

# EL CÀNCER DE PRÒSTATA; MÉS VAL PREVENIR QUE CURAR

## MARINA RIGAU RESINA

Unitat de Recerca Biomèdica, Oncologia Translacional

Institut Recerca Hospital Universitari de la Vall d'Hebron

Pg. Vall Hebron 119-139,

08035, Barcelona

## Premi de Comunicació Científica JOAN LLUÍS VIVES

**Modalitat B** (Ciències Bàsiques, Ciències de la Salut, enginyeries i arquitectures)

Basat en el Projecte de tesi “Identificació de marcadors proteòmics en l’orina per a la detecció precoç del càncer de pròstata”. Subvencionat per la “Fundación para a la Investigación en Urología” (FIU-2007) i per la “Red Temática de Investigación contra el Cáncer” (RTICC). Amb finançament personal per part de la Generalitat de Catalunya (2009 TEM 00066), per la “Fundación Francisco Cobos” amb la Beca Eduardo Gallego 2008 i finalment amb una beca per part de la “European Molecular Biology Organization” (EMBO) Short Term Fellowship (ASTF 140-2010).

## INTRODUCCIÓ

Fa 4 dies el món sencer estava alertat per una nova variant de la grip porcina, la Grip A, causada pel virus H1N1. L'11 de juny del 2009 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va classificar aquesta nova grip com a pandèmia. Les autoritats sanitàries de tot el planeta van posar en marxa protocols d'emergència per por que aquesta nova soca viral provoqués més baixes de les esperades. La Directora general de l'OMS, Margaret Chan, advertia el següent *"pot ser que en un mes aquest virus desapareixi-hi, pot ser que quedi com està o pot ser que s'agreugi la situació actual"*.

La taxa de mortalitat de la malaltia, que en un principi va ser elevada, va passar a ser molt baixa després d'iniciar els tractaments amb antivirals. Gairebé 100 anys abans, la "Grip Espanyola", també coneguda com "L'epidèmia de grip de 1918" va causar la mort de 25 a 40 milions de persones a tot el món. Va ser vehiculada per un virus de la mateixa soca que la Grip del 2009, un virus gripal del tipus H1N1.

Una malaltia infecciosa és una manifestació clínica conseqüència d'una infecció provocada per un microorganisme o per prions. Si coneixem quin és el microorganisme que causa la malaltia, en la majoria dels casos, som capaços de combatre'l i, com hem viscut aquest darrer any, pot passar d'ocupar primeres planes dels diaris a desaparèixer de les nostres ments en qüestió de poc temps.

Tots nosaltres coneixem, però, algun amic, amic dels nostres pares o fins i tot hem patit la proximitat d'un familiar afectat per una malaltia, que ha passat a formar part de la nostre societat i que malauradament encara avui en dia no es pot curar, *el càncer*. Què és el càncer? Perquè sembla que tothom deixa aquest món per causa del càncer? Perquè, en un món on la tecnologia i els avenços científics estan a l'ordre del dia, no som capaços de trobar què és allò que fa que la gent mori, a vegades sense adonar-se'n.

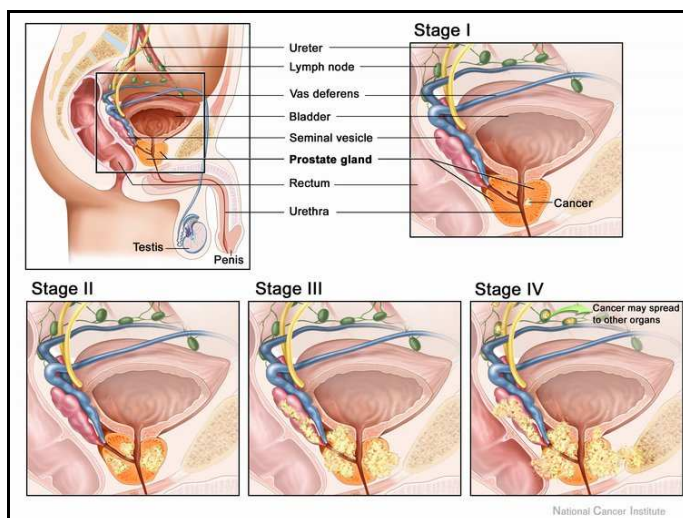
El càncer és la segona causa de mort a Catalunya. Segons l'OMS, el nombre de morts per càncer no para d'augmentar, a nivell mundial. D'aquí al 2030 es calcula que el nombre de morts anualment s'haurà pràcticament doblat, passant de quasi 8 milions de persones el 2007 a 11 milions i mig el 2030.

El càncer és un tipus de malaltia en què, un grup de cèl·lules adquireixen un fenotip que els permet créixer de forma descontrolada i dividir-se més enllà del normal, donant lloc al que anomenem tumors malignes. Alhora aquestes cèl·lules són capaces d'envair cèl·lules veïnes o teixits adjacents i fins i tot d'arribar a altres punts de l'organisme mitjançant el sistema limfàtic o la circulació sanguínia, creant així nous nuclis tumorals, que anomenem metàstasis.

La majoria dels càncers són provocats per anomalies en el material genètic de les cèl·lules canceroses. Les anomalies genètiques poden ser causades per carcinògens externs, els quals es poden adquirir de forma aleatòria, per errors en els sistemes de reparació del material genètic, o bé poden heretar-se, i per tant, estan presents a totes les cèl·lules des del naixement de l'individu.

El diagnòstic definitiu d'aquesta malaltia acostuma a realitzar-se mitjançant l'anàlisi histològica del teixit afectat, el qual s'obté mitjançant una biòpsia. Alhora, existeixen un seguit de marcadors de cribatge (screening), en sèrum, que ajuden al metge en la decisió de realitzar o no aquesta biòpsia. La majoria de càncers quan són detectats en estadis inicials, és a dir, quan aquest està localitzat dintre de l'òrgan i encara no ha envaït teixits adjacents, es poden tractar eliminant el focus tumoral. Però, si el tumor es detecta en estadis ja avançats, en la majoria dels casos no es coneix encara cap teràpia curativa (Figura 1). En la majoria dels casos, el tractament es basa en una combinació de cirurgia, quimioteràpia (administració de tòxics químics) i radioteràpia (radiacions ionitzants), tots ells ataquen d'una forma més o menys directe les cèl·lules canceroses.

**Figura 1:** Exemple dels estadiatges d'un càncer, el càncer de pròstata.



National Cancer Institute.

## EL CÀNCER DE PRÒSTATA, EL DILEMA DIAGNÒSTIC

El càncer de pròstata, és la segona causa de mort per malaltia oncològica en els homes del món occidental. S'estima que un de cada sis homes desenvoluparà un càncer d'aquest tipus al llarg de la seva vida. A Catalunya les dades recollides en un estudi realitzat des del 1998 fins al 2002, a càrrec de l' IRAC (International Agency for Cancer Research), demostren que, el càncer de pròstata és el tipus de càncer més freqüent que afecta a la població masculina.

El càncer de pròstata afecta com el seu nom indica, a la pròstata. La pròstata, és un òrgan glandular de l'aparell genital-urinari masculí. Té la mida d'una nou i es localitza sota de la bufeta, envoltant la uretra i davant del recte. La seva funció és secretar productes que s'afegiran al líquid seminal amb la finalitat de nodrir i protegir els espermatozous.

El diagnòstic actual del càncer de pròstata es basa en una triada diagnòstica que consta de; l'anàlisi dels nivells de PSA (Prostate Specific Antigen) en sèrum, el tacte rectal (TR) i finalment la biòpsia prostàtica. El PSA és una proteïna secretada exclusivament per les glàndules prostàtiques, que participa en la liquació del semen ejaculat. Avui en dia, encara no es coneix si aquesta proteïna juga un paper important en el desenvolupament del càncer de pròstata, però si més no, el seu ús com a marcador d'screening, és conegut i utilitzat mundialment. Des de la seva introducció a finals dels anys 80, el diagnòstic del càncer de pròstata ha millorat significativament i, tot i que la mortalitat deguda a aquest tipus de càncer ha disminuït, segueix sent una de les formes canceroses més mortíferes que ataquen a la nostre societat. Quan els nivells de PSA en sèrum es situen per sobre de 4 ng/mL, l'uròleg pot estimar quina és la probabilitat que el pacient estigui afectat per un càncer. A més a més, juntament amb la palpació de la pròstata a través del tacte rectal, es decideix la necessitat de practicar o no una biòpsia prostàtica, que permetrà establir el diagnòstic definitiu (Taula 1).

**Taula 1:** Resum de la tríada diagnòstica del càncer de pròstata (CP).

PSA en sèrum [ng/mL]	TR - % CP	TR + % CP	Biòpsia
0-2	1	5	no
2-4	15	20	no
4-10	25	45	sí
>10	>50	>75	sí
>20	95		sí

El principal problema del PSA com a marcador d'screening és que aquest presenta un nivell d'especificitat baix, un 33%, i alhora, un valor predictiu negatiu baix. L'especificitat d'una prova es defineix com la probabilitat que un individu sa tingui un resultat negatiu i, el valor predictiu negatiu, com la probabilitat que la malaltia no estigui present quan la prova resulta negativa. Exemplificat de forma numèrica, això implicaria que, de cada 100 pacients que es sotmetin a un test de PSA i tinguin valors superiors a 4 ng/mL, mitjançant la biòpsia es diagnosticaran aproximadament, 66 pacients negatius i només 33 pacients positius per càncer de pròstata.

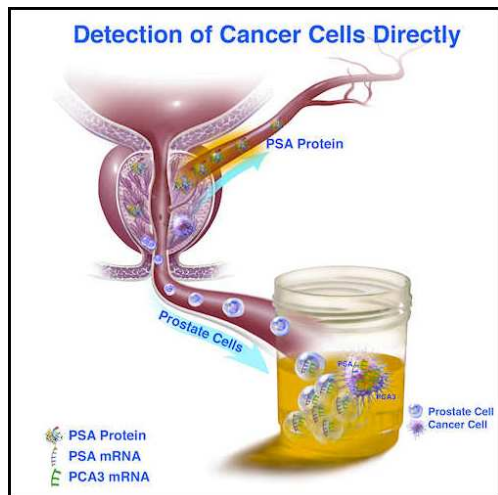
Per tal de detectar aquesta malaltia de forma precoç, s'aconsella que els homes a partir dels 50 anys es facin regularment una anàlisi dels nivells de PSA en sèrum i, quan els nivells del marcador superin els 4 ng/mL o bé quan el pacient tingui antecedents de la malaltia, es realitzarà un tacte rectal per tal de determinar la necessitat de realitzar una biòpsia. El problema és que, així com la societat femenina es sotmet regularment a exàmens ginecològics exploratoris, en la societat masculina existeix un rebuig cap a aquest tipus d'exploracions.

És per tot això, que el càncer de pròstata, es beneficiaria de l'existència de nous marcadors d'screening més específics i alhora d'un diagnòstic menys invasiu. Per altra banda, una millora en el diagnòstic evitaria un gran nombre de biòpsies innecessàries i consegüentment un important estalvi econòmic en el cost sanitari actual.

La recerca de nous marcadors en el càncer de pròstata suposa un camp de treball important en la detecció precoç d'aquest tipus de càncer. Donada la situació de la pròstata a l'organisme, sota la bufeta i envoltant la uretra, les secrecions i inclús les mateixes cèl·lules prostàtiques, ja siguin normals o malignes, poden trobar-se presents en l'orina. És per això que considerem l'orina com una font important d'informació, a través de la qual es podria arribar a determinar quina situació s'està donant a l'òrgan en qüestió.

Altres estudis evidencien l'existència de potencials biomarcadors en l'orina, que podrien ajudar en la millora del diagnòstic del càncer de pròstata (Figura 2). A nosaltres ens ocupa l'estudi d'aquelles molècules proteiques que es troben a l'orina, ja siguin secretades per les cèl·lules prostàtiques o bé de les mateixes cèl·lules que, per descamació, van a parar a l'orina.

**Figura 2:** Detecció de cèl·lules i productes prostàtics a l'orina.



M.A. Reynolds et al., Molecular markers for prostate cancer, Cancer Lett. 2007.

Suposem doncs, que un massatge prostàtic enriqueix la mostra d'orina de tot tipus de molècules proteiques. Així doncs, la nostra hipòtesi de treball recolza que, l'orina després d'un massatge prostàtic pot ser el fluid ideal per a la recerca de nous biomarcadors capaços de discriminar entre pacients amb o sense càncer de pròstata.

## ANÀLISI PROTEÒMICA COMPARATIVA

Al segle XXI ens trobem en plena era de les "òmiques". El terme òmic es refereix a l'anàlisi global dels sistemes biològics. Dins un sistema biològic el "tot" guanya importància sobre les "parts". El proteoma és la imatge dinàmica de totes les proteïnes expressades per un organisme, en un moment donat i sota determinades condicions de temps i ambient. La proteòmica es defineix com l'anàlisi del proteoma.

Les proteïnes són compostos orgànics formats d'aminoàcids arranats en una cadena lineal i units per enllaços pèptids. La seqüència d'aminoàcids que forma una proteïna ve definida per l'ADN, seqüència de nucleòtids del gen que la codifica. Poc després o fins i tot durant la síntesi, els residus d'una proteïna, sovint són modificats químicament per modificacions post traduccional, que alteren les propietats físiques i químiques, el plegament, l'estabilitat, l'activitat i la funció de la proteïna.

El dogma general de la biologia, fins fa poc temps, establia que un gen (DNA) es transcriu a un RNA missatger (mRNA) i posteriorment es tradueix per donar lloc a una proteïna. Avui en dia

es sap que degut al processament alternatiu (splicing), un mateix gen pot donar lloc a diferents proteïnes. Per tant, si el genoma humà consta d'uns 30.000 gens el nombre de proteïnes és exponencialment major. És per això, que avui en dia l'estudi del proteoma, i per tant l'anàlisi proteòmica d'elevat rendiment (High Throughput Analysis), estigui adquirint molta importància en el camp de la recerca.

Els estudis proteòmics es basen principalment amb la tècnica de l'espectrometria de masses amb combinació de mètodes de fraccionament i separació de proteïnes i pèptids (fragments proteics), com l'electroforesis bidimensional (2D-PAGE) o la cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC). L'espectrometria de masses es una tècnica experimental que permet la mesura de ions derivats de molècules (proteïnes i pèptids). Mitjançant aquesta metodologia es poden realitzar anàlisis qualitatives/comparatives però també quantitatives de tot tipus de mostres proteïques.

## **DISSENY EXPERIMENTAL I RESULTATS PRELIMINARS**

Enguegem el nostre projecte a l'Hospital de la Vall Hebron que ens abasteix de totes les mostres que necessitem, clínics dedicats i gent amb moltes ganes de treballar.

L'objectiu principal és arribar a determinar un perfil proteòmic a l'orina capaç de diferenciar entre pacients amb càncer de pròstata i controls sans.

En primer lloc l'estudi requereix d'una recerca exhaustiva d'un grup de pacients, tots ells ben caracteritzats; homes d'edat avançada, que es sotmeten a un diagnòstic ràpid de càncer de pròstata, amb nivells de PSA per sobre de 4 ng/mL i per tant amb una certa probabilitat d'amagar un càncer de pròstata. Classifiquem els pacients en dos grups: *els problemes*, o dit d'una altra manera aquells que pateixen la malaltia (ja sigui en estadis inicials o avançats) i no menys importants, *els controls*, aquells qui no presenten cap anomalia considerable (inflamació aguda o crònica, atròfia proliferativa o lesió preneoplàsica d'alt grau "HG PIN"), en resum, controls sans. De tots ells s'obté una mostra d'orina després de la realització d'un massatge prostàtic. La mostra d'orina es processa d'acord amb el protocol estandarditzat per tal d'extreure la fracció proteica que en forma part. Tots els pacients seleccionats per l'estudi es sotmetran posteriorment a una biòpsia prostàtica, de manera que coneixerem amb certesa quin és el seu diagnòstic definitiu.

La metodologia escollida per dur a terme l'anàlisi comparativa s'anomena Differential in Gel Electrophoresis (DIGE). Aquesta tècnica permet, mitjançant electroforesi bidimensional, separar les proteïnes pel seu pes molecular i per la seva càrrega (punt isoelectric), situant-les en un espai de 2D (gel bidimensional). Alhora, permet marcar les mostres control i problema amb diferents fluorocroms, els quals ens permetran visualitzar les diferents mostres en un mateix gel, i per tant, compara-les entre si. Comparem un total de 9 mostres control amb 9 mostres problema. De l'anàlisi comparativa n'extraïem la informació necessària per tal d'establir quines són les proteïnes (punts situats a l'espai de 2D) que més difereixen entre ambdós tipus de mostres. Determinats els punts més rellevants, els retallem del gel i n'identifiquem el seu contingut, mitjançant espectrometria de masses, és a dir quina proteïna correspon.

Un llistat, vint-i-sis proteïnes a destacar, però quina és la més important? No som capaços de senyalar-la amb el dit ja que podríem errar, potser no és una, potser en són varies plegades o potser ninguna.

Arribats a aquest punt, l'estudi s'endinsa en un experiment de validació. Validar; fer vàlid, verificar, donar validesa... Una validació experimental implica l'obtenció del mateix resultat mitjançant un altre mètode experimental. En aquest cas és important que el mètode seleccionat ens permeti avaluar els nivells de les proteïnes identificades en un gran nombre de pacients. Ha de ser doncs un mètode altament reproducible i molt sensible, capaç de detectar les proteïnes a baixa concentració. Partirem d'un nombre elevat de mostres d'orina, per tal de donar certesa als resultats. Les mostres s'obtenen i es processen de la mateixa manera que anteriorment, però en aquest cas la població no es selecciona sinó que s'agafa a l'atzar, d'aquesta manera podem saber quin és el comportament d'aquestes proteïnes a la població real.

Els resultats que s'obtinguin d'aquest experiment poden ser doncs, concloents, no concloents, i per tant requerir d'una anàlisi encara més minuciosa, o fins i tot no satisfactoris, de moment no ho sabem. Resultats preliminars senyalen que no només serà una proteïna sola sinó un conjunt de proteïnes que a través de l'orina potser podran, algun dia, a ajudar al facultatiu a prendre una decisió, això sí, creiem que sense deixar de banda l'actual marcador diagnòstic, el PSA.

*"Pot ser que ajudi en el diagnòstic, pot ser que finalment no en traiem res i per tant que quedi com està, però en aquest cas la situació no s'agreuja, ja que som molts els qui estem lluitant contra aquesta malaltia, ja sigui patint-la o combatint-la".*