

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

Hospital Pablo Soria, Jujuy, Sanatorio El Carmen, Salta, Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Hospital Papa Francisco, Salta, Laboratorio de Patología y Citodiagnóstico Oncológico, Salta, Centro de Anatomía Patológica, Jujuy, Intergrupo Latinoamericano de Oncología Gastrointestinal, Argentina

### Resumen

MRP4/ABCC4 constituye un potencial biomarcador tumoral. No existen estudios acerca de su expresión en cáncer biliar, una neoplasia de alta morbi-mortalidad en el noroeste argentino. Se evalúa la expresión de MRP4 en cáncer biliar y su correlación clínica.

Este es un estudio retrospectivo en 21 muestras de cáncer biliar. La expresión de MRP4 se midió por inmunohistoquímica, considerando el porcentaje de células marcadas en membrana (0-100%) y su intensidad (1-3); el score se obtuvo multiplicando ambos parámetros (0-300). Para simplificar el análisis se consideró baja expresión a los valores comprendidos entre 0 y 100, y alta expresión a valores entre 101 y 300.

Sobre 17 muestras evaluables, 12 presentaron alta expresión (70.6%) y 5 baja expresión (29.4%) para MRP4. La alta expresión se asoció con: 1) una tendencia a menor supervivencia ( $p=0.1$ ), 2) un 100% de tumores en estadios avanzados, 3) pobre diferenciación histológica, alto grado nuclear y alto índice proliferativo (Ki67).

El cáncer biliar presenta una alta tasa de expresión de MRP4. Se observó una asociación no significativa entre la alta expresión de dicho marcador y menor supervivencia. Estos resultados son coincidentes con ensayos preclínicos en otros tumores donde la sobreexpresión del biomarcador incrementa indicadores de malignidad. Los resultados son alentadores para ampliar el estudio, a fin de establecer el valor pronóstico y/o predictivo de MRP4 en cáncer biliar

**Palabras clave:** MRP4/ABCC4, neoplasias del tracto biliar, inmunohistoquímica

### Abstract

MRP4/ABCC4 constitutes a potential tumor biomarker. There are no studies about its expression in biliary cancer, a neoplasm with high morbidity and mortality in northwestern Argentina. The expression of MRP4 in biliary cancer and its clinical correlation is evaluated.

This is a retrospective study in 21 biliary cancer samples. The expression of MRP4 was measured by immunohistochemistry, considering the percentage of cells with membrane staining (0-100%) and their intensity (1-3); the score was obtained by multiplying both parameters (0-300). For simplification, values between 0 and 100 were considered low expression and values 101 a 300, high expression.

From 17 samples evaluable for MRP4 expression, 12 presented high expression (70.6%) and 5 low expression (29.4%). High expression was associated with: 1) a tendency to lower survival ( $p=0.1$ ); 2) 100% of tumors in advanced stages; 3) poor histological differentiation, high nuclear grade and high proliferative index (Ki67).

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

Biliary cancer presents a high expression rate of MRP4. A non-significant association was observed between high expression of MRP4 and lower survival. These results are consistent with preclinical trials in other tumors where overexpression of the biomarker increases malignancy features. The results are encouraging to expand the study, in order to establish the prognostic and/or predictive value of MRP4 in biliary cancer.

**Key words:** MRP4/ABCC4, biliary tract neoplasms, immunohistochemistry

### Introducción

Desde su descubrimiento en 1957, el nucleótido AMPc (adenosín monofosfato cíclico) ha sido uno de los segundos mensajeros más estudiados en células eucariotes<sup>1</sup>. Numerosos informes indican que se encuentra involucrado en la regulación del crecimiento y diferenciación, tanto de células normales como malignas<sup>2-4</sup>. Por lo tanto, no es sorprendente que sus niveles intracelulares se encuentren finamente regulados.

En los últimos años, a la complejidad de los conocidos mecanismos regulatorios de la señal del AMPc, se ha sumado la extrusión de este segundo mensajero hacia el compartimiento extracelular, proceso mediado por la familia de proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRPs, del inglés multidrug resistance associated proteins)<sup>5-6</sup> y, en particular, por el miembro denominado MRP47. En virtud de que el AMPc no es capaz de difundir a través de la membrana celular, este proceso fue postulado como un mecanismo adicional de regulación de su concentración intracelular<sup>8</sup>. Tradicionalmente, la familia de transportadores ABC o MRP ha sido asociada a la resistencia a fármacos citotóxicos y el consecuente fracaso de múltiples agentes quimioterápicos<sup>9</sup>. Estos transportadores incrementan el eflujo de distintos fármacos, causando una disminución en sus niveles intracelulares e inhibiendo así su acción antitumoral. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren que la implicancia de estos transportadores en la biología tumoral excede al mero transporte de fármacos e incluye la movilización de segundos mensajeros involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular<sup>10,11</sup>.

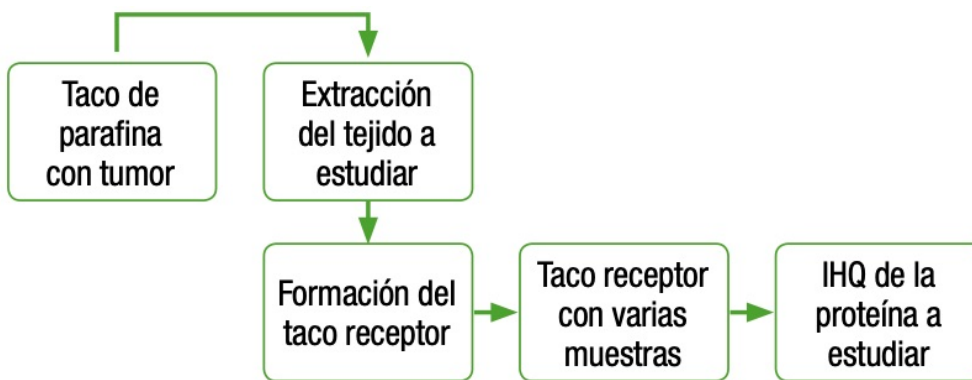
Antecedentes locales obtenidos en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA) describieron que la inhibición de MRP4 en líneas celulares leucémicas incrementa los niveles de AMPc en el espacio intracelular e induce la diferenciación celular y el consiguiente arresto de su proliferación<sup>12,13</sup>. Con posterioridad, numerosos grupos de investigación realizaron estudios de expresión de MRP4 en muestras tumorales de pacientes y lo describieron como un biomarcador pronóstico en diferentes tipos de cáncer: esófago<sup>14</sup>, gástrico<sup>15</sup>, rectal<sup>16</sup>, pulmón<sup>17</sup>, ovario<sup>18</sup>, próstata<sup>19</sup> y neuroblastoma<sup>20,21</sup>. En cáncer de páncreas, la expresión de MRP4 es significativamente mayor en comparación al tejido pancreático normal<sup>22</sup>.

La utilización de TMA (tissue micro array) para analizar la expresión de cualquier marcador por inmunohistoquímica (IHQ), presenta varias ventajas para el procesamiento de los tacos de tumor: su disponibilidad en la mayoría de los centros sanitarios, requiere escasa cantidad de tejido tumoral aumentando así el rédito diagnóstico, y permite analizar un mayor número de muestras simultáneamente en un solo taco de parafina. Todo esto permite optimizar recursos y reducir las diferencias experimentales propias de cada tanda de IHQ (Figura 1).

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

**Figura 1.** Proceso de TMA (tissue micro array) para determinar la expresión de MRP4.



Los tumores de la vía biliar son un grupo heterogéneo de enfermedades que incluye: cáncer de vesícula biliar (CBV), colangiocarcinoma intrahepático, colangiocarcinoma extrahepático y algunas formas de cáncer de ampolla de Vater (CAV). La mayor casuística se comunica en América del Sur (región andina), Japón y Europa Central. Por el contrario, en EE. UU. y el resto de Europa es una enfermedad de rara presentación<sup>23</sup>.

En América del Sur el adenocarcinoma de vesícula biliar es el cáncer biliar (CB) más frecuente, ocupando el quinto lugar entre los tumores digestivos. Suele presentarse en la 6° década de la vida y afecta en mayor medida a mujeres que a hombres (4-6 veces). Su incidencia es extremadamente variable según las regiones geográficas y los grupos étnicos-raciales, incluso en un mismo país<sup>24</sup>.

Argentina no dispone de cifras confiables de incidencia de CVB pero la mortalidad (el registro más completo disponible) se aproxima a la incidencia porque se trata de un tumor de alta letalidad con medianas de supervivencia de sólo un año<sup>25</sup>. Las mayores tasas de mortalidad estandarizadas por edad se registran en el noroeste y sur del país (Figura 2). Jujuy, Salta y Neuquén muestran tasas de 8.9 (95% CI, 7.4- 10.3), 7.0 (95% CI, 6-8) y 4.6 (95% CI, 3.5-5.8)

respectivamente. En Jujuy y Salta constituye la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres. En contraste, en la región pampeana (Entre Ríos, Ciudad Autónoma de Buenos Aires -CABA- y Buenos Aires) dicha tasa es muy baja (2.0).

El pronóstico ominoso del CVB se asocia al diagnóstico tardío, en etapas avanzadas de la enfermedad, donde la terapia sistémica (quimioterapia) y la radiación mostraron resultados poco alentadores aún en términos paliativos<sup>26,27</sup>.

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

Si bien los tumores de la vía biliar afectan a miles de personas en nuestro país cada año, no se han investigado nuevos marcadores pronósticos y/o predictivos con la misma intensidad en comparación a otros tumores ampliamente estudiados. Para cambiar la fatalidad asociada al CB es esencial aplicar medidas sanitarias con nuevas estrategias de tamizaje efectivo en zonas de alta prevalencia, así como también comprender sus características genéticas y moleculares para definir factores pronósticos y predictivos en pos de una terapéutica más eficaz.

No existen comunicaciones en la literatura médica local e internacional sobre análisis de la expresión de la proteína MRP4 en CB. Por lo expuesto hemos decidido analizar la expresión de esta proteína en neoplasias biliares de pacientes procedentes del noroeste argentino y su correlación con parámetros clínicos.

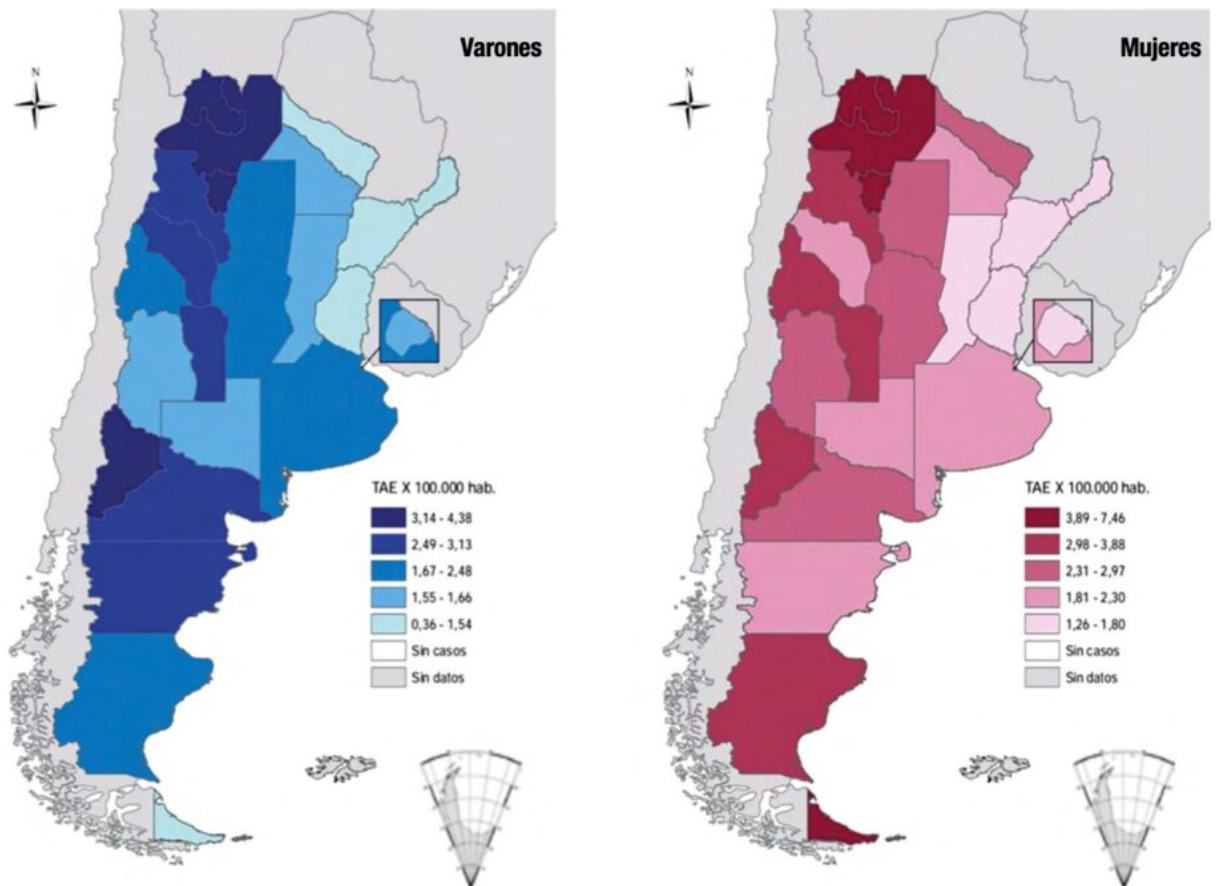
El objetivo primario fue describir la presencia y prevalencia de MRP4 en muestras provenientes de CVB y cáncer de los conductos biliares.

Los objetivos secundarios fueron evaluar una posible asociación entre la expresión de MRP4 y los siguientes parámetros clínicos e histopatológicos: supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP) y tasa de respuesta (TR) en pacientes tratados con quimioterapia, género, grado de diferenciación histológica e índice de proliferación tumoral Ki67.

**Figura 2.** Mortalidad por cáncer de vesícula biliar en varones y mujeres por provincias de Argentina. Tasas ajustadas por edad por 100.000 habitantes por año, años 2011-2015.

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May



TAE: *tasas ajustadas por edad*

### Materiales y métodos

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional, no intervencionista y descriptivo. Se analizaron de forma retrospectiva las historias clínicas y sus respectivas muestras parafinadas de tejido tumoral provenientes de pacientes con CB, hayan recibido o no tratamiento oncológico. Cuando se hallara disponible, se analizó también el tejido peri tumoral y/o metástasis regionales o alejadas, a fin de evaluar el comportamiento del biomarcador propuesto en el tumor primario, sus metástasis y tejidos peri tumorales en un mismo paciente. Los pacientes vivos al momento del reclutamiento firmaron un consentimiento para su participación en el ensayo. Se respetaron las normas legales y éticas internacionales, nacionales y provinciales, contando con la aprobación de los comités de docencia y de bioética ministeriales de las provincias participantes.

En esta primera instancia, se analizó un número limitado de muestras con sus respectivas historias clínicas. En caso

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

de observarse positividad en la expresión de la proteína MRP4, se procederá a una segunda parte del trabajo, en la cual se incorporará mayor número de casos para poder realizar pruebas estadísticas robustas de correlación con parámetros clínicos de valor pronóstico.

La codificación de las muestras estuvo a cargo de los médicos oncólogos tratantes, quienes en forma confidencial, reemplazaron la identidad de los pacientes por un código alfa-numérico previamente definido. Los demás investigadores y/o colaboradores, tuvieron acceso a los datos codificados pero no a los datos sensibles de cada paciente.

Los centros de salud de las provincias de Jujuy y Salta enviaron los tacos de parafina con CB, codificados, al laboratorio del ININFA en CABA para el estudio de la proteína MRP4.

Para la evaluación de la expresión de MRP4 se utilizó la técnica de IHQ, con la que el laboratorio de investigación tiene vasta experiencia. Dicha estrategia ha sido puesta a punto y validada previamente en modelos animales y muestras procedentes de tejido pancreático. Los ensayos de IHQ fueron analizados a doble ciego por al menos dos médicos patólogos para disminuir la posibilidad de variaciones experimentales entre cada determinación IHQ. Para ello se construyeron TMA, con los cuales se procesaron las muestras pareadas por tanda (con porción tumoral y peri tumoral). Luego de su procesamiento, los tacos de parafina utilizados fueron devueltos a los centros de origen.

En todas las muestras se realizó un exhaustivo análisis cito - morfológico basado en la coloración de hematoxilina y eosina (H&E). En los casos donde se consideró necesario, se incluyó alguna coloración especial para poner de manifiesto, por ejemplo, el estroma tisular.

Se determinaron los siguientes parámetros: 1-Nivel de expresión y localización celular y subcelular del biomarcador en estudio MRP4. 2-Posibles diferencias del nivel de expresión del biomarcador MRP4 en un tumor biliar primario, tejido peri tumoral y/o sus metástasis regionales o a distancia.

Para la construcción del TMA, en primer lugar, se seleccionaron los tacos parafinados originales y sus respectivos cortes coloreados con H&E para hallar el área de interés. Una vez marcada sobre el corte teñido con H&E, se identificó la misma área en el taco de parafina y se procedió a tomar la muestra con aguja tipo sacabocados de 3 mm. Finalizada la selección, se derritió la parafina del taco y de los cilindros en estufa a 60°C hasta obtener un tacohomogéneo. Luego se obtuvieron los cortes coloreados y en blanco para proceder a realizar las técnicas planificadas (Figura 1).

Del bloque "receptor" construido se obtuvieron secciones de 3 µm, que fueron desparafinadas y rehidratadas. Luego de inhibir la peroxidasa endógena, los tejidos obtenidos fueron tratados con buffer de recaptura a temperatura de 96° C para poner de manifiesto el epítipo antigénico. Luego de un bloqueo con BSA (de su acrónimo en inglés, albúmina sérica bovina) al 2.5% se incubaron con el anticuerpo primario. Posteriormente se lavó el anticuerpo primario, se incubó con el anticuerpo secundario y se reveló con 3-3'diaminobencidina (DAB, Sigma). Como control de especificidad de la señal se omitió el anticuerpo primario, reemplazándolo por PBS (de su acrónimo en inglés, buffer fosfato salino). Además, se utilizaron controles positivos para cada uno de los anticuerpos.

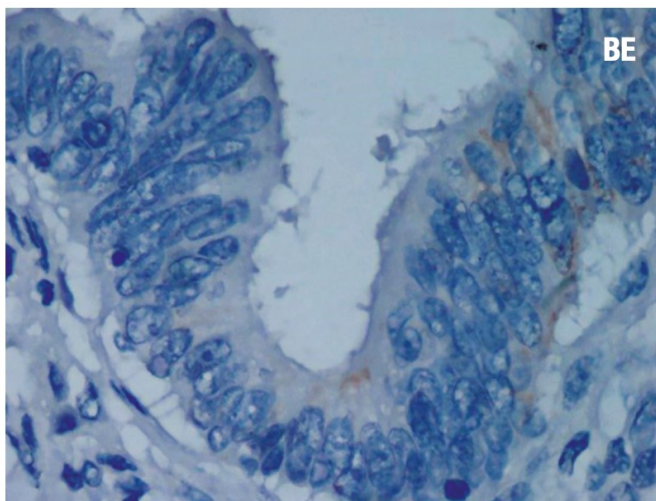
Para cada muestra se cuantificó el número de células marcadas y fue expresado como el porcentaje de células positivas en función del número total de células. La intensidad de la marcación también fue determinada y definida

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

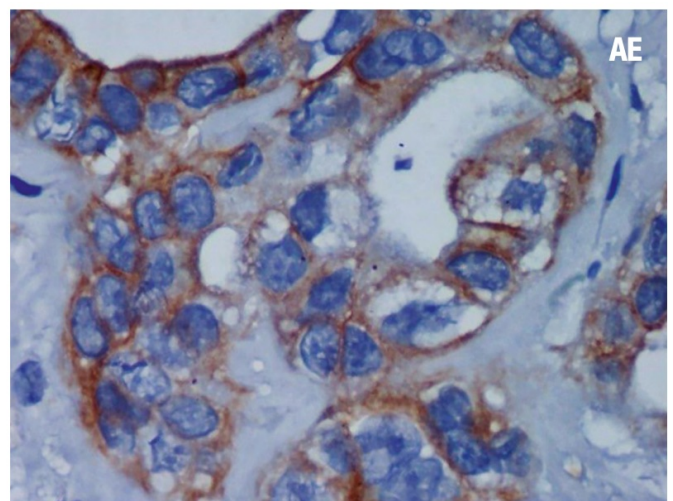
Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

como 0 = marcación ausente, 1 = marcación débil, 2 = marcación moderada y 3 = marcación fuerte. Multiplicando ambos parámetros mencionados se calculó una puntuación, que consistió en un valor comprendido entre 0 a 300. Dichos valores fueron segmentados en 2 grupos (Figura 3): baja expresión de MRP4 (BE: para valores entre 0 y 100) y alta expresión de MRP4 (AE: para los valores comprendidos entre 101 y 300). Esta disposición permitió dicotomizar el análisis de los resultados y correlacionarlos con datos clínicos, algunos asociados a variables pronósticas definidas como SG, estadio tumoral (7ma clasificación TNM de la UICC y OMS -Unión Internacional Contra el Cáncer y Organización Mundial de la Salud), género masculino o femenino, valor de Ki67 y grado de diferenciación tumoral.

**Figura 3.** Inmunohistoquímica. Baja (BE) y alta expresión (AE) de MRP4 en muestras de cáncer biliar



MRP4: BE. TMA #1 posición C1, 1000x



MRP4: AE. TMA #6 posición A1, 1000x

Las variables pronósticas provenientes de las historias clínicas y los resultados de la IHQ se cargaron en una base de datos confeccionada para tal fin. Se calcularon datos estadísticos descriptivos de tendencia central y dispersión (media aritmética y error estándar). Por el tamaño de la muestra los datos fueron tratados con test no paramétricos. Entre los test utilizados se incluyen el análisis de Kaplan Meier para valorar supervivencia en todos los pacientes y en los subgrupos según factores clínicos y patológicos. La comparación entre curvas de supervivencia en los casos con HE y BE de MRP4 se realizó a través del método log-rank. En caso de observarse una tendencia en la SG y la expresión de MRP4 se procedió a ampliar el tamaño de la muestra en estudio para aplicar test paramétricos de mayor significancia estadística. Las figuras y tablas que presentaron datos de porcentajes fueron calculadas en relación al total de los pacientes estudiados. Se consideró un riesgo aceptado de  $p < 0.05$ .

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

### Resultados

Se enviaron 21 muestras con CB de las provincias de Jujuy y Salta para su procesamiento y análisis. Se desestimaron cuatro casos, tres por ausencia de tumor viable en la muestra enviada y uno por pérdida de seguimiento clínico del paciente. De los 17 casos analizados, 15 correspondían a AVB, uno a colangiocarcinoma y uno a CAV.

Las características clínicas e histopatológicas de los casos analizados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características clínicas y patológicas (n=17)



## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

<b>Parámetros clínicos</b>	<b>Número de casos (%)</b>
<b>Edad</b>	
Media	62.8
Rango	51-80
<b>Género</b>	
Mujeres	13 (76.5)
Varones	4 (23.5)
<b>Estadio TNM</b>	
IA	3 (17.6)
IB	2 (11.8)
II	6 (35.3)
III	2 (11.8)
IV	4 (23.5)
<b>Origen anatómico tumoral</b>	
Cáncer de vesícula biliar	15 (88.2)
Cáncer de vía biliar	2 (11.8)
<b>Grado de diferenciación</b>	
1	2 (11.7)
2	13 (76.5)
3	1 (5.9)
NI	1 (5.9)
<b>Histología</b>	
Adenocarcinoma	17 (100)

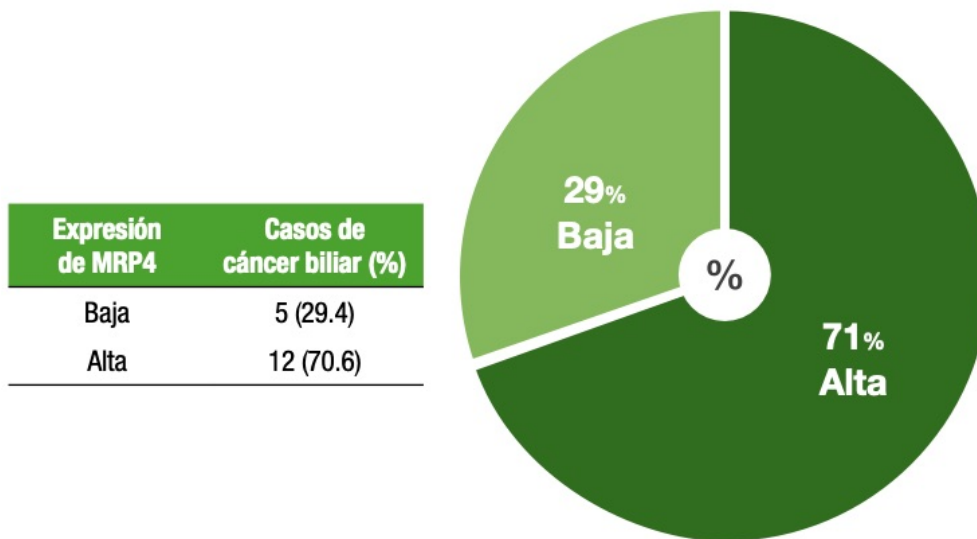
*NI: no informado*

Doce muestras de tumor biliar presentaron AE de MRP4 (70.6% de la totalidad de los casos) y 5 tumores mostraron BE correspondiente a un 29.4% de los pacientes (Figura 4).

**Figura 4.** Diferencias en la expresión de MRP4 en cáncer biliar (n=17)

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

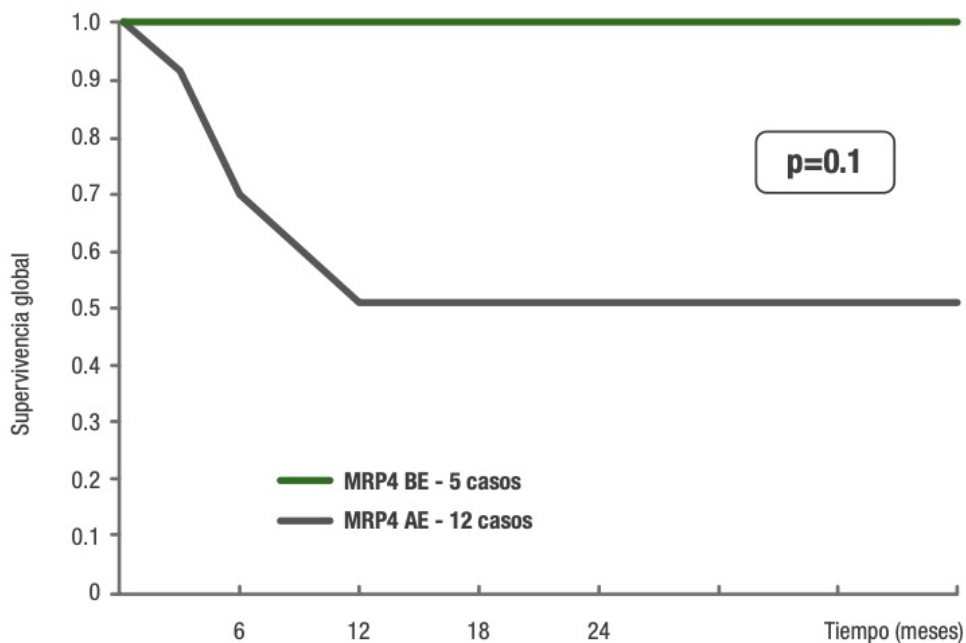


Se halló una tendencia a menor supervivencia en los casos con expresión elevada de MRP4. La supervivencia media para el grupo con AE fue de 12 meses, mientras que no se alcanzó para el grupo con BE. La comparación de las curvas de SM con el método de log-rank mostró una diferencia no significativa ( $p = 0.1$ ) (Figura 5).

**Figura 5.** Curva de Kaplan Meier para supervivencia global (SG) en meses (m) según expresión de MRP4 (n=17).

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May



Debido al bajo número de muestras provenientes de pacientes de género masculino (4 casos de 17) y grado histológico III (2 casos de 17), no fue posible establecer una tendencia de correlación entre la expresión de MRP4 y estos indicadores clínicos. Del mismo modo, la mayoría de los casos comunicados correspondían a neoplasias en estadios tempranos (10 de 17 casos, el 59% de la muestra analizada, representaron estadios I y II) con un seguimiento menor a un año desde el diagnóstico oncológico, por lo cual no se pudo estudiar la correlación entre la expresión de MRP4 con la SLP y la TR a la quimioterapia.

La expresión de MRP4 fue alta (AE) en los 6 casos informados (100%) con cáncer avanzado (estadios III y IV), mientras que solamente el 55% de los casos (6 de 11) con cáncer temprano (estadios I y II) presentaron AE.

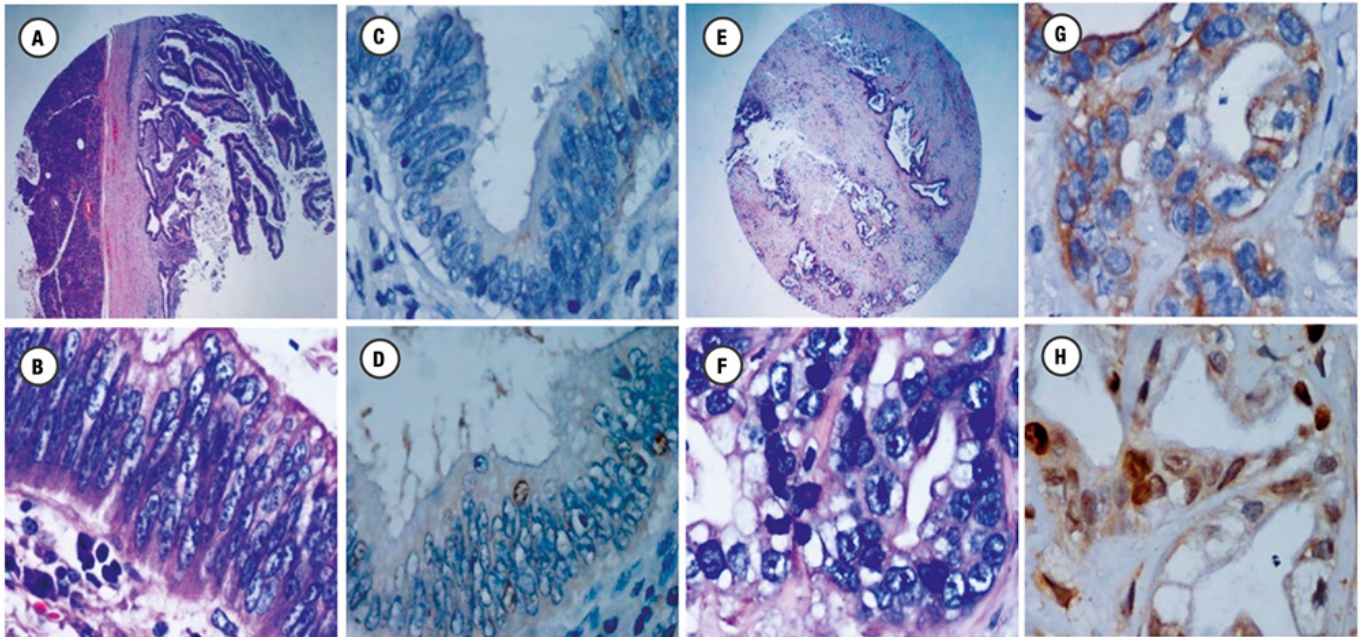
En cuanto a las características morfológicas de la muestra tumoral, se halló una relación proporcional, entre la AE de MRP4, grado histológico y nivel de ki67. En efecto, se observó

mayor expresión de MRP4 en tumores con grado histológico III y en aquellos con valor elevado de Ki67 (Figura 6).

**Figura 6.** MRP4 y Ki67 en cáncer biliar de bajo (A, B, C y D) y alto (E, F, G y H) grado de diferenciación histológica

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May



A. H&E TMA #1 posición C1, 4x  
B. H&E TMA #1 posición C1, 1000x  
C. MRP4 TMA #1 posición C1, 1000x  
D. Ki67 TMA #1 posición C1, 1000x

E. H&E TMA #6 posición A1, 4x  
F. H&E TMA #6 posición A1, 1000x  
G. MRP4 TMA#6 posición A1, 1000x  
H. Ki67 TMA#6 posición A1, 1000x

### Discusión

En el presente ensayo, el objetivo principal de hallar diferencias en la expresión de la proteína MRP4 en neoplasias biliares, fue cumplido. Observamos que aproximadamente un 70% de los carcinomas biliares de las muestras estudiadas presentan una AE de dicha proteína.

Se observó una tendencia inversa aunque no significativa entre la expresión de MRP4 y la supervivencia en pacientes con CB.

Esto es consistente con la función de la proteína MRP4 como facilitador de características de malignidad: invasión, proliferación y capacidad metastásica. El análisis de las curvas de supervivencia de Kaplan Meier a través del test log-rank no contempla las variables que confunden dado que no es una prueba multivariable, por ejemplo la

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

supervivencia más prolongada en tumores con BE puede relacionarse al estadio tumoral y no a la BE en sí misma. Esta consideración sumada al pequeño tamaño de la muestra, hacen necesario que esta tendencia hallada se confirme con un número mayor de casos. Ese es el objetivo de la segunda parte de nuestro trabajo. Por la misma razón, no hemos podido realizar el análisis multivariado para estudiar la correlación entre la expresión de MRP4 y la TR, la SLP, el grado de diferenciación, el género y el nivel de expresión de Ki67.

Una AE de MRP4 se observó con mayor frecuencia en tumores con pobre diferenciación y alto índice mitótico, medido con el marcador de proliferación Ki67. Estos datos son concordantes con los ensayos preclínicos publicados en otros trabajos, donde la expresión elevada de MRP4 incrementa algunos parámetros de malignidad tumoral. Ciertamente, la AE de MRP4 confiere un efecto proliferativo en diversos tumores (páncreas, mama, próstata, pulmón), tanto en modelos in vivo como in vitro. Su desregulación podría representar una ventaja adaptativa asociada al mal pronóstico de los tumores que lo expresan.

En resumen, la proteína MRP4 tiene AE en muestras de CB. La AE puede tener valor pronóstico y se correlacionaría con la diferenciación tumoral y el índice proliferativo tumoral medido por el marcador Ki67. Si se confirma la correlación entre la expresión de MRP4 y la supervivencia, y se muestra correlación entre la expresión de MRP4 y la respuesta a la quimioterapia en un mayor

número de casos, su determinación por IHQ tendría un potencial valor para la selección de pacientes en ensayos clínicos con nuevos medicamentos, para la búsqueda de nuevos fármacos que modifiquen la función de la proteína y para aumentar la selectividad de los distintos antineoplásicos, constituyéndose idealmente como un factor pronóstico, factor predictivo y como blanco terapéutico en CB, enfermedad frecuente en el oeste argentino y con falta de tratamientos eficaces.

**Conflicto de intereses:** Ninguno para declarar

### Bibliografía

1. Karim M. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 415-24.
2. Taskén K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004; 84:137-67.
3. Shayo C, Legnazzi B, Monczor F, et al. The time-course of cyclic AMP signaling is critical for leukemia U-937 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 798-804.
4. Schmitt JM, Stork PJ. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3671-83.
5. Borst P, Evers R, Koel M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1295-302.
6. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporter in clinical practice. *Oncologist* 2003; 8: 411-24.
7. Sassi Y, Hara Y, Lompré AM, Hulot JS. Multi-drug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) and cyclic nucleotides signaling pathways. *Cell Cycle* 2009; 8: 962-3.
8. Yanoff A, Sahores A, Gómez N, Carozzo A, Shayo C, Davio C1. MRP4/ABCC4 as a new therapeutic target: meta-analysis to

## Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del Noroeste Argentino

Carolina Ituarte, Gerardo Arroyo, Cristina Inklemona, Carlos Nuñez, Estela Barros, Rodrigo Maroni, Marcelo Montero Alvi, María Virginia Bürgesser, Oscar Marin, Carlos Davio, Ana Sahores, y María May

- determine cAMP binding sites as a tool for drug design. *Curr Med Chem* 2019; 26: 1270-307.
9. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signaling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 200-7.
  10. Gatti L, Beretta G, Cossa F, Zunino F, Perego P. ABC transporters as potential targets for modulation of drug resistance. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 1102-12.
  11. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporter in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 147-56.
  12. Copsel S, García C, Diez F, et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 2011; 286: 6979-88.
  13. Copsel S, Bruzzone A, May M, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2014; 5: 9308-21.
  14. Sun Y, Shi N, Lu H, et al. ABCC4 copy number variation is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2014; 35: 1941-50.
  15. Zhang YH, Wu Q, Xiao XY, Li DW, Wang XP. Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Lett* 2010; 291: 76-82.
  16. Yu ZQ, Zhang C, Wang H, et al. Downregulation of ATP- binding cassette subfamily C member 4 increases sensitivity to neoadjuvant radiotherapy for locally advanced rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2013; 56: 600-8.
  17. Zhao X, Guo Y, Yue W, Zhang L, Gu M, Wang Y. ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 343-51.
  18. Bagnoli M, Beretta G, Gatti L, et al. Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 143202.
  19. Ho LL, Kench JG, Handelsman DJ, et al. Androgen regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 1421-9.
  20. Norris MD, Smith J, Tanabe K, et al. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 547-53.
  21. Huynh T, Norris MD, Haber M, Henderson MJ. ABCC4/ MRP4: a MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma. *Front Oncol* 2012; 2: 178.
  22. Zhang Z, Wang J, Shen B, Peng C, Zheng M. The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy. *Gene* 2012; 491: 194-9.
  23. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al (2018). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. En: <https://gco.iarc.fr/today>; consultado 6/5/2019.
  24. Arroyo GF, Gentile A, Parada LA. Gallbladder cancer: South American experience. *Chin Clin Oncol* 2016; 5: 67.
  25. Macías G, Limardo L, Abriata M. Atlas de mortalidad por cáncer en Argentina 2011-2015, 1a ed, 2017. Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer.
  26. Valle J, Wasan H, Palmer DH, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1273-81.
  27. Uribe M, Heinet C, Brito F, Bravo D. Actualización en cáncer de vesícula biliar. *Rev Med Clin Condes* 2013; 24: 638-43.