

DIFERENTES DOSIS DE LOS FITOESTRÓGENOS GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA AFECTAN DE DISTINTO MODO A LA VIABILIDAD CELULAR Y A LA EXPRESIÓN DE FACTORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

V. ALONSO^a, A.R. DE GORTÁZAR^a, F.C. PÉREZ MARTÍNEZ^b,
F.J. CALAHORRA^b Y P. ESBRITE^a

^aLABORATORIO DE METABOLISMO MINERAL
Y ÓSEO. FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (GRUPO CAPIO). MADRID.

^bDEPARTAMENTO DE UROLOGÍA. FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
(GRUPO CAPIO). MADRID.

Introducción. Estudios epidemiológicos sugieren que los fitoestrógenos de la soja podrían ser responsables de la baja incidencia del carcinoma prostático (CaP) en poblaciones asiáticas. Las células de CaP expresan factores reguladores de la proliferación/viabilidad celular, así como factores capaces de interaccionar con las células en el microambiente óseo. En el presente estudio hemos evaluado los efectos de los fitoestrógenos de la soja, genisteína y daidzeína, sobre la viabilidad celular/apoptosis y sobre la expresión de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) y su receptor (PTH1R), la osteoprotegerina (OPG) y el ligando del receptor activador del NF-kappa B (RANKL) en las células de CaP humano PC-3 y LNCaP.

Pacientes y métodos. Las células, sembradas a 20.000 células/cm² en RPMI con suero fetal bovino al 10%, se incubaron con distintas concentraciones de cada fitoestrógeno o el vehículo salino (control basal) durante 1-4 días. La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripan y la apoptosis se determinó por citometría de flujo. La expresión génica de PTHrP se analizó por RT-PCR semicuantitativa con cebadores específicos. La expresión proteica de PTHrP, PTH1R, OPG y RANKL se determinó por transferencia *western* en extractos de proteína celular total o de membrana (RANKL).

Resultados. Hemos encontrado que tanto la genisteína como la daidzeína en el rango μ M disminuyen la viabilidad celular e incrementan la apoptosis; siendo la genisteína más potente y eficaz que la daidzeína en ambos tipos celulares. Además, estas isoflavonas a dosis \leq nM aumentan la expresión de PTHrP y del PTH1R, así como la relación OPG/RANKL en estas células.

Conclusiones. Estos hallazgos demuestran que diferentes dosis de genisteína y daidzeína inducen efectos diversos sobre las células de CaP que podrían afectar al desarrollo de este tumor.

PALABRAS CLAVE: fitoestrógenos, genisteína, daidzeína, cáncer de próstata, PTHrP, osteoprotegerina, RANKL.

Introduction. Epidemiological studies suggest that soy phytoestrogens might be responsible for the low incidence of prostate carcinoma (PCa) in Asian populations. PCa cells express regulatory factors of cell proliferation and viability, and also several factors that interact with cells in the bone microenvironment. In the present study, we evaluated the effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on cell viability and apoptosis, and also on the expression of parathormone-related protein (PTHrP) and its receptor (PTH1R), osteoprotegerina (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK-L) in the human PCa cell lines PC-3 and LNCaP.

Patients and methods. Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in RPMI with 10% fetal bovine serum, and then were incubated with different concentrations of each phytoestrogen or saline vehicle (basal control) for 1-4 days. Cell viability was evaluated by Trypan blue exclusion, and apoptosis was determined by flow cytometry. Gene expression of PTHrP was analyzed by semi quantitative RT-PCR with specific primers. Protein expression of PTHrP, the PTH1R, OPG, and RANKL was determined by western blot in total cell protein or cell membrane (RANKL) extracts.

Results. We found that both genistein and daidzein, at μ M range, decrease cell viability and increase apoptosis; but genistein was more potent and efficient than daidzein in both PCa cell lines. In addition, these isoflavones, at \leq nM, increase the expression of PTHrP and the PTH1R, and also the OPG/RANKL ratio in these cells.

Conclusions. These findings demonstrate that different concentrations of genistein and daidzein induce distinct effects on PCa cells that might affect PCa development.

KEY WORDS: phytoestrogens, genistein, daidzein, prostate cancer, PTHrP, osteoprotegerin, RANKL.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es el tumor maligno más común entre los varones de los países desarrollados, que ocupa el segundo lugar en mortalidad debida a cáncer tras el cáncer de pulmón. Con la edad, muchos varones desarrollan focos mi-

croscópicos de CaP, y un pequeño porcentaje de éstos se convierten en CaP invasivos¹.

El hueso es el órgano predilecto para el establecimiento de metástasis de tumores tales como el carcinoma de mama y el CaP^{2,3}. De hecho, las metástasis óseas constituyen una de las causas más frecuentes de malignidad y morbilidad de estos tumores³. Los tumores provocan dos tipos diferentes (aunque no excluyentes) de lesiones esqueléticas. La forma más común, representada por el cáncer de mama, es la lesión osteolítica, asociada a una alteración del remodelado óseo con un incremento en la actividad osteoclásica y la subsiguiente destrucción de hue-

so²⁻⁴. Por otro lado, las lesiones osteoblasticas, asociadas a la formación de hueso, son predominantes en el CaP. Sin embargo, actualmente se reconoce que la existencia de un componente osteolítico es necesario para el establecimiento de las metástasis óseas asociadas a este tumor^{2,5,6}.

Una diversidad de citoquinas y factores de crecimiento parecen contribuir a la progresión del CaP y a su tendencia a metastatizar en el hueso⁵. Entre estos factores el sistema constituido por la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) y su receptor, el receptor de PTH tipo 1 (PTH1R), parece ejercer acciones complejas que promueven el desarrollo del

Correspondencia: P. Esbrit.

Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo. Fundación Jiménez Díaz-(Grupo CAPIO). Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

Correo electrónico: pesbrit@fjd.es

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por la Fundación de Investigación en Urología.

CaP⁷⁻¹¹. En diversas líneas celulares de CaP humano y de rata, la PTHrP estimula la viabilidad celular e induce la producción de interleuquina⁸, un potente factor angiogénico que promueve la proliferación de las células de CaP y de otros tipos celulares¹².

Hallazgos recientes sugieren que la osteoprotegerina (OPG) y el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (NF-κB) (RANKL), un sistema clave en la modulación del remodelado óseo¹³, se expresan en las células de CaP y podrían afectar al desarrollo del CaP¹⁴⁻¹⁸. La OPG inhibe la osteoclastogénesis al actuar como un receptor señuelo del RANKL que impide su unión a RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos¹³. Recientemente, se ha sugerido que la OPG podría actuar como un factor de supervivencia de las células tumorales y así favorecer la progresión del CaP¹⁹. Por otra parte, el RANKL a través de sus efectos estimuladores sobre la resorción ósea podría facilitar la colonización del microambiente óseo por el CaP^{20,21}.

Los fitoestrógenos son compuestos derivados de las plantas que poseen acción antioxidante, antiagregante plaquetaria y actividad estrogénica débil²². Algunos estudios sugieren que el elevado contenido dietético de isoflavonoides –fitoestrógenos abundantes en la soja, principalmente genisteína y daidzeína– podría ser responsable, al menos en parte, de la baja incidencia de CaP en las poblaciones asiáticas²³. Los efectos de los fitoestrógenos podrían estar mediados por receptores estrogénicos, pero también a través de su interacción con otras vías de señalización asociadas a factores de crecimiento (como el factor de crecimiento epidérmico) importantes para el desarrollo tumoral^{24,25}. Además, la inhibición de la neovascularización, un proceso básico para el desarrollo tumoral, podría ser un mecanismo antitumoral alternativo de estas sustancias²⁶.

En el presente estudio *in vitro* hemos evaluado los efectos de la genisteína y la daidzeína sobre la viabilidad celular y la apoptosis, así como sobre la expresión de la PTHrP, del PTH1R, de la OPG y del RANKL, en dos líneas celulares bien caracterizadas de CaP humano PC-3 y LNCaP.

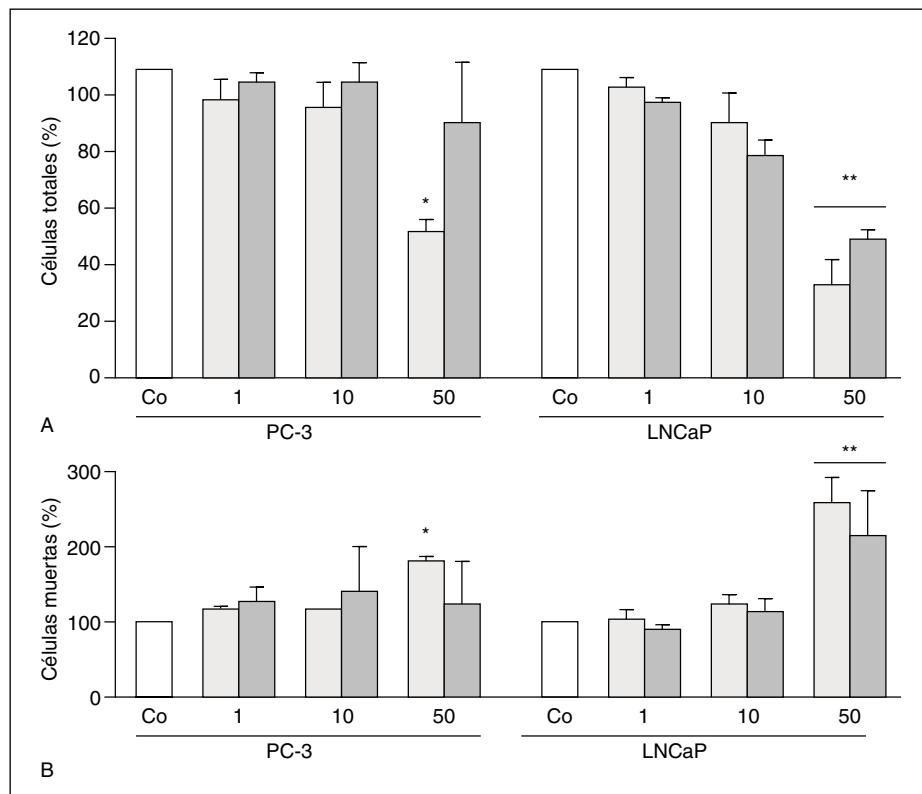


Fig. 1. Dosis-respuesta de los efectos de la genisteína (barras oscuras) y de la daidzeína (barras claras) sobre el número de células totales (A) y muertas (B) en las líneas celulares PC-3 y LNCaP. Las células se trataron con diferentes dosis (μM) de los agonistas durante 4 días. Los valores son medias \pm error estándar (EE) ($n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, con respecto al control basal (Co; 100%).

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

La genisteína, la daidzeína y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la α -tubulina (T-S168) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El anticuerpo policlonal de conejo frente a la OPG humana (sc-11383) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). El anticuerpo policlonal de conejo frente a RANKL (500P-133), de PeproTech (Rocky Hill, NJ, EEUU). El anticuerpo policlonal de conejo frente al PTH1R Ab-IV, de Covance (Berkeley, CA, EE.UU.). El antisero policlonal de conejo C6, que reconoce el epítopo C-terminal altamente conservado 107-111 en la molécula de PTHrP fue desarrollado en nuestro laboratorio²⁷.

al 10% y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), en CO_2 al 5% a 37 °C. Para los estudios de viabilidad/apoptosis, las células se sembraron a 20.000 células/ cm^2 en placas de 24 pocillos y, al día siguiente, se incubaron con cada fitoestrógeno o el vehículo salino (control basal) durante 4 días. Para analizar los factores relacionados con el metabolismo óseo, las células se sembraron a la misma densidad; a continuación, se retiró el suero durante 24 horas y, posteriormente, se estimularon con los fitoestrógenos a distintas concentraciones durante 1-4 días. Inicialmente, la genisteína y la daidzeína se reconstituyeron en dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol, respectivamente. Las diluciones posteriores se realizaron en solución salina fosfatada (PBS).

ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

Las células PC-3 y LNCaP (ATCC CRL 1435 y 1740, respectivamente) se cultivaron en RPMI-1640 con suero fetal bovino

La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripán. Después de los tratamientos se recogieron los medios condicionados y las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Las células totales –vi-

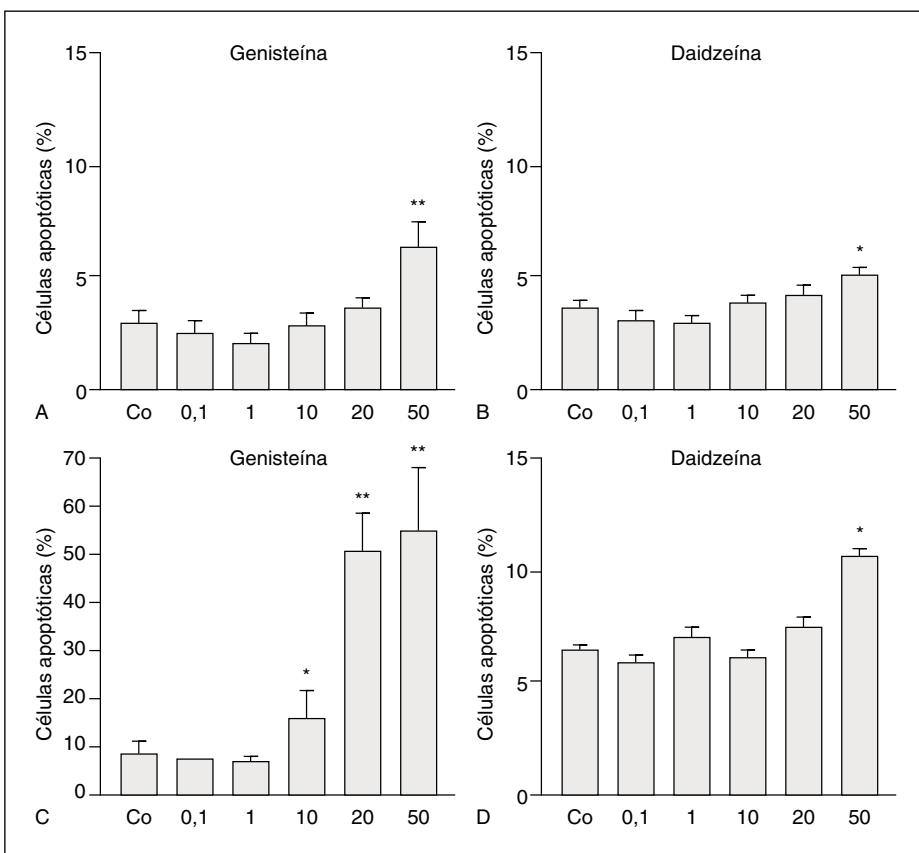


Fig. 2. Dosis-respuesta del efecto de la genisteína (A y C) y de la daidzeína (B y D) sobre la apoptosis en células PC-3 (A y B) y LNCaP (C y D). Las células fueron tratadas con diferentes dosis (μM) de isoflavonas durante 4 días. La apoptosis fue analizada por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Los valores son medias \pm error estándar (EE) ($n = 3$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, con respecto al control basal (Co) respectivo.

vas y muertas— presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se contaron en cámara de Neubauer.

La apoptosis se determinó por citometría de flujo. Para ello, las células totales obtenidas como se ha comentado anteriormente se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 minutos. A continuación, se incubaron con yoduro de propidio 0,5 mg/ml, NP40 al 1% y ARNasa 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al menos durante 1 hora en oscuridad. Seguidamente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental se calculó el porcentaje de células hipodiploides (células apoptóticas con la cromatina fragmentada o condensada).

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y PROTEÍNA

El ARN total celular se aisló mediante un método estándar con tiocianato de guanidinio-

fenol-cloroformo (Tri-Reagent[®], MRC, Cincinnati, OH, EE.UU.). Los extractos celulares se obtuvieron por lisado en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, ácido etileniaminotetraacético (EDTA) 1 mM, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% e inhibidores de proteasas (aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y fluoruro de fenilmetanosulfonilo [PMSF] 1 mM) (tampón A). Para obtener los extractos de proteína de membrana, las células se lisaron en PBS con Tritón X-100 al 0,1%, y se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora y el precipitado resultante se resuspendió en tampón A. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Pierce; Rockford, IL, EEUU), usando seroalbúmina bovina como estándar.

RT-PCR SEMICUANTITATIVA

El ARN total celular (10 ng) se retrotranscribió, y el ADNc resultante se amplificó

con un sistema estándar (TitaniumTM One-step RT-reacción en cadena de la polimerasa (PCR); Clontech, Mountain View, CA) con cebadores para el gen de la PTHrP humana: 5'-GCGACGATTCTTCCTTCACC-3' (sentido) y 5'-CCTTCTAGCCCACTCCCCAGT-3' (antisentido), correspondientes a los nucleótidos 187 y 498 (número de acceso al Genebank M17183). Estos cebadores dan lugar a un producto de amplificación de 312-pb. Como control constitutivo se utilizaron cebadores para la 18S modificados (QuantumRNATM 18S Internal Standard; Ambion, Austin, EE.UU.).

La mezcla de reacción (10 μl) se incubó durante 45 minutos a 48 °C y 2 minutos a 95 °C, seguido de 29 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 58 °C y 2 minutos a 68 °C, con una extensión final de 7 minutos a 68 °C. Experimentos preliminares demostraron que estas condiciones producen una amplificación submáxima de los genes en estudio. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2% y las bandas resultantes se visualizaron con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los productos de PCR fueron densitometradas utilizando el equipo ImageQuant (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA, EEUU) y los valores obtenidos se normalizaron frente a la 18S correspondiente.

ANÁLISIS POR TRANSFERENCIA WESTERN

La proteína de membrana (50 μg de proteína, para RANKL) y la proteína total celular (20 μg de proteína, para OPG y PTH1R) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Piscataway, NJ, EEUU). Éstas se incubaron a continuación con leche desnatada al 5% en PBS con Tween-20 al 0,1% durante 1 hora, y después toda la noche con los siguientes anticuerpos polyclonales (dilución): RANKL (1:500); OPG (1:2500); y PTH1R (1:1.000). La α -tubulina se detectó con un anticuerpo monoclonal, como control constitutivo. En el caso de las proteínas de membrana se realizó tinción con rojo Ponceau S como control de carga en el gel. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una inmunoglobulina G (IgG) anti-conejo o anti-ratón conjugada con peroxidasa. Seguida-

mente, se reveló por quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Las bandas correspondientes se cuantificaron por densitometría.

EXPRESIÓN DE RANKL POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células trisnizadas se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo anti-RANKL, a una dilución 1:50, durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se realizaron varios lavados con PBS, tras los cuales las células se incubaron con una IgG anti-conejo marcada con isiotiocianato de fluoresceína durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad. Por último, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en p-formaldehído al 1% para su análisis en el citómetro de flujo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se han expresado como media ± error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de la varianza no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), seguido de la prueba de Dunn, o por la prueba de Mann-Whitney, según los casos. Se consideró una significación estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

EFEKTOS DE LA GENISTEÍNA Y LA DAIDZEÍNA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE CA P HUMANAS PC-3 Y LNCAP

La presencia continua de ambos fitoestrógenos, a 50 µM, durante cuatro días disminuyó de modo significativo la viabilidad de las células de CaP. Así, la genisteína redujo significativamente el número de células totales tanto en las PC-3 como en las LNCAP (el 50% y el 70%, respectivamente, sobre el basal) (fig. 1a). Este efecto en la viabilidad celular se correspondió con un incremento significativo del número de células muertas (que captan el colorante azul de tripán) inducido por esta isoflavona en ambas líneas

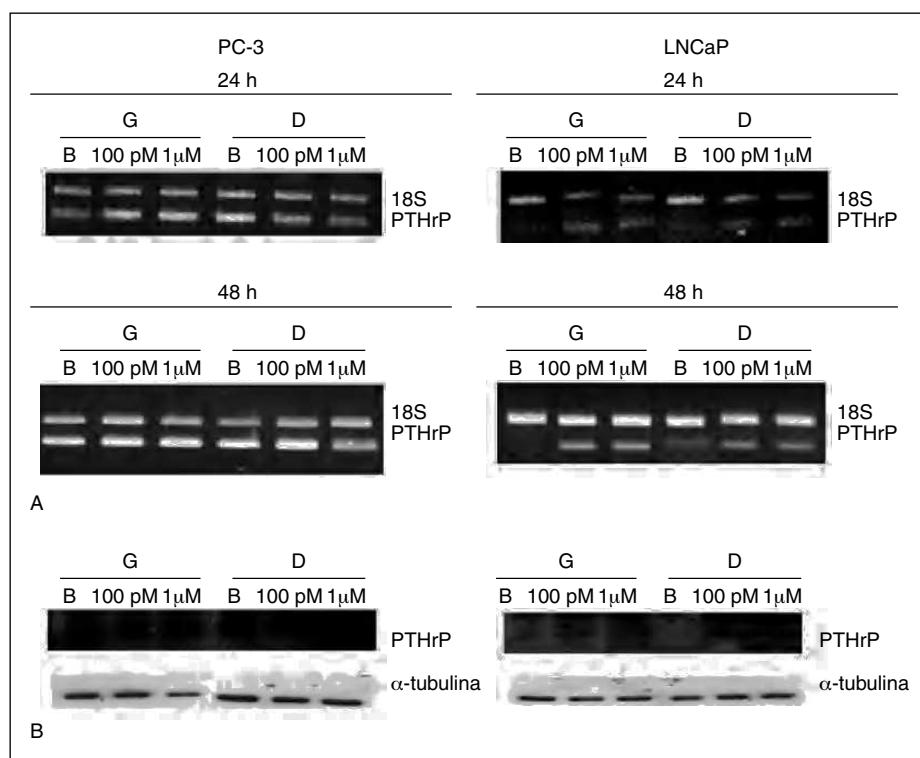


Fig. 3. Dosis-respuesta del efecto de la genisteína (G) y de la daidzeína (D) sobre la expresión génica (A) y proteica (B) de la PTHrP (por RT-PCR y transferencia western, respectivamente) en células PC-3 y LNCAP. Las células fueron tratadas con diferentes dosis (μM) de isoflavonas durante 1-4 días.

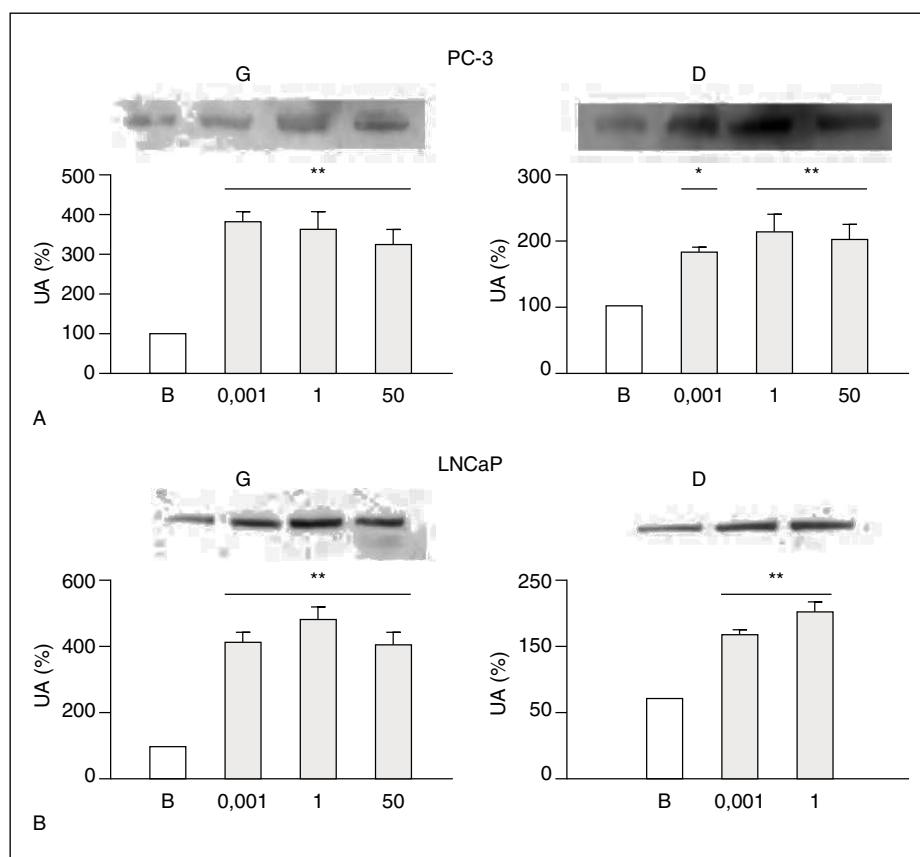


Fig. 4. Dosis-respuesta del efecto de la genisteína (G) y de la daidzeína (D) sobre la expresión proteica de PTH1R (por transferencia western) en células PC-3 y LNCAP. Las células se estimularon con distintas concentraciones (μM) de los agonistas durante 4 días. Los valores son medias ± error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, respecto al control basal (Co; 100%). UA: unidades arbitrarias.

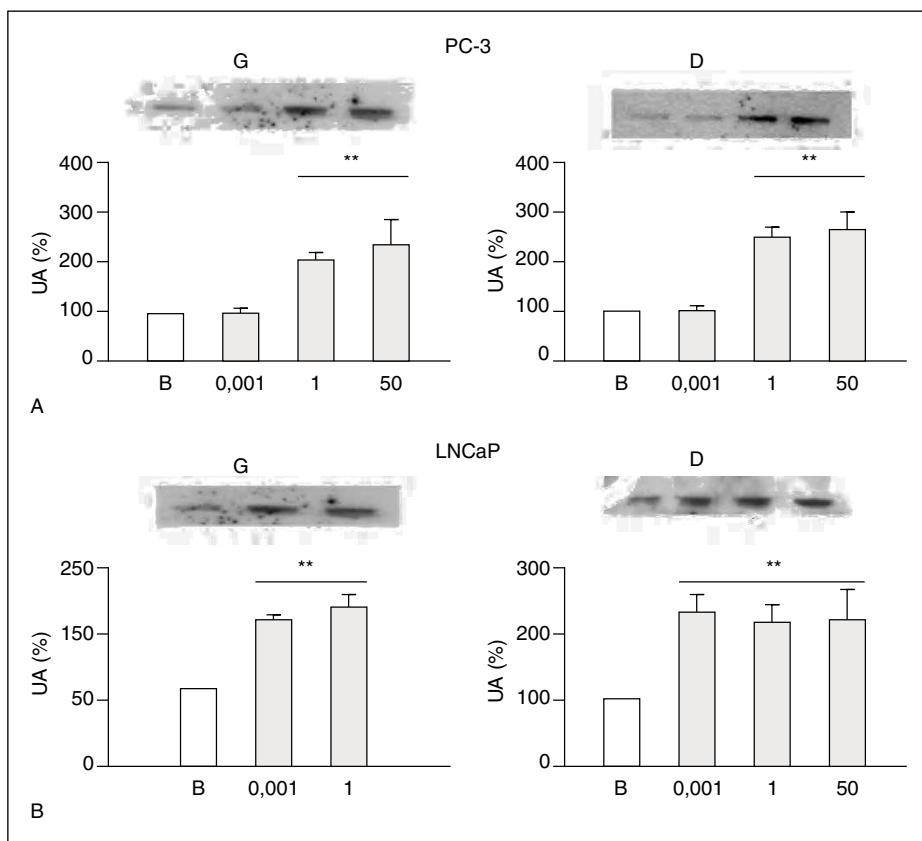


Fig. 5. Dosis-respuesta del efecto de la genisteína (G) y de la daidzeína (D) sobre la expresión proteica de la OPG (por transferencia western) en células PC-3 y LNCaP. Las células se estimularon con distintas concentraciones (μM) de los agen-
tis durante 4 días. Los valores son medias \pm error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, respecto al control basal (C; 100%). UA: unidades arbitrarias.

celulares (fig. 1b). De acuerdo con estos hallazgos, encontramos un aumento significativo de células apoptóticas (por citometría de flujo) producido por la genisteína (a 50 μM) en las dos líneas celulares de CaP (figs. 2a y 2c). Sin embargo, el efecto proapoptótico de esta isoflavona fue más potente y eficaz en las LNCaP que en las PC-3 (figs. 2a y 2c). Por otro lado, la daidzeína fue menos potente y eficaz que la genisteína en la inducción de la apoptosis en ambas líneas celulares de CaP (fig. 2).

EFFECTO DE LA GENISTEÍNA Y LA DAIDZEÍNA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA PTHRP EN LAS CÉLULAS PC-3 Y LNCAP

Tanto la genisteína como la daidzeína indujeron la expresión génica de la PTHrp en las células LNCaP (que no expresan apenas este gen de forma basal) a las 24-48 horas (fig. 3a). Además, observamos un incremento en la expresión proteica de este factor a los 4 días de estimulación con am-

bas isoflavonas (fig. 3b). Esta estimulación de la PTHrp se observó incluso a dosis $\leq \text{nM}$ en las LNCaP. Sin embargo, ambas isoflavonas no afectaron significativamente a la expresión proteica de la PTHrp en las células PC-3 (que expresan de forma basal esta proteína) (fig. 3).

EFFECTO DE LA GENISTEÍNA Y LA DAIDZEÍNA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL PTH1R Y DE LA OPG EN LAS CÉLULAS PC-3 Y LNCAP

Encontramos que ambas isoflavonas, en un rango de dosis al observado en la estimulación de PTHrp en las LNCaP, incrementaron significativamente la expresión proteica del PTH1R en ambas líneas celulares PC-3 y LNCaP (fig. 4). De modo similar a lo observado en sus efectos sobre la apoptosis, el efecto de la genisteína fue más potente que el de la daidzeína sobre la expresión proteica del PTH1R en estas células (fig. 4).

Por otra parte, observamos que ambas isoflavonas indujeron un aumento similar en la expresión proteica de la OPG tanto en las PC-3 como en las LNCaP, aunque de modo más eficaz en estas últimas células (fig. 5).

EFFECTO DE LA GENISTEÍNA Y LA DAIDZEÍNA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL RANKL EN LAS CÉLULAS PC-3

Utilizando transferencia *western*, observamos que la daidzeína, pero no la genisteína, incrementó la expresión del RANKL de forma significativa en los extractos de membrana de las células PC-3 (figs. 6a y 6b). Estos resultados se confirmaron por citometría de flujo (figs. 6c y 6d). El efecto de la daidzeína se observó incluso a concentraciones $\leq \text{nM}$ (fig. 6).

DISCUSIÓN

Los fitoestrógenos se consideran los agentes responsables de las cualidades beneficiosas de la soja. En particular, la genisteína y la daidzeína podrían explicar, al menos en parte, sus propiedades quimio preventivas a través de los efectos inhibitorios de estas isoflavonas sobre: la actividad tiroxina-quinasa; la ADN topoisomerasa I y II; la quinasa ribosomal S6; la proliferación celular; y la 5 α -reductasa o la aromatasa. Además, estos compuestos poseen actividad antioxidante y antiangiogénica e inducen la diferenciación celular²⁸.

En el presente estudio hemos demostrado que tanto la genisteína como la daidzeína, a altas concentraciones ($\geq \mu\text{M}$), afectan a la viabilidad/apoptosis de las células de CaP humano. Observamos que tanto en las células sensibles a andrógeno (LNCaP) como en las independientes de andrógeno (PC-3) responden en este sentido a la genisteína y a la daidzeína, aunque las primeras de modo más sensible a la genisteína. Así pues, nuestros resultados sugieren que la sensibilidad a andrógeno es relativamente independiente de estos efectos de ambas isoflavonas. El descenso en la viabilidad celular inducido por la genisteína podría explicarse por su actividad inhibidora de la tiroxina quinasa o de la topoisomerasa,

como se ha indicado anteriormente. De hecho, la daidzeína, que no afecta a estas enzimas²⁹, fue menos eficaz que la genisteína. Nuestros resultados sugieren, no obstante, la existencia de otras vías alternativas, mediadoras de los efectos de ambas isoflavonas sobre la viabilidad/muerte celular. Otros autores han demostrado efectos similares de la genisteína sobre la viabilidad celular a los observados en el presente trabajo en las PC-3 pero no en células de epitelio prostático no tumoral CRL-2221³⁰. Así pues, estos resultados en conjunto apoyan el posible papel antitumoral de la genisteína y de la daidzeína a través de su interacción con la apoptosis de las células de CaP.

Por otro lado, los efectos de varias citoquinas y factores de crecimiento relacionados con el metabolismo óseo podrían explicar, al menos en parte, la capacidad de las células de CaP para interactuar con el hueso^{9,10,14-21}. Entre ellos, la PTHrP ejerce un papel multifuncional en diversos tejidos malignos y no malignos, regulando el crecimiento y/o la supervivencia celular; así como en el desarrollo de metástasis óseas^{2-5,7-11}. De hecho, las metástasis óseas del CaP humano expresan PTHrP y el PTH1R en mayor proporción que el tumor primario^{5,10}, sugiriendo un posible mecanismo bidireccional de interacción entre las células del CaP y los osteoblastos (que sintetizan PTHrP) en el entorno óseo. Además, la expresión de la PTHrP en líneas celulares de CaP se correlaciona con su capacidad invasiva y metastásica⁵. Así, las células PC-3, derivadas de una metástasis ósea de CaP, producen más PTHrP que las LNCaP, que provienen de un nódulo linfoide de este tumor⁵. En nuestro estudio hemos encontrado que la genisteína y la daidzeína incrementan la expresión de la PTHrP en las células LNCaP, y la del PTH1R en ambas líneas de CaP analizadas. Este efecto podría poner de manifiesto un mecanismo autocrino/intracrino de las células de CaP para incrementar su supervivencia celular frente a la apoptosis inducida por estas isoflavonas. De hecho el efecto proapoptótico de la genisteína fue más potente y eficaz en las LNCaP que en las PC-3 que tienen mayor expresión basal de PTHrP. La hipótesis de un mecanismo intracrino mediador de los efectos de la PTHrP sobre la supervivencia de las células de CaP,

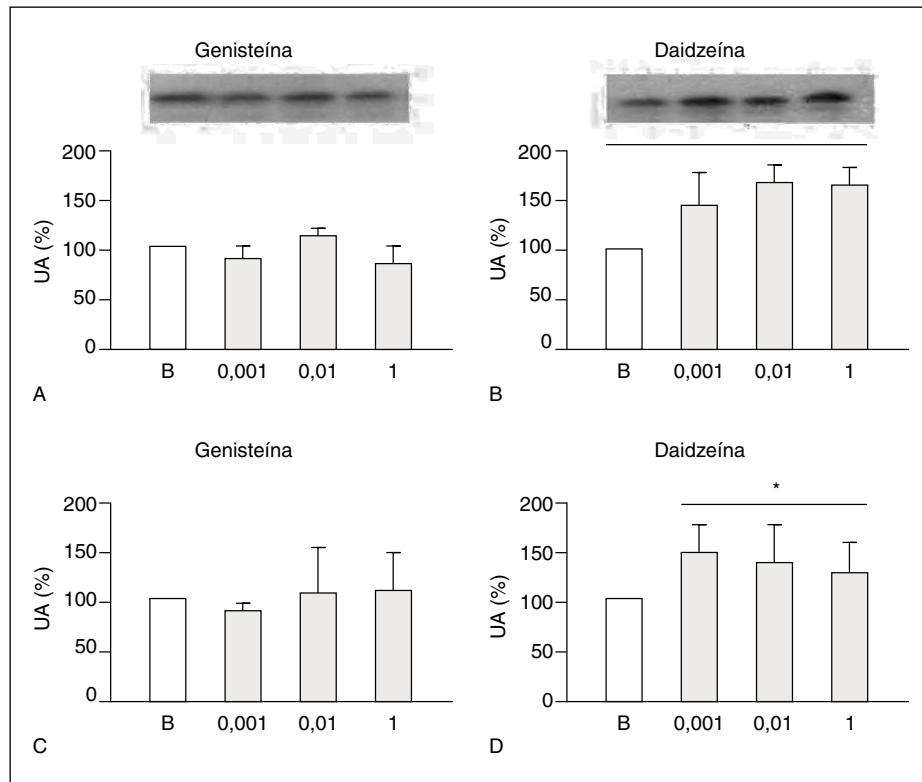


Fig. 6. Dosis-respuesta del efecto de la genisteína y la daidzeína sobre la expresión proteica de RANKL, por transferencia western (A y B) y citometría de flujo (C y D), en la superficie celular de las PC-3. Las células se estimularon con distintas concentraciones (μM) de los agonistas durante 4 días. Los valores son medias \pm error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, respecto al control basal (Co; 100%). UA: unidades arbitrarias.

según se ha sugerido previamente^{9,12}, se sugiere por el hecho de que tanto la genisteína como la daidzeína inducen una sobreexpresión del PTH1R en ambas líneas celulares de CaP. Apoyando esta hipótesis, datos recientes de nuestro laboratorio indican que la presencia de anticuerpo anti-PTHrP o de un antagonista del receptor PTH1R, la PTHrP (7-34), en el medio celular no afectó a los efectos de ambas isoflavonas sobre la viabilidad celular (datos no publicados).

Recientemente, se han correlacionado los niveles de la OPG en suero con la progresión tumoral y su respuesta a la ablación andrógenica en pacientes con CaP¹⁸. Nuestros hallazgos demuestran un aumento de expresión proteica de la OPG por ambas isoflavonas en las dos líneas celulares de CaP estudiadas. Este efecto sería beneficioso, puesto que la OPG inhibiría la osteoclastogénesis necesaria para el establecimiento de las células de CaP en el microentorno óseo^{19,20}. Resultados de otros investigadores apoyan esta hipótesis. Así, se ha demostrado que la OPG disminuye el desarrollo de las células de CaP inyectadas en tibias de ratones, pero no el crecimiento

del tumor subcutáneo²⁰. Estos datos sugieren que la capacidad de la OPG para inhibir las metástasis óseas del CaP se debe específicamente a factores del microambiente óseo²⁰. Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el verdadero papel de la OPG en la progresión del CaP. Así, algunos investigadores no han observado efectos de la OPG sobre las células de CaP *in vitro*²⁰; mientras que esta proteína podría desempeñar un papel como factor de supervivencia frente a la apoptosis inducida por el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral¹⁹.

Otra citoquina ósea esencial para el remodelado óseo, posiblemente implicada en el establecimiento de metástasis óseas del CaP, es el RANKL¹³. Nuestros resultados indican que la daidzeína, al contrario que la genisteína, incrementa la expresión de RANKL –aunque en menor proporción que la de OPG– en la superficie celular de las células PC-3. Como hemos comentado anteriormente, se ha demostrado que la administración de OPG previene el establecimiento del CaP en el tejido óseo. Además, recientemente se ha publicado

que el bloqueo de RANKL por un complejo soluble compuesto por el receptor de RANKL (RANK) unido a Fc disminuye la progresión del CaP en el hueso²¹ pero no en otros tejidos. Estos resultados sugieren que el bloqueo de RANKL es esencial para la inhibición de la implantación de las células de CaP en el hueso¹⁷. En este sentido, resultados recientes de nuestro grupo demuestran que la evaluación inmunohistoquímica del RANKL puede distinguir satisfactoriamente los tumores más o menos agresivos en pacientes con CaP¹⁷. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la relación OPG/RANKL es esencial para el establecimiento del CaP en el hueso. Nuestros resultados indican que las isoflavonas analizadas podrían impedir el desarrollo de las metástasis óseas del CaP al aumentar esta relación.

En conclusión, en el presente estudio hemos demostrado que la genisteína y la daidzeína afectan no sólo a la supervivencia de las células del CaP, sino también a la expresión de distintos factores implicados tanto en el desarrollo como en la implantación de este tumor en el tejido óseo.

AGRADECIMIENTOS

V. Alonso, A.R. de Gortázar y F.C. Pérez Martínez son becarios de la Fundación Conchita Rábago. Este trabajo ha sido subvencionado en parte por la Fundación de Investigación en Urología y el Instituto de Salud Carlos III (C03/08 y PI050363).

BIBLIOGRAFÍA

- Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol.* 1991;30: 133-40.
- Yoneda T. Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. *Eur J Cancer.* 1998;34:240-5.
- Bagi CM. Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:995-1010.
- Kakonen SM, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97:834-9.
- Deftos LJ. Prostate carcinoma: production of bioactive factors. *Cancer.* 2000;88:3002-8.
- Goltzman D. Mechanisms of the development of osteoblastic metastases. *Cancer.* 1997;80: 1581-7.
- Asadi F, Farraj M, Sharifi R, Malakouti S, Antar S, Kukreja S. Enhanced expression of parathyroid hormone-related protein in prostate cancer as compared with benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol.* 1996;27:1319-23.
- Cramer SD, Peehl DM, Edgar MG, Wong ST, Deftos LJ, Feldman D. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is an epidermal growth factor-regulated secretory product of human prostatic epithelial cells. *Prostate.* 1996;29: 20-9.
- Dougherty KM, Blomme EA, Koh AJ, Henderson JE, Pienta KJ, Rosol TJ, et al. Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59: 6015-22.
- Iddon J, Bundred NJ, Hoyland J, Downey SE, Baird P, Salter D, et al. Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in bone metastases from prostate cancer. *J Pathol.* 2000;191:170-4.
- Iwamura M, di Sant'Agnese PA, Wu G, Benning CM, Cockett AT, Deftos LJ, et al. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1993;53:1724-6.
- Gujral A, Burton DW, Terkeltaub R, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Cancer Res.* 2001;61:2282-8.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15: 457-75.
- Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, et al. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology.* 2001;57:611-6.
- Fizazi K, Yang J, Peleg S, Sikes CR, Kreimann EL, Daliani D, et al. Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2587-97.
- Jung K, Stephan C, Semjonow A, Lein M, Schnorr D, Loening SA. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer. *J Urol.* 2003;170:2302-5.
- Pérez-Martínez FC, Alonso V, Sarasa JL, Namcha S, Vela Navarrete R, Manzarbeitia F, et al. Immunohistochemical analysis of low-grade and high-grade prostate carcinoma: relative changes of PTHrP and its PTH1 receptor, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *J Clin Pathol (en prensa);* 2006.
- Eaton CL, Wells JM, Holen I, Croucher PI, Hamdy FC. Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. *Prostate.* 2004;59:304-10.
- Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62:1619-23.
- Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest.* 2001;107:1235-44.
- Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor kappa B Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res.* 2003;63: 7883-90.
- Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1998; 12:543-57.
- Denis L, Morton MS, Griffiths K. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol.* 1999;35:377-87.
- Dalu A, Haskell JF, Coward L, Lamartiniere CA. Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the rat dorsolateral prostate. *Prostate.* 1998;37:36-43.
- Peterson G, Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate.* 1993;22:335-45.
- Zhou JR, Gugger ET, Tanaka T, Guo Y, Blackburn GL, Clinton SK. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *J Nutr.* 1999;129:1628-35.
- Albar JP, De Miguel F, Esbrit P, Miranda R, Fernández-Flores A, Sarasa JL. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related protein in a rare variant of hepatic neoplasm (sclerosing hepatic carcinoma). *Hum Pathol.* 1996;27:728-31.
- Wietrzyk J, Grynkiewicz G, Opolski A. Phytoestrogens in cancer prevention and therapy-mechanisms of their biological activity. *Anticancer Res.* 2005;25:2357-66.
- Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, Sarkar FH. Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 1998;32:123-31.
- Li Y, Sarkar FH. Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2369-77.