballs han remarcat la importància de l'estroma en el càncer de pròstata així com el paper dels FGFs en la progressió tumoral.³⁴⁻³⁸ I més recentment s'ha demostrat que l'expressió del *FGF10* a l'estroma o el FGFR1 expressat a l'epiteli són suficients per induir el càncer de pròstata en models animals.^{39,40} El primer treball demostrava que el FGF10 estromal provocava la tumorigènesi mitjançant la regulació a

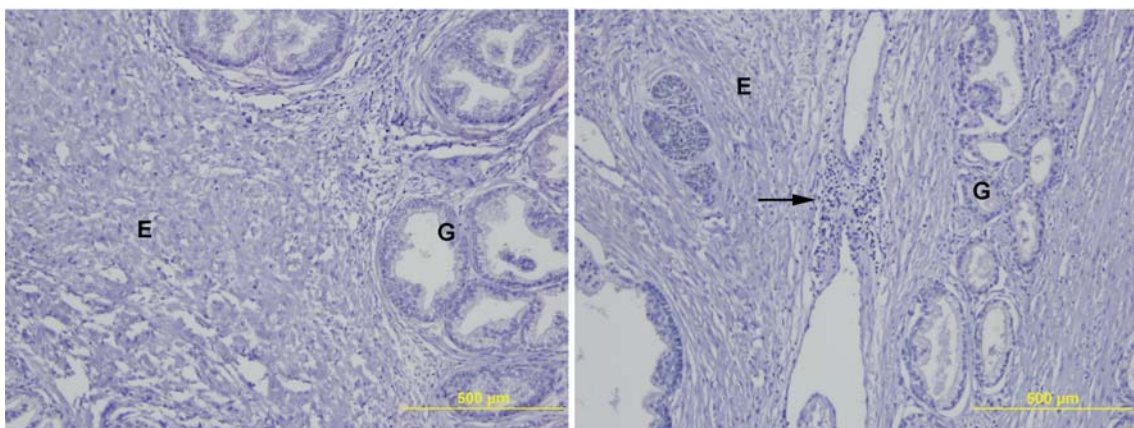


Figura I4: Micrografies d'un tall de pròstata humana realitzades durant la present tesi. Es pot distingir clarament l'epiteli glandular (G) i l'estroma (E), format per diversos tipus cel·lulars com múscul llis, fibroblasts, i cèl·lules inflamatòries (fletxa). Escala: 500 µm

l'alça del receptor d'andrògens a l'epiteli, cosa que n'induïa la proliferació, i a l'encop demostrava que l'estroma regulava l'homeòstasi de l'epiteli. En el cas del FGFR1, la seva senyalització constitutiva a l'epiteli portava irreversiblement al carcinoma de pròstata i a l'epiteli s'observava una regulació a la baixa del marcador epitelial E-cadherina i en canvi una regulació a l'alça de marcadors mesenquimals, fenomen que indica una transició epiteli-mesènquima. A més, s'ha descrit que l'activació condicional del FGFR1 indueix l'angiogènesi,⁴¹ i que l'expressió estromal de FGF2, que està regulada per TGF β , incrementa la mida del tumor i la densitat de microvasos en els tumors *LNCaP*.⁴² En aquest sentit val a dir que la pèrdua de senyalització de TGF β R a l'estroma de la pròstata és un fenomen freqüent en els pacients amb càncer de pròstata,^{17,43} i un *knock-out* de TGF β IIIR específic de fibroblasts provoca càncer de pròstata.⁴⁴ Finalment, també el grup de Cunha ha demostrat que els anomenats fibroblasts associats a carcinoma (CAF) —que són fenotípicament anormals però no presenten alteracions genètiques importants— faciliten l'angiogènesi i promouen el creixement del càncer de pròstata quan es coinjecten amb cèl·lules epitelials prostàtiques no tumorigèniques.⁴⁵ Uns resultats semblants han estat obtinguts per un grup independent,⁴⁶ cosa que reforça aquesta idea.

Altres observacions relacionades amb la interacció de l'estroma i l'epiteli vénen dels estudis del grup d'Anders Bergh, que recentment ha descrit que la inducció de l'apoptosi després de la castració en pacients de càncer de pròstata requereix la regulació a la baixa de l'IGF-1 a l'estroma tumoral.⁴⁷ A més, també ha observat que el tumor de pròstata insensible a andrògens respon a un tractament de castració quan es fa créixer en un ambient dependent d'andrògens, i per tant conclouen que l'ambient és determinant per la resposta de les cèl·lules epitelials prostàtiques a la castració.⁴⁸ Val a dir que aquesta observació és semblant a aquella feta en diversos models animals en què el trasplantament d'un tumor humà hormonoindependent en un ratolí nu normal fa que el tumor esdevingui hormonodependent.⁴⁹

És important remarcar que la senyalització estroma-epiteli és en ambdós sentits, i senyals enviats per l'epiteli a l'estroma, com per exemple la senyalització per la via de *Hedgehog*, pot produir l'expressió de senyals paracrins a l'estroma que promouen el creixement del tumor.⁵⁰

Tots aquests resultats suggereixen que l'ambient del tumor està recolzant no només el creixement del tumor sinó possiblement també la seva reparació postractament mitjançant el suport continu de l'estroma a l'epiteli.

1.1.4 Moll d'os i estroma

Diverses proves suggereixen que és probable que el desenvolupament de la massa tumoral, el creixement i progressió del tumor així com la formació de metàstasis siguin fenòmens en els quals el moll d'os jugui un paper rellevant. Per exemple, un dels requisits per tal que un tumor pugui créixer és que tingui un aport suficient de nutrients i oxigen. Això s'assoleix mitjançant la formació de vasos *de novo*, és a dir, l'angiogènesi. També en aquest procés el moll d'os juga un paper crucial mitjançant la mobilització de cèl·lules i l'enviament de factors clau. En un treball publicat l'any 2005, Okamoto i col·laboradors descriueren la regulació de l'angiogènesi per part de les cèl·lules hematopoètiques i com la supressió de l'hematopoesi inhibia l'angiogènesi *in vitro* en models de càncer generats a partir de la injecció de la línia cel·lular de càncer de pròstata *PC-3* i la línia *colon26*, de càncer de colon.⁵¹ En un estudi diferent, l'ús del ratolí transgènic TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*) va evidenciar el reclutament de cèl·lules endotelials al tumor mobilitzades des del moll d'os.⁵² Però aquesta relació tumor-moll d'os ha de ser, evidentment, bidireccional, i així ho indiquen alguns treballs.^{53,54}

D'altra banda, per tal d'envair altres teixits, les cèl·lules del tumor necessiten degradar la matriu extracel·lular. Aquesta degradació és duta a terme per proteïnes com les metal·loproteïnases. Coussens i col·laboradors van descriure que aquesta activitat enzimàtica és produïda per cèl·lules de l'estroma procedents del moll d'os en models de carcinoma de pell.⁵⁵

Quant al paper en la formació de metàstasis, Rosandra N Kaplan i col·laboradors van descriure l'any 2005 que un conjunt de cèl·lules progenitores hematopoètiques positives pel receptor 1 del factor de creixement endotelial vascular (VEGFR1) són responsables de la formació dels anomenats nínxols premetastàsics, que prepararien llocs per la nidificació ('homing') de cèl·lules metastàsiques abans que es produeixin les pròpies metàstasis.⁵⁶

Es pot concloure, doncs, que hi ha un diàleg entre el moll d'os i el tumor en què l'intercanvi de factors i cèl·lules afavoreix l'evolució del tumor.

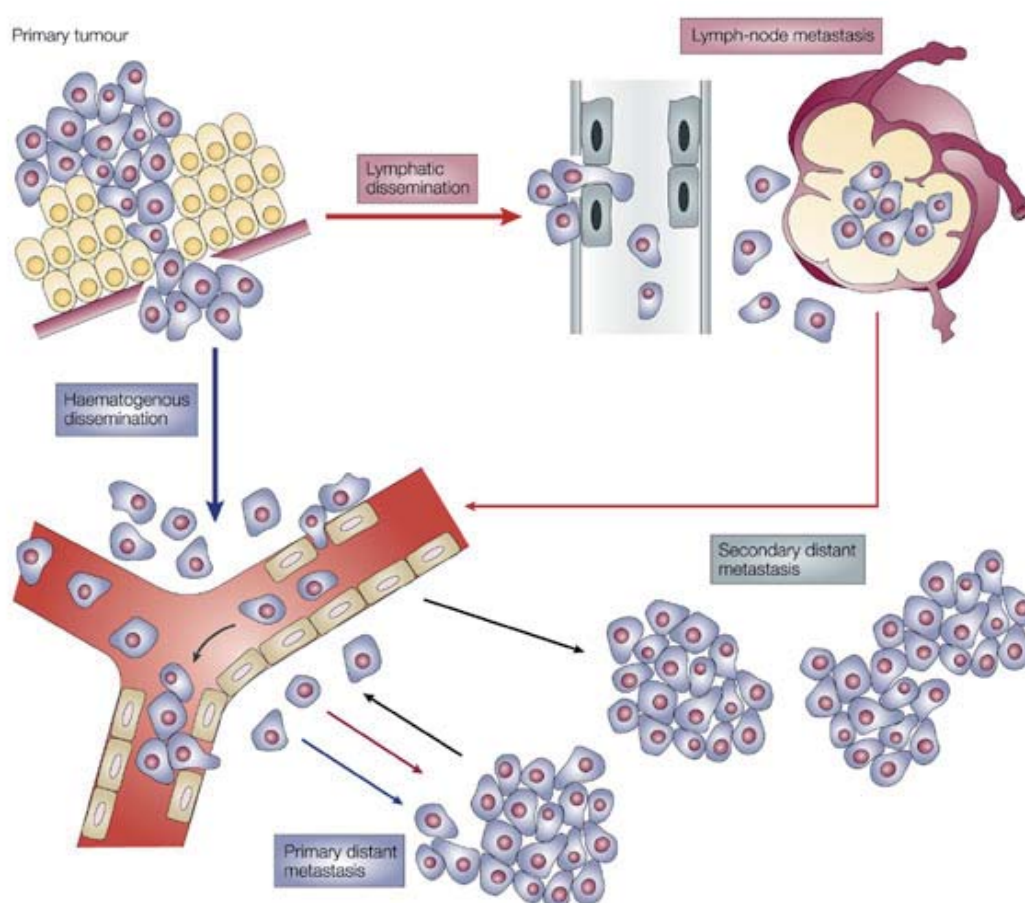
1.1.5 Metàstasis i micrometàstasis. Concepte de la dormició

El terme metàstasi, del grec *Metástasis* 'canvi de lloc', fa referència a la capacitat de les cèl·lules d'un tumor per envair altres teixits, via el vasos limfàtics o vasculars, i a establir-s'hi i créixer com a noves masses tumorals. La metàstasi, fenomen encara no

massa ben entès des del punt de vista molecular, és un dels aspectes més perillosos i temuts del càncer, atès que els tumors que no en fan en un principi poden ser extirpats quirúrgicament, mentre que les metàstasis són difícils d'eliminar tant per cirurgia com per radioteràpia i representen la causa del 90% de morts per càncer. A priori no tots els tumors semblen tenir aquesta capacitat metastàsica, tot i que aquest fenomen podria dependre en part de la progressió del tumor i que, per tant, en estadis més avançats el tumor acabés metastatitzant. Aquesta és la visió clàssica de la metàstasi, en la qual es proposa que el metastàtic és un fenotip que s'adquireix en estadis tardans de la progressió tumoral. Tanmateix, els estudis de *microarrays* dels darrers anys han qüestionat aquesta visió, ja que s'han trobat perfils gènics diferents en els càncers metastatitzants i en les pròpies metàstasis respecte dels tumors primaris i s'han establert, així, signatures d'expressió gènica als tumors relacionades amb la capacitat metastàsica.^{57,58} D'altra banda, s'ha proposat que la capacitat de donar lloc a metàstasis no seria, però, inherent al tumor en si, sinó més aviat pròpia de certes cèl·lules del tumor que adquiririen un programa metastàtic i tindrien la capacitat de sobreviure i proliferar en un ambient diferent del del tumor, és a dir, la capacitat de colonitzar altres teixits.⁵⁹ Aquesta visió és la recolzada pels treballs del grup de Fidler, segons el qual el procés de la metàstasi seria degut a la selecció d'un subgrup de cèl·lules amb potencial metastàtic,⁶⁰⁻⁶² així com s'havia proposat pels tumors hormonoindependents.²¹ Malgrat això, Ramaswamy i col·laboradors van establir que l'existència d'uns perfils genètics que identifiquen tumors amb capacitat metastàsica,⁶³ per la qual cosa concloueren que el fenomen de la metàstasi seria més propi del conjunt del tumor en si que no pas d'unes poques cèl·lules del tumor. En aquest sentit, Glinsky i col·laboradors van realitzar un estudi amb 11 tipus de càncer diferents, entre es trobava el de pròstata, en què mitjançant l'ús de *microarrays* van observar que hi havia un subgrup de càncers d'elevada malignitat que presentava una signatura gènica d'onze gens molt semblant a la de les cèl·lules mare i que estaven estadísticament relacionats amb l'aparició de metàstasis i mal pronòstic.⁵⁷

Les cèl·lules tumorals disseminades (CTDs) són cèl·lules canceroses procedents del tumor que s'han alliberat del conjunt de la massa tumoral i es troben circulant a la sang perifèrica o residint en determinats òrgans diana com el moll d'os, en els quals nien, sense que aquests pacients manifestin metàstasis.⁶⁴⁻⁶⁶ Sovint se les anomena micrometàstasis, tot i que sembla un terme força inadequat, atès que, en l'estat de disseminació, no hi ha formació de metàstasi de cap tipus (no s'observa metàstasi a nivell anatomopatològic, ni hi ha simptomatologia clínica ni es genera angiogènesi per al creixement de la metàstasi). S'ha descrit que aquestes cèl·lules entren en un estat de latència que pot durar anys, i aquest estat s'ha batejat amb el nom de *dormició*. S'ha suggerit que aquest estat podria esdevenir-se per una entrada d'aquestes cèl·lules a la

fase del cicle cel·lular G_0 .⁶⁷ Tanmateix, per motius encara no massa clars, aquestes cèl·lules, en un moment determinat, poden “despertar-se” i formar una metàstasi. En aquest sentit, el grup d'en Judah Folkman, que ja va parlar de l'estat de dormició del tumor en relació amb l'angiogènesi els anys 70,⁶⁸ va proposar que un dels mecanismes d'activació d'aquestes cèl·lules és l'angiogènesi, fenomen necessari per al creixement del tumor i per al desenvolupament de les metàstasis. En l'estudi del mateix grup dut a



Nature Reviews | Cancer

Figura I5: Esquema d'un model del procés de disseminació metastàsica. Les cèl·lules del tumor primari poden disseminar-se per les vies limfàtica (fletxes vermelles) o sanguínia (fletxes blaves). La disseminació secundària per la sang també es dona a altres òrgans a partir de les metàstasis (fletxes negres). En el primer model les cèl·lules tumorals disseminades proliferen als nòduls limfàtics per formar metàstasis sòlides, mentre les cèl·lules tumorals a llocs distants romanen en estats de dormició o moren. Als estadis més avançats, les cèl·lules tumorals disseminen a partir de les metàstasis establertes als nòduls limfàtics cap a llocs distants, on formen metàstasis secundàries. És possible que aquesta capacitat l'hagin adquirida en l'ambient dels nòduls durant la seva estada. Com a resultat, la metàstasi tumoral depèn de la presència de metàstasis als nòduls limfàtics. La disseminació per la sang pot produir-se a partir del tumor primari, de les metàstasis als nòduls limfàtics o a partir de metàstasis distants. Això s'esdevé en pacients que desenvolupen metàstasis a altres òrgans, mentre que els nòduls limfàtics no presenten tumor, com en les pacients amb càncer de mama. La disseminació per la sang sembla produir-se als estadis inicials de la progressió tumoral. (Reproduït de Pantel & Brakenhoff, 2004).

terme per Holmgren i col·laboradors, observaren que la inhibició sistèmica de l'angiogènesi mantenia les micrometàstasis en un estat de dormició que consistia en l'assoliment d'un equilibri entre proliferació i mort cel·lular, de la qual cosa desprenien que la supressió angiogènica limita el creixement del tumor a través d'un augment de l'apoptosi.⁶⁹ Acabaven hipotetitzant, doncs, que “les micrometàstasis poden sortir de l'estat de dormició mitjançant l'increment de llur nivell d'activitat angiogènica”, i que això pot esdevenir-se per “com a mínim dos mecanismes generals: la desaparició d'inhibidors angiogènics circulants (per exemple per la resecció d'un tumor primari); i/o el canvi cap al fenotip angiogènica d'un subgrup de cèl·lules de la micrometàstasi”. Aquest mateix grup ha publicat diversos articles que reforcen aquesta idea amb l'ús de diferents tumors i models animals.⁷⁰⁻⁷³

Quant a la detecció d'aquestes cèl·lules, bàsicament s'ha realitzat mitjançant mètodes d'immunohistoquímica i de PCR. En el cas del càncer de pròstata bàsicament els marcadors utilitzats per identificar CTDs per PCR han estat el PSA i les citoqueratines, aquestes darreres per tal com identifiquen cèl·lules epitelials. La PCR, però, no sembla ser un mètode prou acurat ja el que el soroll de fons i la possible presència de trànscrips de citoqueratines al moll d'os no n'asseguren la fiabilitat per al diagnòstic.^{74,75} Malgrat tot, la immunohistoquímica també ha presentat alguns problemes quant a la reacció creuada d'algun dels anticossos utilitzats freqüentment per als estudis amb CTDs.⁷⁶ Gran part dels esforços, doncs, s'han centrat a fixar un protocol més o menys universal per al marcatge de CTDs mitjançant una immunohistoquímica amb citoqueratines.⁷⁷

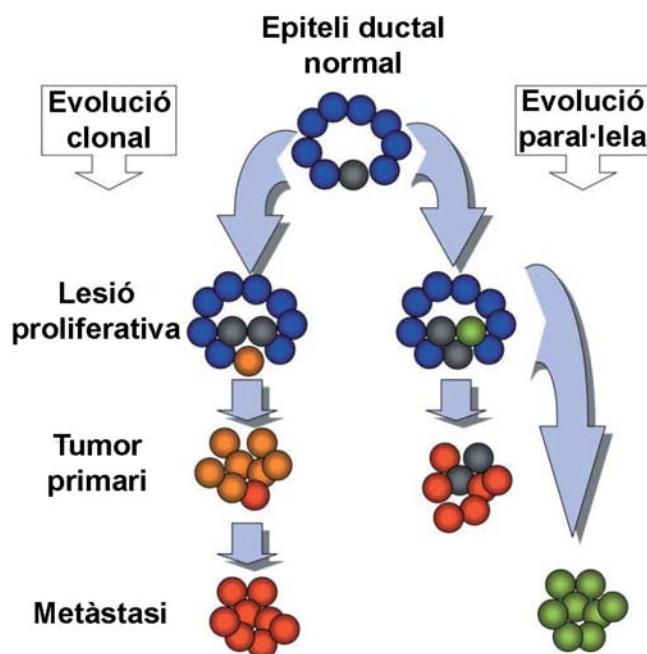
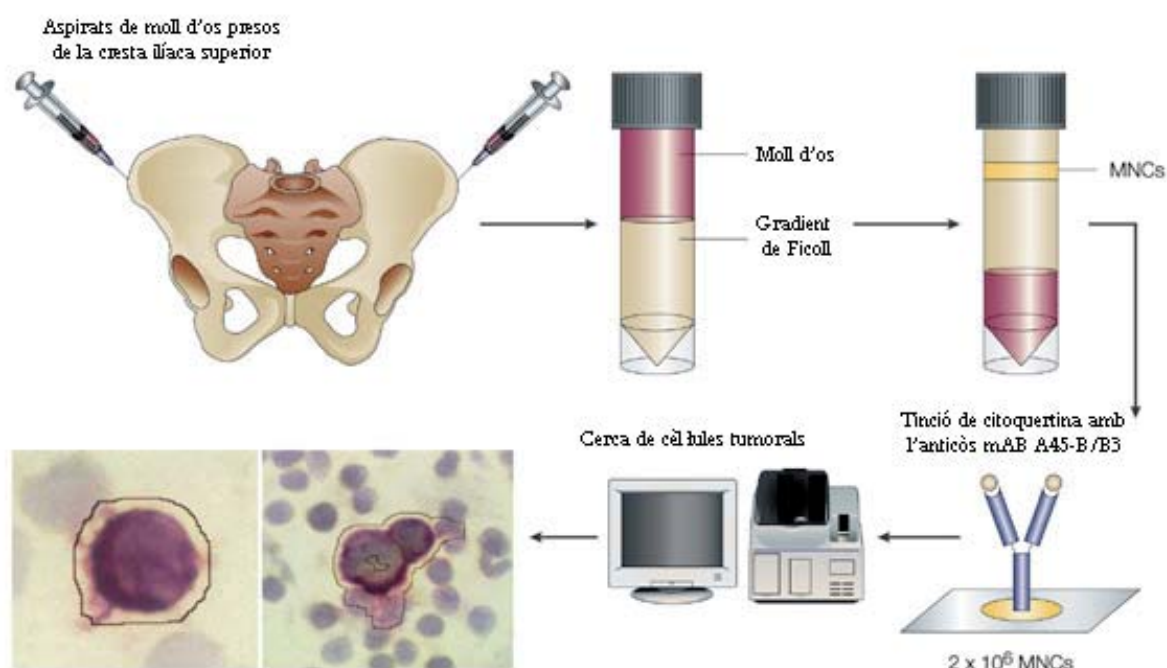


Figura I6: Esquema sobre els models serial i paral·lel de l'evolució tumoral i la metàstasi. En el model de l'esquerra, la progressió fins a la metàstasi es produeix a través de l'evolució clonal de tal manera que la majoria de les propietats del tumor primari es trobaran a les cèl·lules tumorals disseminades. L'altre model suggereix que les cèl·lules que donen lloc a la malaltia metastàsica se separen aviat del tumor primari i evolucionen més o menys independentment del tumor primari. (Reproduït i adaptat de JW Gray, 2003).

El grup de Klaus Pantel, un dels més reconeguts en aquest camp, va dur a terme estudis de fenotipació i caracterització biològica d'aquestes CTDs.^{78,79} També aquest grup va descriure que la quimioteràpia no elimina totalment les cèl·lules positives per citoqueratina al moll d'os en pacients amb càncer de mama d'alt risc i associaren la presència d'aquestes cèl·lules amb un mal pronòstic.⁸⁰ De fet, la detecció de cèl·lules tumorals disseminades a moll d'os —un dels òrgans on s'ha descrit que aquestes cèl·lules tenen una preferència per fer-hi la nidificació—⁸¹ ha estat estudiada com a possible factor pronòstic en diversos tipus de càncers, inclosos els de pròstata i mama.⁸²⁻⁸⁵ En llur estudi amb pacients amb càncer de pròstata, Lilleby i col·laboradors van fer ús d'una



Nature Reviews | Cancer

Figura I7: El cribratge del moll d'os a la recerca de cèl·lules tumorals disseminades als pacients amb tumors epitelials implica anàlisis immunohistoquímiques. El procés comença amb l'ús de gradients de densitat per aïllar cèl·lules mononucleades (MNCs), que contenen la fracció de cèl·lules tumorals. Es fa ús d'anticossos monoclonals anticitoqueratina per identificar les cèl·lules epitelials tumorals. La majoria d'investigadors utilitzen una combinació de diferents anticossos anticitoqueratina o bé un anticòs anticitoqueratina d'espectre ampli, ja que algunes citoqueratines particulars poden estar regulades a la baixa en alguns tumors epitelials com els carcinomes de mama. El procés de cribratge és llarg i tediós i es podria simplificar amb un sistema d'anàlisi per imatge automatitzat. Les dues fotografies mostren exemples representatius de tres cèl·lules que estan tenyides amb l'anticòs anticitoqueratina A45-B/B3. (Adaptat de Pantel & Brakenhoff, 2004).

combinació de dos anticossos pancitoqueratina.⁸⁵ L'estudi conclouïa que és possible definir un grup de pacients amb un risc elevat de desenvolupar metàstasis en funció de la presència de cèl·lules positives per citoqueratines al moll d'os en individus que han rebut un tractament localitzat.

D'altra banda s'ha descrit la presència de CTDs a moll d'os i sang perifèrica en individus amb càncer de pròstata clínicament localitzat,⁸¹ de la qual cosa els autors del treball desprenen que la disseminació de cèl·lules tumorals a partir del tumor primari és un fenomen primerenc en la progressió tumoral, conclusió que en certa manera, i malgrat que les CTDs no són considerades ortodoxament cèl·lules metastàtiques, també qüestiona la hipòtesi clàssica sobre l'adquisició d'un fenotip metastàtic a llarg termini.

Woelfle i col·laboradors van publicar un treball en què van analitzar els molls d'os de pacients amb càncer de mama per trobar-hi CTDs mitjançant un marcatge amb citoqueratines.⁸⁶ Un cop establerts els grups de pacients amb CTDs, van realitzar *microarrays* dels tumors primaris i van comparar els dos grups. Van trobar que hi havia una signatura gènica relacionada amb la disseminació de cèl·lules tumorals al moll d'os i que aquesta signatura estava caracteritzada bàsicament per una supressió gènica.

1.1.6 Models animals i cel·lulars de càncer de pròstata

Per estudiar la progressió del càncer de pròstata s'han utilitzat diferents alternatives, entre les quals hi ha l'ús de línies cel·lulars derivades tant de tumor com de metàstasis de càncer de pròstata així com models animals.

Hi ha diverses línies cel·lulars de pròstata de les quals les més emprades (també en el present estudi) són les anomenades *LNCaP*, *PC-3* i *DUI45*, descrites als anys 80.⁸⁷⁻⁸⁹ Cap de les tres no és una línia estrictament de càncer de pròstata sinó que les tres deriven de metàstasis de càncer de pròstata a diferents òrgans. En el cas de *LNCaP*, la línia deriva d'un aspirat de metàstasi al nòdul limfàtic supraclavicular d'un home de 50 anys.⁸⁷ És una línia hormonodependent, i les cèl·lules són positives pel receptor d'andrògens i el d'estrògens. La *PC-3*, que és una línia que no respon a hormones, deriva d'una metàstasi òssia d'un adenocarcinoma de pròstata de grau IV d'un home de 62 anys.⁸⁸ Finalment, la *DUI45*, que és tant hormonoindependent com insensible a hormones quant al creixement, va ser derivada d'una metàstasi a cervell d'un adenocarcinoma d'un home de 69 anys el 1975.⁸⁹

La generació de models animals permet un estudi més precís de l'evolució de la malaltia i s'han destinat nombrosos esforços per desenvolupar models animals que

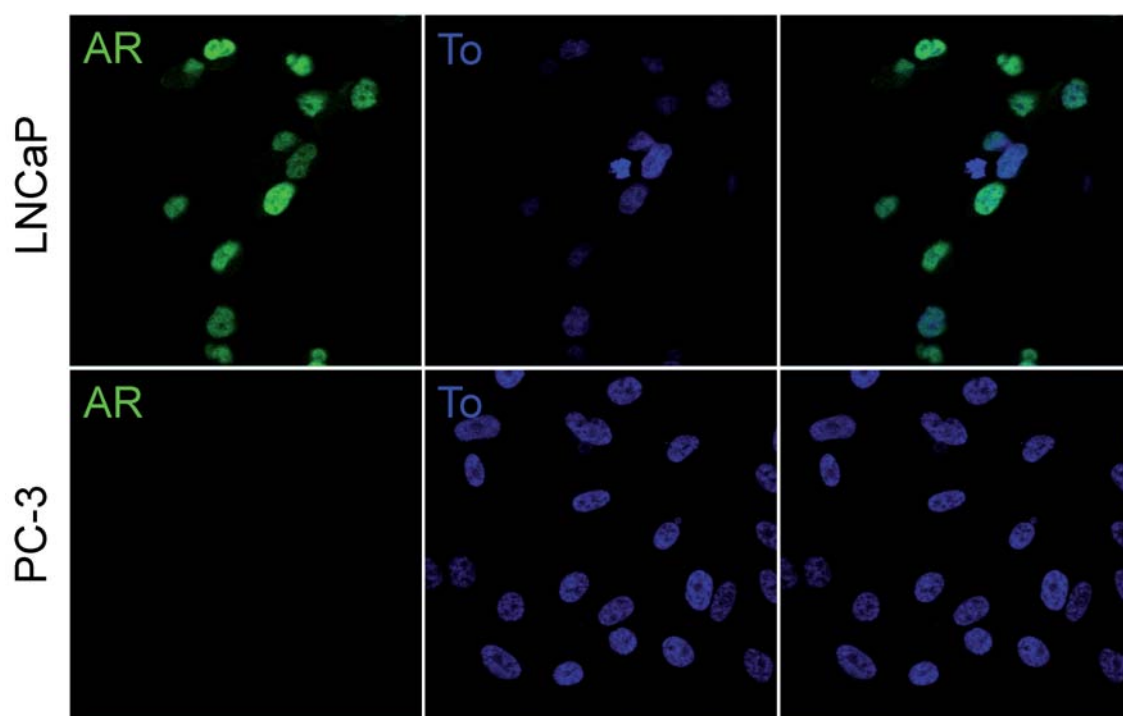


Figura I8: Immunofluorescència pel receptor d'andrògens (AR) sobre les línies *LNCaP* i *PC-3*. L'anticòs utilitzat detecta una regió central de la proteïna. *LNCaP* presenta marcatge nuclear i *PC-3* no. En blau, els nuclis marcats amb *TOPRO-3*. A la dreta el solapament.

reproduueixin la malaltia d'una manera fiable (per una revisió sobre el tema llegiu Sharma & Screiber-Agus, *Oncogene* 18:5349). En aquest sentit, s'han generat models per diversos mecanismes com la transgènesi en el cas del ratolí *TRAMP*,⁹⁰ el *knock-out* de diferents gens (com el model murí de *knockout* específic de pròstata de *Pten*, en què el càncer progressa des de PIN a adenocarcinoma invasiu i metastàtic,⁹¹ o nuls per p27, per exemple), la injecció (ortotòpica o no) de línies cel·lulars derivades de càncer de pròstata o de metàstasis de càncer de pròstata com *CWR22*, *LAPC*, *LuCAP*,⁹²⁻⁹⁴ o l'expressió forçada d'oncogens com *RAS* o *BCL2* mitjançant la introducció de vectors. També s'han observat soques de rates que desenvolupen la malaltia de manera espontània, com és el cas de les *Dunning R-3327*,⁹⁵ les rates *Noble (NR)*,⁹⁶ les *Lobund-Wistar*,⁹⁷ i el 5% de les rates *ACI/seg*, que als 24 mesos d'edat desenvolupen carcinoma prostàtic amb capacitat metastàtica.⁹⁸ Tanmateix, la pròstata del ratolí és anatòmicament diferent de la humana, i el xenotrasplantament de teixits cancerosos de pròstata humans a ratolins nusos és més complicat, ateses les variables metodològiques d'arrelament, manteniment al llarg dels passatges i emulació de la progressió tumorigènica, i l'elevada dificultat quant a la identificació i implantació de les cèl·lules a la pròstata dorsal.

El grup de la Dra Marie-France Poupon va desenvolupar un model de càncer de pròstata en ratolins nusos que recapitula tots els aspectes de la malaltia, el model *PAC-120 (Prostate AdenoCarcinoma 120)*.⁴⁹ Aquest model consisteix en un



Figura I9: Model subcutani del xeno-trasplantament de càncer de pròstata *PAC-120*. El tumor, hormonodependent, és trasplantable de manera seriada a ratolins nusos mascle.

xenotrasplantament de tumor prostàtic humà procedent d'una resecció transuretral d'un adenocarcinoma primari de pròstata. El tumor es manté mitjançant el trasplantament subcutani seriats de fragments tumorals de 5 x 5 mm a ratolins mascles *Swiss nude*. Es tracta d'un tumor hormonodependent, que reproduïx el comportament del càncer de pròstata humà pel que fa al pas de l'hormonodependència a l'hormonoïndependència quan se sotmet a tractaments antiandrogènics (sigui castració química o quirúrgica). És a dir, es pot inhibir el seu creixement

mitjançant la utilització d'antagonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina —com el FE 200486— o bé de castracions quirúrgiques, però, amb el temps, el tumor es fa resistent i creix independentment dels estímuls antiandrogènics. És, per tant, un bon model per estudiar el mecanisme de l'hormonodependència. El *PAC-120* presenta el mateix immunofenotip que el tumor original (positiu per queratines, vimentina, fosfatasa àcida prostàtica i Leu-7) i expressa els gens *HOXB9*, *HOXA4*, *HER-2/neu* i el del *PSA*. Malgrat que no s'han observat metàstasis, sí que s'han detectat trànscripats humans als pulmons dels ratolins mitjançant RT-PCR.⁴⁹

1.2 Cèl·lules mare

1.2.1 Generalitats

El terme anglosaxó *stem cell*, literalment 'cèl·lula troncal', i discutiblement traduït i àmpliament estès com a 'cèl·lula mare', fa referència a un tipus cel·lular que presenta bàsicament les següents característiques: té capacitat de donar lloc a altres tipus cel·lulars a través d'un procés de diferenciació; alhora té capacitat d'autorenovar-se, és a dir de donar lloc a una cèl·lula filla idèntica a ella mateixa; i pot viure i proliferar durant llargs períodes de temps —a la pràctica, durant tota la vida de l'individu. Hom fa una distinció principal entre dos tipus de cèl·lules mare: les embrionàries i les adultes. Pel que fa a les adultes, el teixit en què han estat més i més ben estudiades és el sistema hematopoètic, on s'han aïllat tant de ratolins com d'humans.⁹⁹⁻¹⁰² En aquest cas les

cèl·lules mare s'han pogut caracteritzar fenotípicament i s'ha pogut demostrar la seva capacitat per regenerar el sistema hematopoètic després d'irradiar letalment ratolins recipients. D'altres treballs han anat més enllà, tot demostrant que aquestes cèl·lules mare hematopoètiques poden donar lloc a altres tipus cel·lulars com cèl·lules hepàtiques,^{103,104} cèl·lules neuronals,¹⁰⁵ o cèl·lules epitelials del fetge, pulmó, tracte gastrointestinal i pell.¹⁰⁶

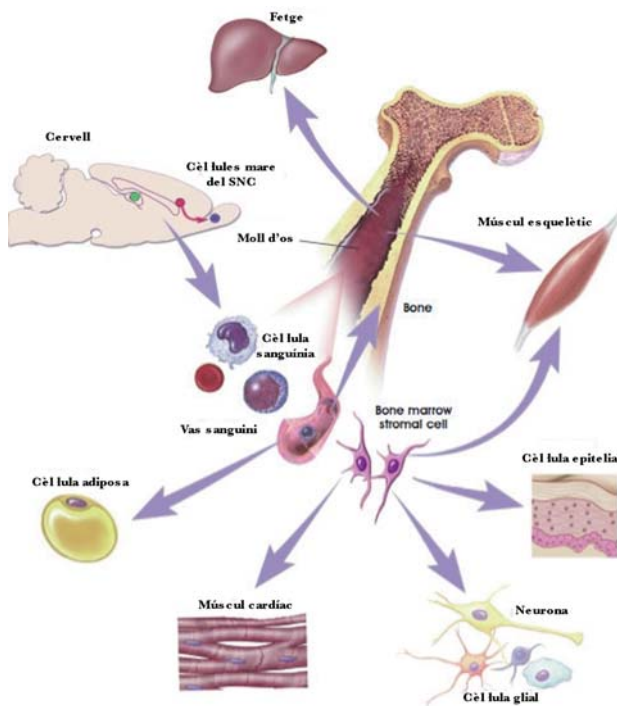


Figura I10: Esquema que il·lustra la plasticitat de les cèl·lules mare adultes. (Adaptat del NIH).

1.2.2 Cèl·lules estromals multipotents (cèl·lules mare mesenquimals)

Les cèl·lules mare mesenquimals són cèl·lules que presenten les característiques habituals de les cèl·lules mare —és a dir, viuen durant llargs períodes de temps, es poden autorenovar i poden diferenciar-se a altres llinatges— tot i que la seva capacitat per diferenciar-se a altres tipus cel·lulars no és total, sinó que fins ara només s'ha descrit la diferenciació a uns pocs llinatges cel·lulars. És per això que hom les anomena cèl·lules mesenquimals multipotents. Malgrat això, aquest terme tampoc no sembla massa adequat ni precís, ja que el mesènquima és el teixit connectiu embrionari que pràcticament no es troba als adults i del qual deriven el teixit conjuntiu, l'esquelet dels vertebrats, el sistema circulatori i bona part dels músculs. En canvi, les cèl·lules multipotents “mesenquimals” no donen lloc a cèl·lules del sistema hematopoètic. Atès que les cèl·lules àmpliament anomenades MSC (de l'anglès ‘Mesenchymal Stem Cell’) són multipotents i s'han trobat en diversos teixits com el múscul i el teixit adipós, s'ha proposat el terme cèl·lules estromals multipotents, que sembla més adequat i que conserva les inicials MSC (en anglès ‘Multipotent Stromal Cell’).

L'estudi i descobriment d'aquestes cèl·lules multipotents va començar els anys 60 i 70 amb els treballs de Friedenstein i col·laboradors, que descrigueren cèl·lules estromals clonals procedents del moll d'os que s'adherien al plàstic.¹⁰⁷⁻¹¹³ Els estudis primerencs van demostrar que aquestes cèl·lules formaven unitats formadores de

colònies de fibroblasts (F-CFU), però també la seva capacitat per diferenciar-se a osteoblasts, condroblasts i adipòcits sota unes condicions experimentals *in vitro* determinades. Més tard diversos laboratoris van confirmar la plasticitat i la multipotencialitat de les cèl·lules estromals de moll d'os amb cultius originats a partir de cèl·lules úniques clonades. Ràpidament es va veure que només calien petits canvis en el medi per tal d'afavorir una diferenciació a un llinatge o a un altre, cosa que subratllava la plasticitat d'aquestes cèl·lules. També es van realitzar experiments *in vivo* amb animals que demostraven la importància del microambient —novament— per la diferenciació de les MSC. Un exemple d'això és el treball de Liechty i col·laboradors en què la injecció de MSC humanes derivades del moll d'os a la circulació d'un fetus d'ovella durant la gestació primerenca produïa l'arrelament d'aquestes cèl·lules en molts teixits fins a 13 mesos després del trasplantament i aquestes cèl·lules es diferenciaven a condrocits, adipòcits, miòcits i cardiomiòcits, cèl·lules estromals del moll d'os i estromatímic als seus respectius òrgans o teixits.¹¹⁴

S'han dedicat molts esforços a la identificació i caracterització d'aquestes cèl·lules estromals multipotents tant al moll d'os com a altres teixits, buscant uns marcadors més o menys universals que en permetin la identificació sense ambigüitats *in vivo*. En aquest sentit, s'han establert uns certs criteris mínims,¹¹⁵ que són lleugerament diferents per a cèl·lules humanes i murines. Aquestes diferències rauen bàsicament en els marcadors que són propis de les unes i de les altres. En el cas de les murines, alguns dels marcadors descrits són Cd29, Cd44, Cd81, Cd106 i Sca-1.¹¹⁶ En el cas de les humanes, aquestes han d'expressar CD73, CD105 i CD90 i no expressar CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 i HLA-DR. Tanmateix, aquests marcadors poden variar en funció del teixit i de les condicions de cultiu d'aquestes cèl·lules. Però els criteris d'adhesió en plàstic sense cap medi especial i potencial de diferenciació als llinatges descrits són vàlids tant per les humanes com per les murines.

Com s'ha esmentat anteriorment, les MSC s'han trobat en diversos teixits a banda del moll d'os —on val a dir que encara és el teixit on han estat més ben estudiades—, i aquests inclouen el cordó umbilical,^{117,118} la placenta,¹¹⁹ el líquid amniòtic,¹²⁰ el cor,¹²¹ el múscul esquelètic,¹²² el teixit adipós,¹²³ el teixit sinovial,¹²⁴ el pàncrees,¹²⁵ i també s'han trobat circulant en sang.^{126,127} La freqüència amb què es troben aquest tipus de cèl·lules no està clara i podria variar a cada teixit, però al moll d'os es calcula que hi ha unes 10 MSC per cada milió de cèl·lules totals del moll d'os.¹²⁸

Un dels aspectes de les MSC que ha suscitat més interès és el seu potencial terapèutic per regenerar teixits i el seu ús potencial en la teràpia gènica, atès que es poden expandir molt en cultiu —tot i que encara es busca la millor manera de fer-ho.¹²⁹ Diversos estudis han demostrat la migració d'aquestes cèl·lules i l'arrelament a diferents

òrgans en models animals però també en trasplantaments humans. A més, les MSC presenten unes propietats immunomodulatòries que les han fet atractives com a teràpia per malalties autoimmunes, ja que les MSC eviten el rebuig al·logènic.^{130,131} Diversos estudis clínics han indicat la validesa de l'ús d'aquestes cèl·lules per a la regeneració tissular. Un exemple d'això són els treballs fets amb pacients amb osteogènesi imperfecta, en què el trasplantament directe de MSC o bé el trasplantament autòleg de MSC modificades prèviament per teràpia gènica han donat resultats prometedors.^{132,133}

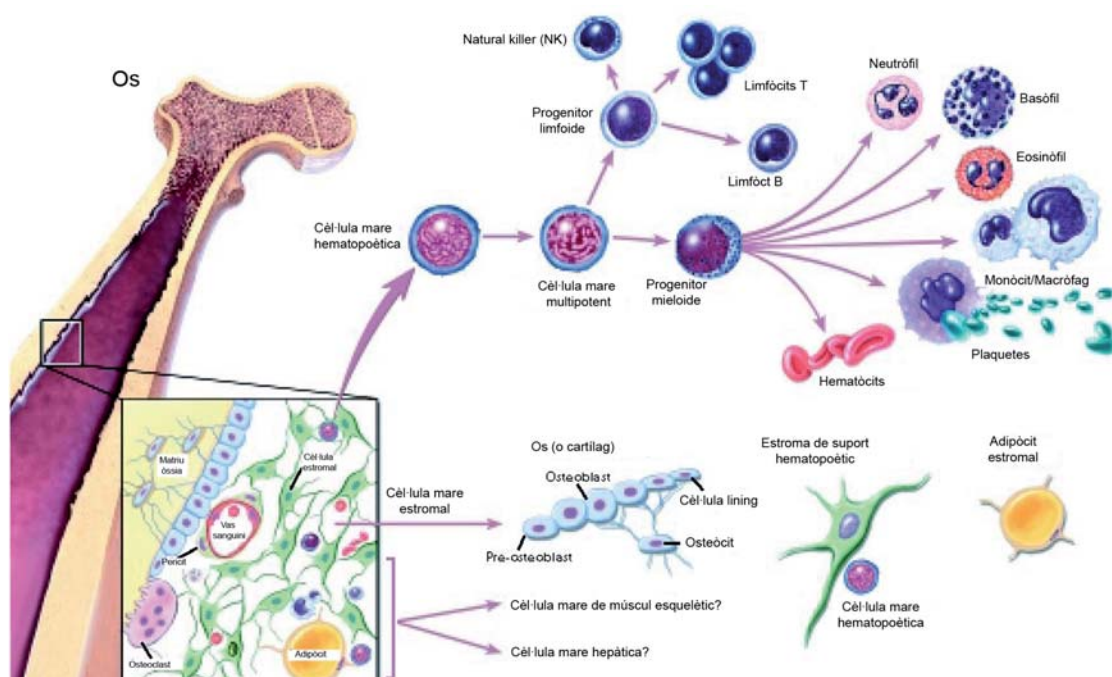


Figura 111: Esquema que representa els tipus de cèl·lules progenitores que es troben al moll d'os i els tipus cel·lulars als quals poden donar lloc. S'hi inclouen les cèl·lules multipotents estromals. (Adaptat de l'NIH)

1.2.3 Cèl·lules mare prostàtiques

Quant a la presència de cèl·lules mare a la pròstata, aquest ha estat un tema lligat al seu rol en el càncer, però també al desenvolupament. El 1989, Isaacs i Coffey van proposar un model de cèl·lules mare jeràrquic per a l'epiteli prostàtic, en el qual suggerien que les cèl·lules mare de tot l'epiteli prostàtic estan situades al compartiment basal.¹³⁴ Per divisió asimètrica aquestes cèl·lules s'autorenovarien i donarien lloc a una cèl·lula progenitora ensembla, la qual formaria l'anomenada població d'amplificació transitòria i s'encarregaria del desenvolupament de l'epiteli. De fet, aquest model era conseqüència d'altres treballs anteriors en què havien observat que la castració de rates

provocava l'atròfia de la glàndula prostàtica per l'apoptosi de les cèl·lules prostàtiques luminals diferenciades, que depenen dels andrògens per a la viabilitat, però un subgrup de cèl·lules basals sobrevivia.¹³⁵ Tanmateix, si es tornava a subministrar andrògens, la glàndula es regenerava i recuperava la funció secretora normal. El grup d'Isaacs va demostrar que aquests cicles d'involució i regeneració es podien repetir diverses vegades seqüencialment, cosa que els feia creure que hi havia d'haver una població de cèl·lules mare amb gran capacitat per a l'autorenovació i la diferenciació a la pròstata.¹³⁶ Aquestes observacions van fer arribar a la hipòtesi tradicional que les cèl·lules mare de la pròstata es troben al compartiment basal.¹³⁵ Aquesta hipòtesi és recolzada pel fet que els ratolins nuls per *p63*, que és un marcador de cèl·lules basals, neixen sense pròstata o sense glàndula mamària.¹³⁷⁻¹⁴¹ Algunes proves més en aquest sentit van arribar amb el treball *in vitro* de Hudson i col·laboradors en què avaluaven l'heterogeneïtat proliferativa de cultius primaris de cèl·lules epitelials de pròstata i el que ells van descriure com la seva capacitat pluripotencial.¹⁴² Van Leenders i Schalken, que ja havia proposat que les cèl·lules luminals i les basals tenen un origen comú,¹⁴³ van exposar un model de diferenciació a l'epiteli prostàtic.¹⁴⁴ Aquest model es basa en les observacions sobre l'expressió de citoqueratines (CK) específiques de cèl·lules basals i luminals durant el

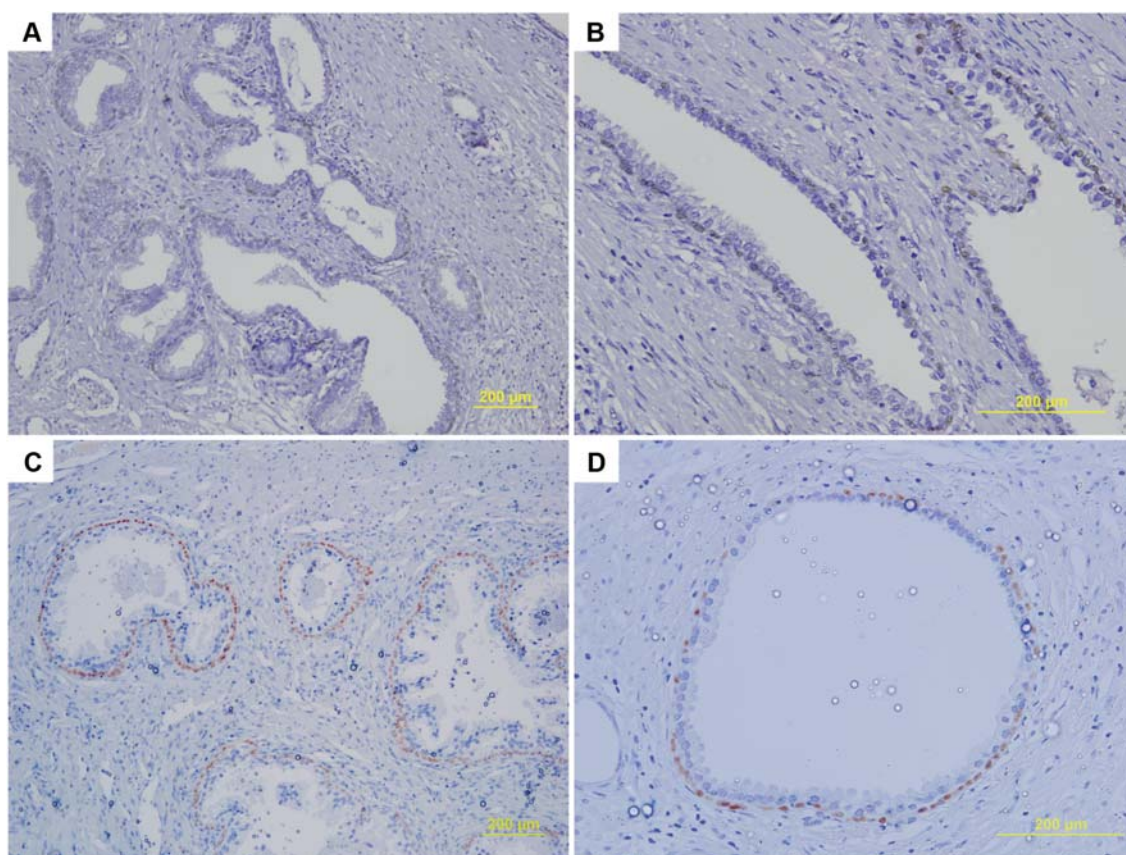


Figura 112: Tincions immunohistoquímiques per p63 sobre dues pròstates humanes (A-B i C-D) a diferents augments realitzades durant la present tesi. Noti's que el marcatge és generalitzat a les cèl·lules glandulars basals. Escala: 200 μm

desenvolupament fetal i adult de la pròstata.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ El model proposa bàsicament que hi ha un subgrup de cèl·lules mare que es troben al compartiment basal i que presenten un fenotip $K5^{++}/14^{++}/18^{+}$. Aquestes cèl·lules donarien lloc a cèl·lules diferenciades que perdrien l'expressió de les citoqueratines basals i adquiririen un fenotip luminal. Diferents treballs han suggerit també que les cèl·lules basals poden donar lloc a les luminals *in vitro*.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Les cèl·lules basals humanes també expressen BCL-2, una proteïna antiapoptòtica que és expressada de manera comuna per les cèl·lules mare tissulars.¹⁵¹ I també s'han utilitzat marcadors prèviament descrits per identificar cèl·lules mare hematopoètiques com el CD133, que sembla identificar unes poques cèl·lules del compartiment basal de la glàndula pròstica.¹⁵² Tanmateix, els experiments de retenció de BrdU realitzats per Tsujimura i col·laboradors van mostrar que les cèl·lules que retenen BrdU a llarg termini es localitzen a una regió específica de la glàndula que és pròxima a la uretra.¹⁵³ Aquesta regió presenta una àmplia banda de cèl·lules de múscul llis que són morfològicament diferents i que secreten alts nivells de $TGF\beta$, factor que podria promoure la quiescència de les cèl·lules mare,¹⁵⁴ la qual cosa fa que aquesta sigui una localització probable de les cèl·lules mare prostàtiques. A més, tant les cèl·lules basals com les luminals de la regió proximal de la pròstata retenen el BrdU després de molts cicles d'ablació androgènica i readdició d'andrògens, cosa que suggereix que les cèl·lules mare no estan restringides a la capa basal. Les cèl·lules d'aquesta regió presenten una activitat de creixement més elevada *in vitro* i *in vivo*, i els trasplantaments seriatos demostren que aquestes cèl·lules poden autorenovar-se per regenerar el teixit prostàtic com a mínim 4 vegades.^{153,155}

Altres observacions s'han basat en la valoració de l'activitat telomerasa —enzim l'activitat del qual manté la llargada dels telòmers i que per tant té un paper crucial en la

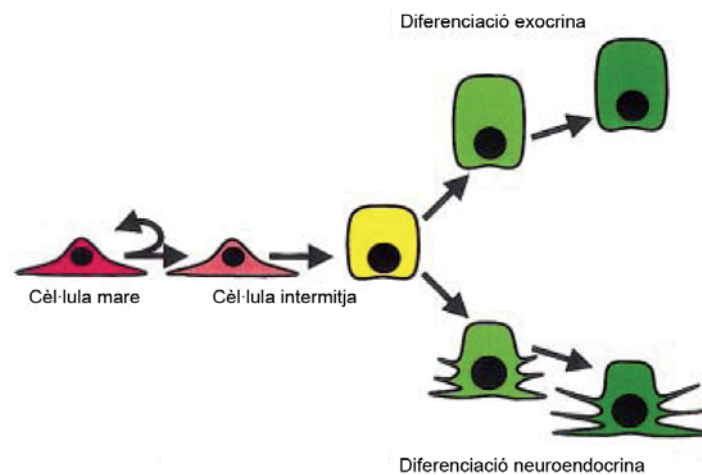


Figura I13: Model de diferenciació de cèl·lules mare a l'epiteli prostàtic. Una població de cèl·lules mare ($K5^{++}/14^{++}/18^{++}$) a la capa basal dona lloc a cèl·lules intermèdies basals ($K5^{++}/18^{+}$). Per un procés de proliferació i translocació apareix un segon tipus de cèl·lula intermèdia ($K5^{+}/K18^{++}$) a la capa luminal. Aquesta població cel·lular prolifera i madura cap a cèl·lules luminals diferenciades terminalment ($K18^{++}$). Durant la diferenciació les cèl·lules intermèdies obtenen característiques exocrines (PSA) o neuroendocrines (cromogranina A). (Modificat de Van Leenders i Schalken, 2001)

característica llarga vida de les cèl·lules mare. El grup de Coffey va observar que, malgrat que l'activitat telomerasa era nul·la en extractes de pròstates de rata normals, aquesta s'activava després d'una castració.¹⁵⁶ Així mateix, la readministració de testosterona feia desaparèixer de nou l'activitat, per la qual cosa conclouien que els andrògens en regulen l'activitat.

L'any 2003, el grup de Noel W. Clarke presentava un nou mètode per aïllar cèl·lules mare putatives de la pròstata basat en la citometria de flux.¹⁵⁷ Bàsicament es tractava de l'aïllament de cèl·lules de la *side population* (SP), un mètode descrit prèviament per M Goodell,¹⁵⁸ tema que serà discutit amb més profunditat en un apartat posterior.

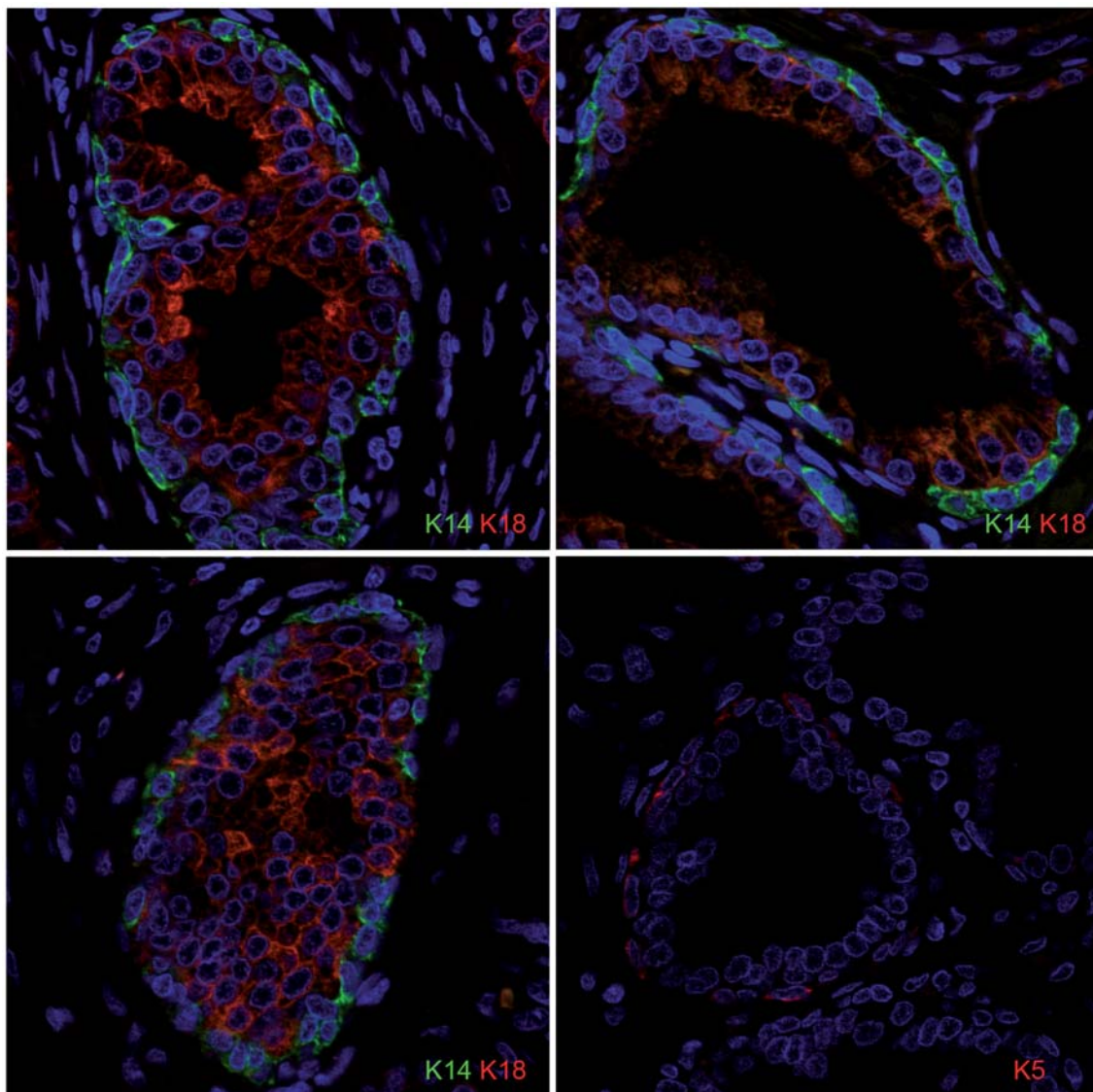


Figura I14: Immunofluorescències fetes durant la present tesi sobre talls de pròstata humana parafinats per les citoqueratines 14, 18 i 5 (K14, K18 i K5, respectivament). Observi's que les citoqueratines 14 i 5 marquen cèl·lules basals i la 18 marca les luminals.

Bhatt i col·laboradors van ser capaços d'adaptar el protocol per aïllar cèl·lules SP de teixits primari de pròstata i van trobar que aquests presentaven un $1,38\% \pm 0,07\%$ (n=19) de cèl·lules de la SP.¹⁵⁷

Les vies clàssiques de desenvolupament no han quedat exemptes d'estudi. La via de Hedgehog, essencial en la formació de patrons durant el desenvolupament,¹⁵⁹ juga un paper important en el desenvolupament, progressió i metastàsi del càncer de pròstata.¹⁶⁰ Curiosament, tres grups independents van arribar alhora a conclusions semblants pel que fa a la via de Hedgehog i a la seva implicació en la proliferació del càncer de pròstata.^{50,160,161} Els tres, utilitzant aproximacions diferents, arribaren a la conclusió que la inhibició de la via de Hedgehog provoca una inhibició de la proliferació del càncer de pròstata. Tanmateix, l'article de Karhadkar i col·laboradors va més enllà, tot demostrant que en el seu model, la inhibició de la via de Hedgehog en ratolins després de la castració impedeix la regeneració prostàtica, que la via està fortament correlacionada amb l'aparició de metastasis, que és necessària per a l'expressió de gens relacionats amb les cèl·lules mare com la *nestina* i el gen de la família dels Polcomb, *Bmi-1*, i que l'expressió forçada de la via provoca la transformació maligna d'un subgrup de cèl·lules prostàtiques progenitores. Acaben conclouent, doncs, que l'aparició del càncer de pròstata podria ser conseqüència que una cèl·lula mare quedés atrapada en un estat d'autorenovació constant dependent de Hedgehog.¹⁶⁰

1.2.4 Cèl·lules mare canceroses

El concepte de cèl·lules mare canceroses va ser proposat en un ja clàssic text del 2001 del grup d'Irving L. Weissman.¹⁶² En aquest s'evidencien les similituds entre les cèl·lules mare i les cèl·lules tumorals i es recopilen i s'exposen les proves que recolzen el concepte. Reya i col·laboradors comenten que moltes vies que clàssicament s'han associat amb el càncer també estan relacionades amb el desenvolupament normal de les cèl·lules mare, i postulen que si les vies de senyalització que normalment regulen l'autorenovació porten a la tumorigènesi quan es desregulen, llavors les cèl·lules mare són les dianes de la transformació en determinats tipus de càncer, idea que ja s'havia insinuat a d'altres treballs.^{163,164} També argumenten que les cèl·lules mare tenen la maquinària d'autorenovació activada d'una manera constitutiva, i que mantenir aquesta activació és més fàcil que activar-la *de novo* en una cèl·lula més diferenciada, la qual cosa comporta el fet que es necessiten menys mutacions per mantenir l'autorenovació que no pas per activar-la ectòpicament. A més també expliquen que mitjançant aquesta

autorenovació les cèl·lules mare viuen durant períodes de temps molt llargs, cosa que fa que tinguin moltes més probabilitats d'acumular mutacions que una cèl·lula madura. Aquesta analogia amb l'autorenovació de les cèl·lules mare normals i les cèl·lules tumorigèniques canceroses també es posa de manifest si es té en compte que molts tumors tenen un origen clonal.^{165,166} Per aquesta raó, les cèl·lules canceroses tumorigèniques han de donar lloc a una progènie fenotípicament diversa, amb cèl·lules canceroses amb un potencial de proliferació indefinit, i cèl·lules canceroses amb un potencial proliferatiu limitat o nul, és a dir que mostren un grau de diferenciació diferent, el mateix que passa amb les cèl·lules mare normals. Per això exposen que “les cèl·lules tumorigèniques poden pensar-se com a cèl·lules mare canceroses que pateixen un procés aberrant i poc regulat d'organogènesi anàleg al que fan les cèl·lules mare normals”. També proposen que les cèl·lules tumorals disseminades —de les quals s'ha parlat anteriorment— poden identificar-se amb cèl·lules mare canceroses, que disposarien doncs d'un potencial metastàtic. La resistència als fàrmacs per part dels tumors també hi és discutida: l'adquisició d'aquesta resistència a mesura que el tumor evoluciona és una possibilitat, però també podria ser que els tractaments actuals no fossin efectius contra aquestes cèl·lules mare canceroses. En aquest sentit, l'expressió de transportadors de la família *ABC* (*ATP-binding cassette*) amb funcions en el bombeig de diferents compostos entre els quals fàrmacs anticancerosos, hi juga un paper crucial,¹⁶⁷ paper que es discutirà més endavant. Acaben concluint que “per tal de curar el càncer és necessari i suficient matar les cèl·lules mare canceroses”.

Des de la publicació d'aquest article han estat molts els intents —alguns més reeixits que altres— de donar suport a aquesta teoria mitjançant l'estudi de diferents tipus de tumors i enfocant la identificació d'aquestes cèl·lules de diferents maneres. Així doncs, s'ha parlat de cèl·lules mare canceroses entre d'altres en els càncers de colon,¹⁶⁸ de mama,¹⁶⁹ en leucèmia¹⁷⁰ i en el càncer de pròstata, que es revisarà tot seguit.

1.2.5 Cèl·lules mare canceroses prostàtiques

La idea que el càncer de pròstata pot originar-se a partir de cèl·lules mare prostàtiques es deu a diferents observacions, sobretot amb aquelles relacionades amb la transició a l'estat d'hormonoindependència discutit anteriorment. La progressió a l'hormonoindependència ha portat a pensar que els tumors de pròstata contenen una petita població de cèl·lules que són independents d'andrògens per sobreviure i proliferar i que no es veuen afectades, doncs, per la retirada d'andrògens.¹⁷¹ Per tal com les cèl·lules mare prostàtiques són independents d'andrògens, és lògic de pensar en elles com l'origen d'aquestes cèl·lules canceroses, i diversos estudis recents recolzen aquesta

hipòtesi. Collins i col·laboradors van descriure que la subpoblació de cèl·lules canceroses prostàtiques humanes amb el potencial proliferatiu més elevat *in vitro* és negativa pel receptor d'andrògens i presenta un perfil CD44⁺ $\alpha_2\beta_1$ ^{elevat} CD133⁺, característic de cèl·lules mare prostàtiques normals, juntament amb l'expressió de citoqueratines de cèl·lules basals.¹⁷² Tot i que hom pensa que, a priori, les cèl·lules mare prostàtiques han de ser negatives pel receptor, alguns autors no han arribat a la mateixa conclusió.¹⁷³ Patrawala i col·laboradors, mitjançant l'ús de diferents línies i xenotrasplantaments han demostrat que la població de cèl·lules CD44⁺ dels seus models té una activitat proliferativa més elevada *in vitro*, i que *in vivo* presenta una activitat iniciadora de tumor i metastàtica més elevada.^{174,175} Prèviament ja havien descrit la presència d'una *side population* en un xenotrasplantament de càncer de pròstata i l'expressió d'ABCG2 a diverses línies de càncer de pròstata,¹⁷⁶ conceptes relacionats també amb les cèl·lules mare canceroses de què es parlarà més endavant. Les cèl·lules CD44⁺ també eren negatives pel receptor d'andrògens i presentaven nivells d'mRNA més elevats de gens “troncals” com ara *OCT3/4*, *BMI1*, β -Catenina i *Smoothed*.

L'ús de models animals ha permès realitzar estudis sobre l'inici de la malaltia. Per exemple, en el model murí de *knockout* específic de pròstata de *Pten*, descrit anteriorment, tot i que el *Cre* mitjança la deleció de *Pten* tant a les cèl·lules luminals com a les basals, la progressió de la malaltia s'associa amb una expansió desproporcionada de cèl·lules basals. Aquest fenomen indica que en aquest model el càncer pot ser iniciat i mantingut per cèl·lules primitives de la població basal.¹⁷⁷ També en el *knockout* específic de pròstata *Rb/p53*, el tumor sembla iniciar-se per un subgrup de cèl·lules primitives,¹⁷⁸ ja que els neoplasmes primerencs expressen l'*stem cell antigen-1* (Sca-1) a la regió proximal de la glàndula —l'expressió del qual ja s'havia descrit que identifica cèl·lules mare a la regió proximal dels conductes prostàtics.¹⁷⁹ Tanmateix, a diferència del model de *knockout* per *Pten*, les cèl·lules que comprenen aquestes lesions expressen marcadors luminals i neuroendocrins però són negatives per marcadors de cèl·lula basal com la citoqueratina 5. A més, els autors van observar que tant les cèl·lules proximals com les distals regeneraven els tumors quan eren col·locades sota la càpsula renal de ratolins immunodeficients, cosa que suggeria que hi ha factors microambientals únics a la regió proximal de la glàndula que podrien promoure la formació del càncer en aquest model.

1.3 La població SP

1.3.1 Generalitats

La *side population* (SP), és un conjunt de cèl·lules discriminat per citometria de flux amb capacitat per bombejar certes drogues, xenobiòtics, hormones i altres compostos. Va ser descrita per Margaret A. Goodell, que va demostrar que aquest assaig discrimina una població cel·lular al moll d'os dels ratolins que representa un 0,05% del total però que està enriquida unes 1000 vegades en cèl·lules mare amb potencial de repoblació *in vivo*.¹⁵⁸ Establí la població a partir d'un assaig de citometria de flux en què es féu ús d'un colorant vital, el Hoechst 33342, d'emissió dual en el vermell i el blau, i van observar la capacitat de les cèl·lules per extreure'l o retenir-lo. L'aparició en el citograma d'una població majoritària i una "cua" lateral deguda a la baixa incorporació de colorant va propiciar-ne el nom. A més, també va descriure que l'addició de verapamil, un inhibidor de proteïnes de resistència a multidroges, feia desaparèixer la població, la qual cosa indicava que la població SP és deguda a la presència d'alguna proteïna de resistència a mutidroges (mdr) o semblant.

Cins anys més tard, Zou i col·laboradors descriuen que el principal responsable de la població SP és el transportador ABCG2 o Bcrp1.¹⁸⁰ El grup prèviament havia descrit que la transducció de la glicoproteïna P (Pgp), un transportador de membrana plasmàtica codificat pel gen *MDR1* que es troba en cèl·lules hematopoètiques,¹⁸¹

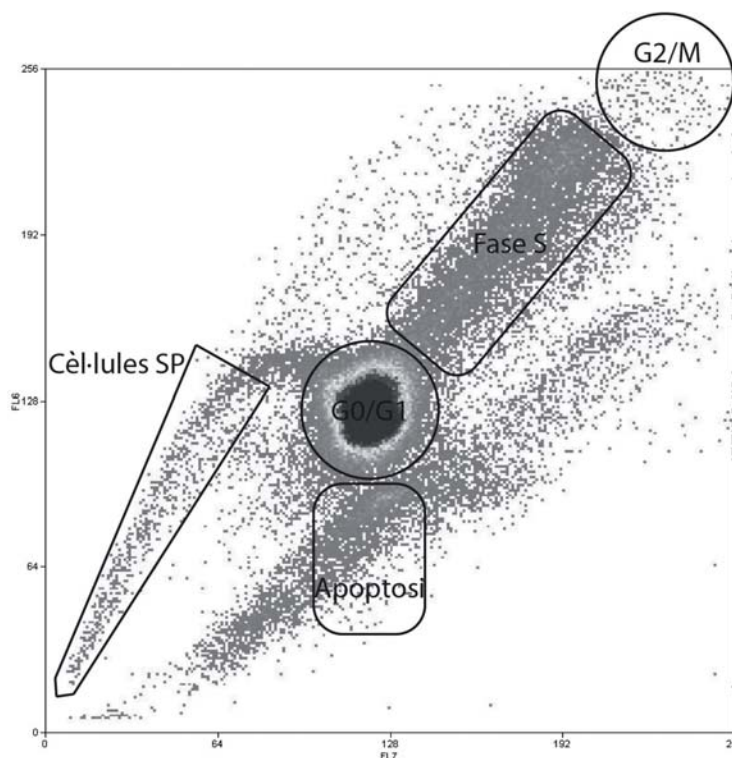


Figura II5: Citograma d'una anàlisi de *side population*. A l'esquerra s'observa la cua que comprèn la població cel·lular que ha incorporat menys colorant i que per tant presenta menys fluorescència pel Hoechst vermell i el blau. Al centre hi ha l'anomenada "població principal", que comprèn les cèl·lules que han incorporat el colorant i que es troben en G0/G1. A sota d'aquestes hi ha les que entren en apoptosi, i a sobre les que estan en fase S. Més amunt les que es troben en G2/M.

comportava una expansió del conjunt de cèl·lules mare,¹⁸² lligada amb un augment de la *side population*.¹⁸³ En aquest nou treball, però, van demostrar, mitjançant l'ús de ratolins amb disrupcions als gens *mdr1a* i *mdr1b*, que *Pgp* no era necessària per al fenotip *SP*, ja que els ratolins mutants no presentaven diferències pel que fa als percentatges de la *SP* respecte dels ratolins control. L'estudi de diferents transportadors de membrana per rtPCR en cèl·lules *SP* separades a partir de ratolins normals i mutants *Mdr1a⁻/1b⁻* els va dur a descriure que les cèl·lules mare hematopoètiques murines expressaven nivells alts de *Bcrp1*. La transfecció d'*ABCG2* en cèl·lules d'osteosarcoma provocava un augment del bombeig de Hoechst, que podia ser inhibit per la reserpina, inhibidor funcional de diversos transportadors ABC. La transducció retroviral d'un altre vector, *HaBCRP*, a cultius de cèl·lules hematopoètiques normals murines va fer augmentar la cua de la *SP* fins un 60% després de 12 dies en cultiu. La injecció d'aquestes cèl·lules transduïdes a ratolins irradiats letalment va confirmar els resultats. La relació entre el fenotip *SP* i l'*ABCG2* va acabar d'establir-se mitjançant el marcatge amb un anticòs contra un domini extern de l'*ABCG2* en cèl·lules vives tenyides per l'assaig *SP*. Aquest marcatge va demostrar una forta correlació entre l'expressió d'*ABCG2* i la població *SP*, i la intensitat de marcatge d'*ABCG2* incrementava a mesura que hom es movia distalment a la porció *SP*, és a dir, hi havia més intensitat de marcatge a la zona més allunyada de la cua. Val a dir, però, que el grup de Torok-Storb va publicar uns resultats molt semblants només quatre mesos després.¹⁸⁴

La combinació dels marcadors descrits per identificar cèl·lules mare hematopoètiques amb capacitat per repoblar a llarg termini¹⁰¹ i l'assaig *SP* va ser duta a terme pel grup de Dominique Bonnet, que va demostrar que les cèl·lules hematopoètiques de la *SP* presenten un fenotip *c-Kit⁺*, *Sca-1⁺*, *Thy-1⁺*, *Cd31⁺*, *Cd135⁻* i lineage⁻.¹⁸⁵

Tot i això, la població *SP* és una població heterogènia i depèn de paràmetres tant experimentals com inherents a les mostres d'estudi,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ la qual cosa exigeix que les condicions experimentals per a l'assaig es posin a punt a cada laboratori.¹⁸⁹

1.3.2 ABCG2

El fenotip *SP* bàsicament el confereix la presència a la membrana cel·lular de transportadors transmembrana del tipus *ABC* (*ATP binding cassette*). Aquests transportadors utilitzen ATP (adenosin-trifosfat) per bombejar els substrats fora de la cèl·lula. Com s'ha comentat anteriorment, el principal responsable del fenotip *SP* és el transportador descrit per Gros,¹⁹⁰ que el grup de Douglas D Ross va anomenar *Breast*

Cancer Resistance Protein (BCRP).¹⁹¹ El gen *BCRP*, que va ser descrit en la línia cel·lular de càncer de mama *MCF-7/AdrVp*, codifica per un transportador transmembrana de xenobiòtics que està relacionat amb la resistència a doxorubicina, mitoxantrona i daunorubicina,¹⁹¹ tres fàrmacs d'ús corrent en quimioteràpia. El Comitè de Nomenclatura de Gens Humans va donar-li el nom formal d'*ABCG2*, el segon transportador de la subfamília G (*white*) dels *ABC*. L'homòleg murí va ser descrit l'any 1999 en un treball en què es demostrava la seva sobreexpressió en fibroblasts murins seleccionats amb topotecan, doxorubicina i mitoxantrona i es remarcava la similitud funcional amb el gen humà.¹⁹² La proteïna presenta un domini d'unió a l'ATP i un domini transmembrana, mentre que la majoria de transportadors de la família en presenten dos de cada, per la qual cosa se l'anomena semi-transportador (*half-transporter*). Per esdevenir funcionalment actiu, doncs, ha de formar un homodímer o homoligòmer.^{193,194}

Quant al gen, s'estén unes 66 quilobases i conté 16 exons i 15 introns. La major part de la regió 5' no traduïda es troba a l'exó 1. El gen humà presenta diferents isoformes generades per empalmament alternatiu ('alternative splicing') i que estan expressades de manera diferent en diferents tipus de cèl·lules i teixits,¹⁹⁵ i el gen murí presenta diferents exons principals la regulació dels quals podria dependre de promotors diferents.¹⁹⁶ El promotor de l'*ABCG2* no té caixa TATA, presenta una caixa CAAT i conté una illa CpG.¹⁹⁷ S'ha descrit que la metilació d'aquesta illa CpG regula la transcripció d'*ABCG2* al carcinoma renal i al mieloma múltiple humà.^{198,199} El promotor també conté un element de resposta a estrògens (ERE),²⁰⁰ tot i que els efectes descrits dels estrògens sobre *ABCG2* són variables.²⁰¹⁻²⁰³

1.3.3 *Side population* i cèl·lules mare canceroses. El cas de la pròstata.

El fet que les cèl·lules de la *side population* bombegin drogues a través de transportadors de la família de resistència a multidroges va fer pensar que els tumors humans podien contenir cèl·lules de la SP canceroses. El 2001, novament el grup de Goodell va descriure que en un 80% dels pacients de leucèmia mieloide que va estudiar hi havia una població SP CD45⁺CD34^{baix/negatiu} que donava lloc a una població de cèl·lules mare hematopoètiques maligna i també als progenitors mieloides.²⁰⁴ Atès que aquestes cèl·lules també bombejaven fàrmacs antileucèmics lipofílics, el grup conclouia que podia tractar-se de cèl·lules mare leucèmiques, possibles responsables de les recidives. Una mica més tard, Hirschmann-Jax i col·laboradors van descriure la presència de cèl·lules de la SP en línies cel·lulars de diferents tipus de tumors humans.²⁰⁵

Quant al càncer de pròstata, els estudis de Bhatt havien descrit la presència de cèl·lules de la *side population* a pròstates humanes no tumorals.¹⁵⁷ Dos anys més tard, Patrawala i col·laboradors van descriure la presència d'una SP del 0,07% al xenotrasplantament de càncer de pròstata *LAPC9*, mentre que aquesta els resultava indetectable a les línies *LNCaP*, *PC-3* i *DU-145*.¹⁷⁶ Malgrat això, sí que detectaven la presència d'unes poques cèl·lules positives per *ABCG2* mitjançant citometria de flux o immunofluorescència. Després de comprovar que l'eficiència amb què les cèl·lules SP tumorals i les no SP formaven tumor un cop injectades en ratolins nusos, van veure que les cèl·lules *ABCG2*⁺ i les *ABCG2*⁻ presentaven eficiències semblants. Els resultats indicaven que les cèl·lules SP tumorals comparteixen l'expressió de gens de cèl·lules progenitores, presenten autorenovació i són capaces de donar lloc a cèl·lules no SP, totes característiques de cèl·lules mare.

Brown i col·laboradors van treballar específicament amb pròstata i van descriure que la SP de pròstata comprèn un grup de cèl·lules basals i van obtenir uns percentatges d'SP en pròstates benignes del $0,93\% \pm 0,12$, mentre que en pròstates malignes aquest percentatge era lleugerament inferior ($0,57\% \pm 0,11$).²⁰⁶ Aquests resultats coincidien en certa mesura amb d'altres obtinguts a l'hora d'aïllar cèl·lules amb fenotip progenitor de mostres de pròstata benignes i malignes.¹⁷²