

La expresión de S100A9, vinculada con el óxido nítrico, es un marcador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de vejiga, siendo su inhibición un posible blanco terapéutico

S100A9 expression associated with nitric oxide is a good marker of prognosis in patients with bladder cancer: its inhibition as a potential therapeutic target

Yanina Langle^{*a}, Eduardo Sandes^{*a}, Denise Belgorosky^{1a}, Natalia Balarino^{2a}, Bárbara Prack Mc Cormick^{1a}, Lina Marino^b, Erica Rojas Bilbao^b, Leonardo Pasik^c, Héctor Malagrino^c, Alberto Casabé^c, Ana María Eiján^{3a}

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Avenida San Martín 5481-CABA.

^{*}Comparten la primer autoría. ^aÁrea de Investigación – Departamento de Inmunobiología. ^bDepartamento de Anatomía Patológica.

^cDepartamento de Urología. ¹Becaria de CONICET, ²becaria del INC, ³investigador de CONICET.

El óxido nítrico (NO) es producido por las enzimas NO sintasas (NOS). Anteriormente describimos que la isoforma inducible (iNOS) se expresa en el 50% de los cánceres de vejiga (CaV) humanos, asociada a recurrencia e invasión. La producción de NO puede alterar la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral. Utilizando el modelo de CaV murino MB49 que genera tumores no músculo invasores (NMI) y expresa iNOS identificamos que el tratamiento con el inhibidor de la producción de NO, L-NAME, redujo la expresión de la proteína S100A9, vinculada a la generación de una respuesta inmune supresora mediante el reclutamiento de células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSC).

Objetivos: Evaluar 1) S100A9 como marcador pronóstico en pacientes con CaV. 2) La inhibición de NO como blanco terapéutico utilizando el modelo murino, enfocándonos en la expresión de S100A9, las MDSC y el crecimiento tumoral solo o bajo tratamiento con BCG.

Identificamos que S100A9 se expresa en células tumorales y células inmunes que infiltran los tumores (células acompañantes). Detectamos una correlación positiva entre iNOS y S100A9 en las células tumorales, sugiriendo que su expresión estaría vinculada. Los tumores invasores presentan mayor número de células acompañantes positivas para S100A9, en comparación con los tumores NMI ($p < 0,05$). Este infiltrado es a predominio de monocitos/macrófagos (CD14) en los tumores NMI ($p < 0,01$), mientras que en los invasores hay un nivel similar de células CD14 y CD15 (granulocitos).

En el modelo MB49, demostramos que L-NAME redujo el crecimiento tumoral ortotópico (46% de los ratones presentaron remisión completa) y la expresión de S100A9 en los tumores. Observamos que el número de MDSC en ganglio y bazo estaba aumentado y que los valores solo se normalizaban bajo tratamiento combinado de BCG+L-NAME.

Conclusión: Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la inhibición del NO es un buen blanco terapéutico reduciendo en parte la generación de una respuesta inmune supresora. La expresión de S100A9 en células inmunológicas es un buen marcador de progresión tumoral, asociado a la producción de NO.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de vejiga, óxido nítrico, S100A9, células supresoras derivadas del linaje mielóide.

Nitric oxide (NO) is produced by the NO synthases (NOS) enzymes. We have previously described that iNOS, the inducible isoform of NOS, was expressed in the 50% of human bladder cancers (BCa). This was associated with tumor recurrence and invasion. Using the murine BCa model MB49 that generate non-muscle invasive bladder tumors (NMI) and that express iNOS, we identified that treatment with L-NAME (a NO production inhibitor) reduced S100A9 protein expression. This protein triggers a suppressive immune response through myeloid-derived suppressor cells (MDSC) recruitment.

Objectives: To evaluate 1) S100A9 expression as a prognostic marker in patients with BCa. 2) Inhibition of NO as a therapeutic target using the murine BCa model, focusing on S100A9 expression, the number of MDSC and tumor growth, with or without BCG treatment.

We have identified that S100A9 was expressed in MB49 tumor cells and in the immune cells that infiltrate tumors. We found a positive correlation between iNOS and S100A9 expression in tumor cells, suggesting that its expression would be linked. Invasive tumors have a higher number of immune cells that infiltrate tumors that were positive for S100A9 compared with the NMI tumors ($p < 0,05$). This immune cells were predominantly monocytes/macrophages (CD14) in the NMI tumors ($p < 0,01$), while we found no differences between CD14 and CD15 cells (granulocytes) in invasive tumors.

L-NAME reduced orthotopic tumor growth (46% of mice showed complete tumor remission) and S100A9 expression. We have noted that the number of MDSC in spleen and lymph nodes were increased in tumor-bearing mice compared with control mice. Only the combined treatment of BCG+L-NAME normalized the number of MDSC.

Conclusion: These findings support the hypothesis that the inhibition of NO is a good therapeutic target for BCa as it reduces the generation of a suppressive immune response. Otherwise S100A9 expression in immune cells is a good marker of tumor progression, associated with NO production.

KEY WORDS: Bladder cancer, nitric oxide, S100A9, myeloid-derived suppressor cells.

Aceptado en Marzo de 2014
Conflictos de interés: ninguno

Accepted on March 2014
Conflicts of interest: none

Correspondencia
Email: anamariaejan@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga (CaV) es el segundo tumor más frecuente del tracto urogenital masculino¹. El 90% de los CaV son de origen transicional, es por ello que en lo sucesivo emplearemos el término CaV para referirnos a tumores transicionales. Al momento del diagnóstico, el 75% de los CaV son no músculo invasor (NMI), y la resección transuretral es el tratamiento de elección para estos pacientes². La inmunoterapia con el Bacilo Calmette Guérin (BCG) es el tratamiento recomendado para pacientes que presentan carcinomas *in situ* o tumores localmente avanzados, altamente recidivantes o de alto grado histológico, sin embargo algunos pacientes no responderán satisfactoriamente al tratamiento. A pesar de la detección temprana en un estadio NMI, y de la realización de un tratamiento adecuado, alrededor del 20% de los pacientes presentarán recidivas con o sin progresión a la invasión muscular. Los pacientes con tumores invasores tienen un riesgo del 50% de desarrollar metástasis en los 2 años y el 60% morirán dentro de los 5 años. En base a esto es clara la necesidad de identificar nuevos marcadores de pronóstico que indiquen qué pacientes serán refractarios a los tratamientos y cuáles de ellos progresarán hacia un estadio invasor. Esto permitirá orientar terapias más efectivas en los inicios de la enfermedad, así como identificar nuevos blancos terapéuticos para un tratamiento personalizado y más racional.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre producido por las enzimas NO sintasas (NOS). Anteriormente identificamos a la expresión de la isoforma inducible de las NOS (iNOS), enzima productora de altos niveles de NO, como un marcador de mal pronóstico en el CaV ya que se podía asociar a la disminución del tiempo libre de recurrencia e invasión tumoral^{3,4}. También identificamos que el NO producido por las células tumorales puede detectarse en la orina de aquellos pacientes que expresan iNOS y que su concentración puede ser usada como marcador de presencia tumoral³. La expresión de la enzima iNOS y, en consecuencia, la producción de NO pueden a su vez modificar mecanismos biológicos alterando la expresión de proteínas, así como el perfil inmunológico del paciente, con cambios que se vinculan con la progresión tumoral. En base a estos

antecedentes se podría plantear a la inhibición de la producción de NO como un blanco terapéutico en pacientes cuyos tumores expresan iNOS.

Mediante un estudio proteómico utilizando el modelo murino de CaV MB49⁵, hemos demostrado que el tratamiento con L-NAME, inhibidor de la producción de NO, disminuye la expresión de la proteína inmunomoduladora S100A9^{6,7}. Esta proteína puede expresarse tanto en células tumorales como en células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSC).

En humanos, las células supresoras derivadas de la serie mielóide se dividen en dos linajes: granulocítico y monocítico que expresan CD15 y CD14, respectivamente. En ratones, las MDSC se reconocen por la expresión de CD11b y GR1. Éstas son células inmaduras provenientes de la médula ósea que suprimen la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. Son capaces de inhibir la presentación antigénica así como la función de los linfocitos T a través de la producción de NO y de especies reactivas del oxígeno. La serie monocítica está asociada con un incremento en la actividad de iNOS y de la enzima arginasa (ARG), mientras que la serie granulocítica se asocia a la expresión y actividad solo de ARG⁸.

Nuestra hipótesis es que la expresión de S100A9 podría ser un marcador de mal pronóstico asociado al reclutamiento de MDSC y que la inhibición de la producción de NO es un blanco terapéutico que puede inhibir el crecimiento tumoral y mejorar la respuesta inmune disminuyendo el número de MDSC.

OBJETIVO

Evaluar en muestras de pacientes la expresión de S100A9, iNOS y ARG, en células tumorales y en células del sistema inmune que infiltran los tumores como posibles marcadores de progresión. Estudiar a la inhibición de la producción de NO como blanco terapéutico en el modelo murino de CaV MB49 y su capacidad de modificar el número de MDSC en el ganglio y el bazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios en muestras humanas: Se utilizaron cortes de parafina (archivo del Departamento de Pato-

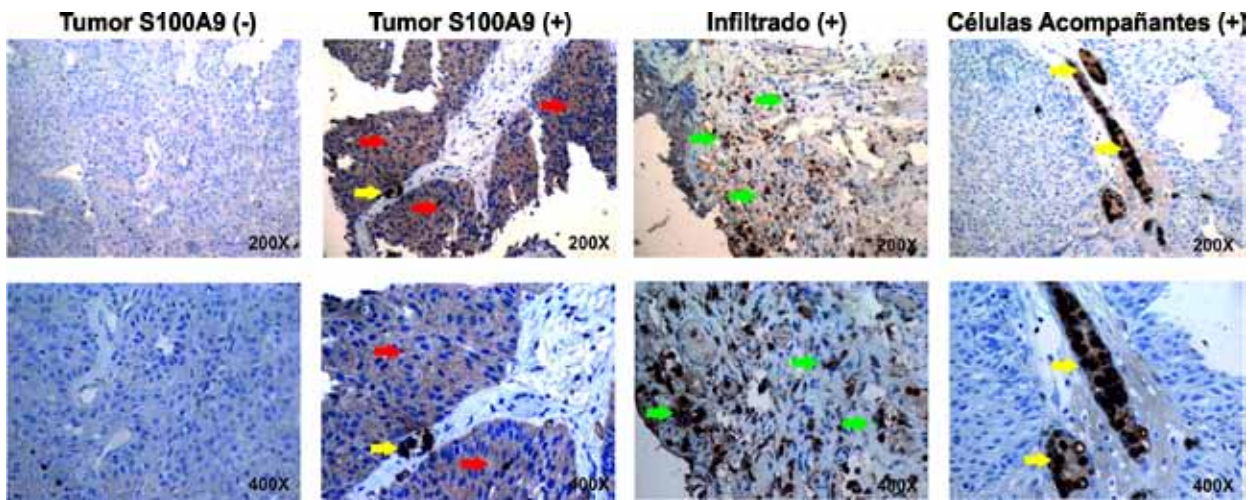


Figura 1. Expresión de S100A9 en el CaV humano. La expresión de S100A9 determinada por inmunohistoquímica se detectó en el citoplasma de las células malignas de los tumores de vejiga (flecha roja), en células mieloides dentro de los vasos que irrigan al tumor (flecha amarilla) y en células inmunes que infiltran el tumor (también denominadas como células acompañantes: flecha verde).

logía del Instituto Ángel H. Roffo, de los años 1996 a 2007) 19 tumores, 12 NMI y 7 invasores (INV), (17 hombres y 2 mujeres, edad media 60 años, rango de 42 a 78 años). Se analizó la expresión de iNOS, ARG, S100A9, CD14 y CD15 por inmunohistoquímica, con anticuerpos primarios específicos: anti-iNOS (Abcam ab-15323 1:1200), anti-ARG (Santa Cruz Biotechnology sc-20150, 1:140), anti-S100A9 (Novus Biological NB110-89726, 1:30.000), anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotilado (Vector Laboratories, Inc, 1:500). Para identificar células mieloides que infiltran el tumor del linaje monocítico o granulocítico se emplearon los anti-

cuerpos anti-CD14 y CD15, respectivamente (Dako Laboratorios, 1:300). El ensayo ha sido aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo y cumple con las normas éticas incluidas en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

Estudios en el modelo murino: Ratones C57BL/6J fueron inoculados con la línea MB49 y fueron tratados +/- BCG (2 mg/ml) intratumoral y +/- L-NAME (0,1 mg/kg ratón/día) en el agua de la bebida (L-NAME = N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma-Aldrich N5751-10G). El crecimiento tumoral subcutáneo se evaluó por

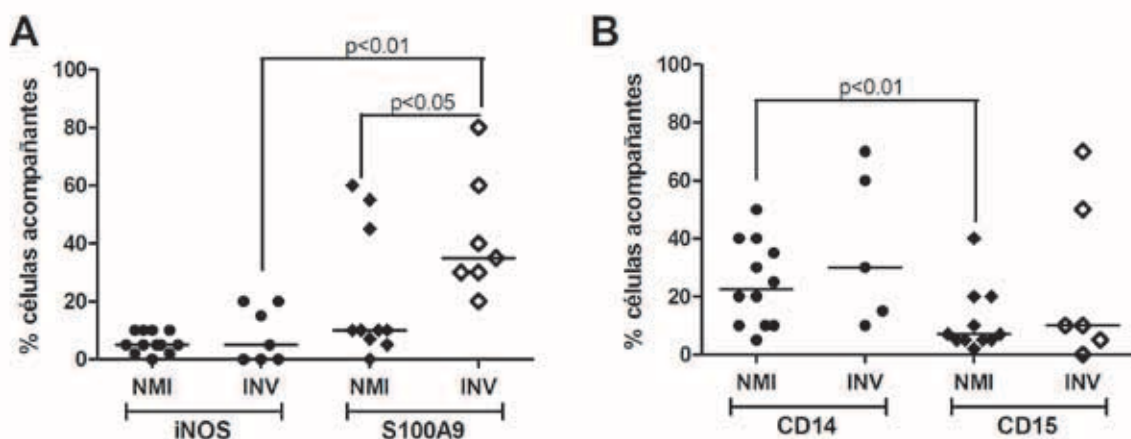


Figura 2. Expresión de S100A9 en células acompañantes. A) Porcentaje de células que expresan iNOS y S100A9 en células acompañantes que infiltran los tumores NMI e invasores de vejiga. B) Porcentaje de células del linaje monocítico (CD14) y del linaje granulocítico (CD15) en tumores de vejiga. NMI, no músculo invasores; INV, invasores.

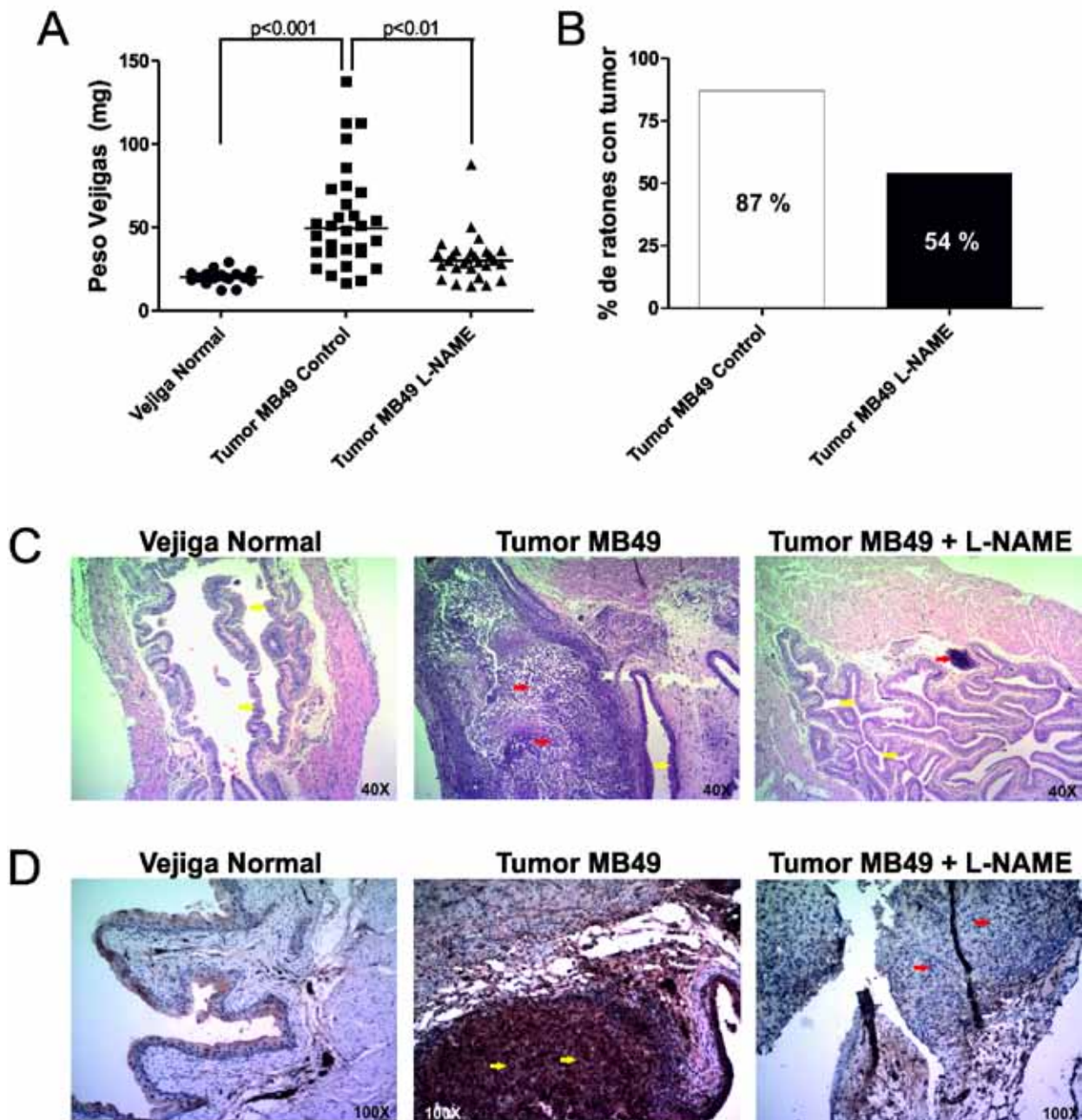


Figura 3. A) L-NAME reduce el crecimiento ortotópico de los tumores de vejiga MB49. B) Porcentaje de ratones con tumor de vejiga luego del tratamiento. C) Coloración de hematoxilina-eosina, epitelio vejiga normal (flecha amarilla), tumor MB49 (flecha roja). D) Expresión de S100A9, intensa en tumores MB49 (flecha amarilla), leve en tumores tratados con L-NAME (flecha roja).

medición con calibre y el ortotópico mediante el peso de las vejigas y posterior confirmación histológica con hematoxilina-eosina. La expresión de S100A9 se evaluó por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos y el número de MDSC se evaluó por citometría de flujo con anticuerpos fluorescentes específicos para GR1 (1:800).y CD11b (1:800).

Análisis estadístico: El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo fueron determinadas por dos patólogos independientes. Las diferencias estadísticas fueron realizadas utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis o el test de Mann Whitney, usando el procesador Prism® versión 5.00, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

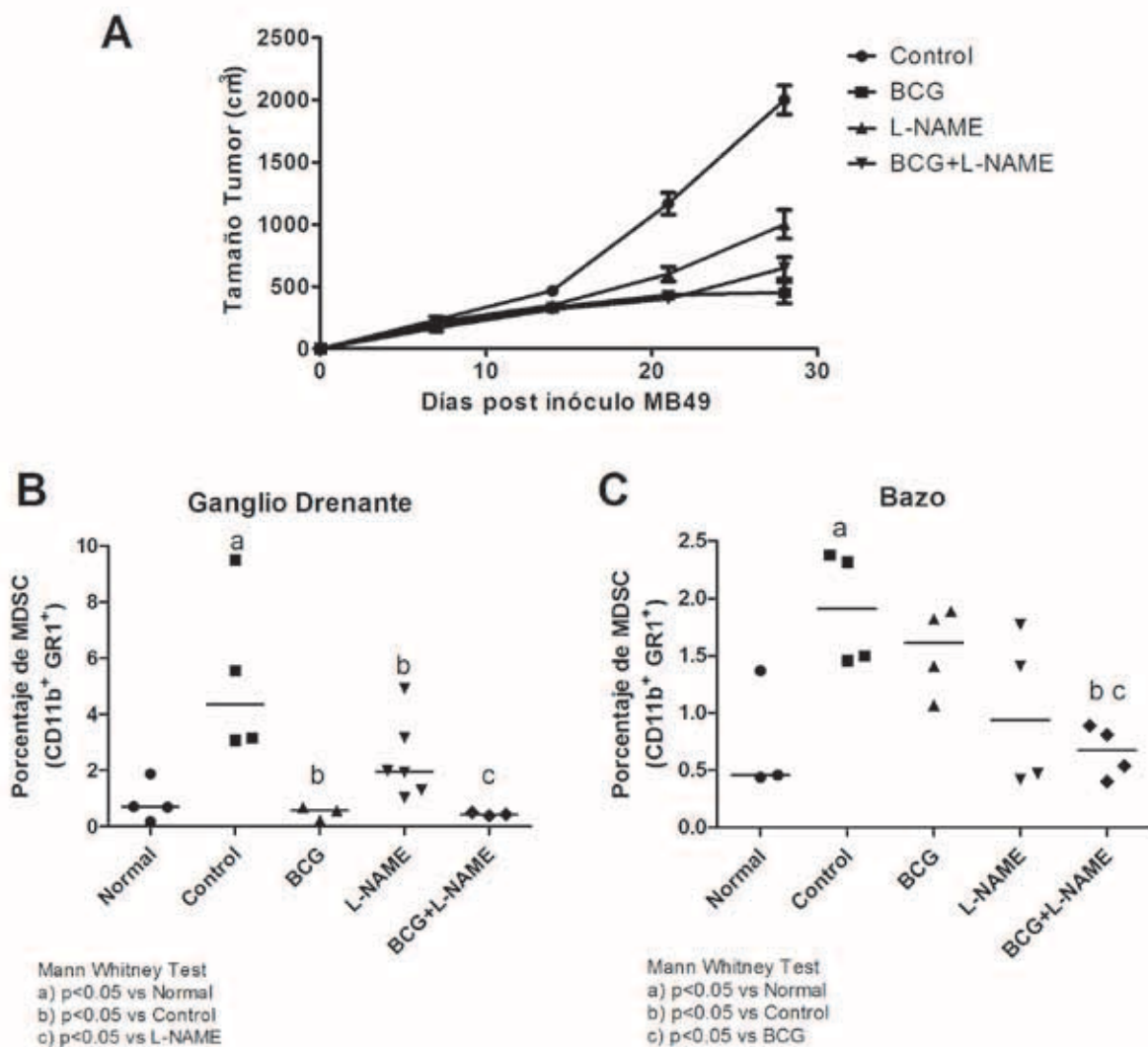


Figura 4. A) L-NAME y BCG+L-NAME inhiben el crecimiento del tumor murino MB49 ($p < 0,05$). B) Porcentaje de MDSC ($GR1^+ / CD11b^+$) en ganglio drenante al tumor. C) Porcentaje de MDSC ($GR1^+ / CD11b^+$) en bazo.

RESULTADOS

A- Tumores humanos

Identificamos que la proteína S100A9 se expresa tanto a nivel de las células tumorales como en las células hematológicas que infiltran los tumores (Figura 1). Estas últimas pueden encontrarse dentro de los vasos y en algunos casos infiltrando el tumor.

No se encontraron diferencias significativas a nivel de la expresión de S100A9 en células tumorales de tumores NMI e invasores. Sin embargo, hemos detectado una correlación positiva entre la expresión de iNOS y S100A9 en las células tumorales, sugiriendo que la expresión de ambas proteínas estaría vinculada.

La expresión de ARG en las células que infiltran los tumores (también llamadas acompañantes) es similar en tumores NMI e invasores (dato no mostrado). Los tumores invasores presentan un mayor número de células inmunes supresoras, caracterizadas por la expresión de S100A9, en comparación con los tumores NMI. En los tumores invasores, hay un predominio de células acompañantes que expresan S100A9 frente a las que expresan iNOS (Figura 2A). Este resultado sugiere que en los tumores de peor pronóstico, existiría un reclutamiento de células

inmunes que expresan un fenotipo inmunosupresor (S100A9). Este infiltrado de células es a predominio de monocitos/macrófagos (CD14) en los tumores NMI, mientras que en los invasores hay un nivel similar de células CD14 y CD15, indicando que tanto la serie monocítica como la granulocítica están en proporciones similares en los tumores de peor pronóstico (**Figura 2B**).

B- Tumores murinos

Utilizando el modelo de CaV murino MB49, el cual genera tumores NMI que expresan iNOS, demostramos que la inhibición de la producción de NO con L-NAME no solo redujo el crecimiento tumoral ortotópico (**Figura 3A**), sino también el porcentaje de ratones con tumor, ya que el 46% de los ratones presentaron remisión total del tumor luego del tratamiento (**Figura 3B**). Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica (**Figura 3C**). La reducción del crecimiento tumoral en respuesta a la inhibición del NO fue acompañada por la pérdida de la expresión de S100A9 en los tumores (**Figura 3D**).

Para evaluar cómo afecta la producción de NO por parte de los tumores iNOS⁺ en la inmunoterapia con BCG, utilizamos un modelo de crecimiento tumoral en subcutáneo. Observamos que al igual que ocurre en el crecimiento ortotópico L-NAME inhibe el crecimiento subcutáneo del tumor MB49, lo cual valida esta vía de inoculación tumoral. Demostramos que tanto BCG como su combinación con L-NAME inhiben el crecimiento tumoral (**Figura 4A**). Para evaluar la respuesta inmune de los ratones portadores de tumor en respuesta a estos tratamientos cuantificamos el número de MDSC en el bazo y el ganglio drenante al tumor (**Figura 4B y C**, respectivamente). Nuestros resultados muestran que existe un incremento en el número de MDSC (CD11b⁺ / GR1⁺) en los ganglios drenantes y en el bazo de los portadores de tumor respecto a ratones normales. Se encontró que tanto el tratamiento con BCG, L-NAME o su combinación fueron capaces de revertir el aumento de MDSC presentes en los ganglios drenantes (**Figura 4B**). Por otro lado, solo el tratamiento combinado fue capaz de normalizar el número de MDSC en el bazo (**Figura 4C**). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la inhibición

del NO es un buen blanco terapéutico reduciendo en parte la generación de una respuesta inmune supresora.

DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevos marcadores de predicción es de suma importancia para identificar pacientes con mayor riesgo de progresión y así orientar al médico en la administración de terapias más adecuadas.

Como mencionamos previamente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de la enzima iNOS, productora de altos niveles de NO, es un marcador de mal pronóstico en pacientes con CaV y está asociada a recurrencias tempranas e invasión tumoral^{3,4}. Otros grupos han sugerido que la expresión de esta enzima estaría relacionada con la falta de respuesta a BCG⁹.

Resultados preliminares de análisis proteómico de nuestro laboratorio utilizando el modelo murino MB49 demuestran que el tumor expresa la proteína S100A9, la cual a su vez se ha asociado a un fenotipo inmunosupresor⁶. La inhibición de la producción de NO con un análogo de la arginina como el L-NAME, reduce la expresión de la enzima al mismo tiempo que reduce el crecimiento tumoral. En el presente trabajo, hemos analizado la expresión de S100A9 en tumores humanos y murinos y su vinculación con la producción de NO.

Nuestros resultados indican que los tumores humanos invasores presentan una mayor cantidad de células inmunes acompañantes que expresan un fenotipo inmunosupresor (S100A9) comparado con los tumores NMI. Estos resultados proponen que el infiltrado de células MDSC con expresión de S100A9, sería un marcador de mal pronóstico que sugiere progresión tumoral.

La correlación entre la expresión de iNOS y S100A9 en células tumorales de pacientes sugiere la posibilidad de que la producción de NO en altas concentraciones y por tiempo prolongado sea capaz de inducir un perfil inmunológico supresor. Esto nos hace plantear la hipótesis de que la inhibición de la producción de NO puede ser un blanco terapéutico en pacientes que expresen iNOS ya que sería capaz de disminuir el número de MDSC y capacitar al pa-

ciente para que monte una respuesta inmune satisfactoria contra el tumor.

Esta hipótesis fue puesta a prueba mediante la experimentación en el modelo murino de CaV. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de la producción de NO, L-NAME, reduce el crecimiento del tumor MB49 tanto en la vejiga como en el subcutáneo. Esta reducción es acompañada por la disminución en la expresión de la proteína S100A9. Pudimos demostrar que el tratamiento combinado de BCG con L-NAME fue más eficaz que los tratamientos por separado para restaurar la respuesta inmune disminuyendo el número de células con función supresora.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la expresión de S100A9 por parte de células inmunológicas es un buen marcador de progresión tumoral. Por otro lado, a través de la experimentación utilizando un modelo *in vivo* demostramos que la inhibición de la producción de NO es un buen blanco terapéutico que no solo reduce el tamaño tumoral, sino también disminuye el número de células supresoras permitiendo una respuesta inmune más adecuada que favorece el tratamiento con BCG.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a las instituciones que mediante subsidios han permitido la realización de este trabajo: Universidad de Buenos Aires: UBA-CyT (CM26), CONICET: PIP 193, Escuela Técnica ORT: Subsidio a la investigación. Agradecemos también a la SAU que ha colaborado con la compra de reactivos. Denise Belgorosky y Barbara Prack McCormick son becarias de CONICET y Natalia Barlarino es becaria del INC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J, y cols. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis.* 2003;30:593-9.
2. Sauter G, Algaba F, Amin MB. Tumours of the urinary system. In: World Health Organiza-

tion Classification of Tumours Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. In: JI Epstein JE, I Sesterhenn y cols., editor. Lyon: IARC; 2004. p. 89-157.

3. Sandes EO, Faletti AG, Riveros MD, Vidal Mdel C, Gimenez L, Casabe AR, y cols. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric Oxide.* 2005;12:39-45.
4. Sandes EO, Lodillinsky C, Langle Y, Belgorosky D, Marino L, Gimenez L, y cols. Inducible nitric oxide synthase and PPARgamma are involved in bladder cancer progression. *J Urol.* 2012;188:967-73.
5. Lodillinsky C, Rodriguez V, Vauthay L, Sandes E, Casabe A, Eijan AM. Novel invasive orthotopic bladder cancer model with high cathepsin B activity resembling human bladder cancer. *J Urol.* 2009;182:749-55.
6. Zhao F, Hoechst B, Duffy A, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Manns MP, y cols. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology.* 2012;136:176-83.
7. Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, y cols. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7:181-9.
8. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32:19-25.
9. Mitropoulos D, Petsis D, Kyroudi-Voulgari A, Kouloukoussa M, Zervas A, Dimopoulos C. The effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans. *Nitric Oxide.* 2005;13:36-41.