



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2019

**ANA ISABEL  
RIBEIRO DA  
CUNHA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
LRP1B EM TUMORES DE OVÁRIO**



## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





**ANA ISABEL  
RIBEIRO DA  
CUNHA**

## **ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LRP1B EM TUMORES DE OVÁRIO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Raquel Lima, Investigadora no Grupo *Cancer Signaling and Metabolism* do i3S/ IPATIMUP, Professora Afiada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e coorientação científica da Doutora Sónia Mendo, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.



O trabalho apresentado nesta tese faz parte do projeto “PTDC/MEC-ONC/31520/2017 - Previsão da resposta dos pacientes a fármacos antineoplásicos lipossomais: focando na atividade endocítica do LRP1B” financiado pelos Fundos Europeus Estruturais e de Investimento (FEEI) no âmbito do COMPETE 2020-Programa Operacional de Competitividade e Internacionalização (POCI) apoiado pelo FEDER e por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Integrou ainda o projeto “Advancing cancer research: from basic knowledge to application” NORTE-01-0145-FEDER-000029: “Projetos Estruturados de I & D & I”, financiado pelo Norte 2020—Programa Operacional Regional do Norte.



Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundos Europeus  
Estruturais e de Investimento





Parte do trabalho realizado durante esta tese foi incluída na seguinte “Comunicação na forma de Poster” (da qual sou primeira autora) que foi recentemente aceite para apresentação no *8<sup>th</sup> i3s Annual Meeting*, 28-29 novembro de 2019 (Anexo I):

**Ana Isabel Cunha**, Isabel Sousa, Raquel Portugal, Etel R. P. Gimba, Hugo Prazeres, Paula Soares, Raquel T. Lima

“LRP1B expression in ovarian cancer tissues: An immunohistochemical approach”





Dedicada aos meus pais Anabela e José e aos meus irmãos João e Marta.



## **o júri**

Presidente	Professor Doutor António José de Brito Fonseca Mendes Calado Professor Auxiliar, Universidade de Aveiro
Vogal (Arguente Principal)	Doutora Diana Duarte de Sousa Investigadora Pós-Doutorada, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto / Instituto de Investigação e Inovação em Saúde – Universidade do Porto (IPATIMUP/ i3S)
Vogal (Orientador)	Doutora Raquel Maria Torres Lima Investigadora Júnior, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto/ Instituto de Investigação e Inovação em Saúde- Universidade do Porto (IPATIMUP/ i3S) Professora Afiliada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto



## agradecimentos

Um agradecimento muito especial a todos aqueles que contribuíram para este trabalho:

Agradeço ao i3S/IPATIMUP e à Universidade de Aveiro por me terem aceite como aluna, contribuindo deste modo para o meu percurso como profissional.

Agradeço à Doutora Paula Soares por me ter acolhido no grupo “*Cancer Signaling and Metabolism*” e por me ter coorientado, assim como toda a ajuda que ofereceu na realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Raquel, por ter aceite orientar-me e por todos os seus conhecimentos que partilhou comigo ao longo deste ano, mas sobretudo por ser a melhor orientadora do Mundo.

Agradeço à Doutora Sónia Mendo pela sua disponibilidade, esclarecimentos e ajuda para este trabalho.

Um obrigado à Sofia e à Catarina pela vossa disponibilidade em ajudar-me na realização deste trabalho. Um obrigado muito especial à Isabel Sousa por ter fornecido as amostras utilizadas e por toda a sua ajuda que contribuiu para este trabalho.

Agradeço à Dra. Raquel Portugal por ter contribuído para este projeto. Um obrigado às minhas amigas Sara, Ana, Maria João, Mila e Ana Gonçalves, por terem me acompanhado durante todos os dias, nos bons e nos maus momentos. Por serem as minhas confidentes e amigas do coração e por terem me dado bons momentos inesquecíveis. Nunca vos vou esquecer!

Agradeço ao Marcos por toda a sua ajuda e carinho oferecido e por ser a pessoa mais paciente que eu conheço. Agradeço a toda a minha família que me apoiou e aturou-me nesta longa jornada, principalmente à minha irmã Marta, que me animou com os GIFs do *Messenger* sempre que eu estava em baixo, e ao meu irmão João por me ter dado força. Um obrigado especial à minha mãe, Anabela e ao meu pai, José, por me ter oferecido esta oportunidade para estudar e de desenvolver os meus conhecimentos para um melhor futuro, mas sobretudo por todo o vosso amor.



**palavras-chave** LRP1B, cancro, imunohistoquímica, Western blot, anticorpos, tumores de ovário

**resumo** O LRP1B (Recetor de lipoproteína de baixa densidade ligado à proteína 1B), pertencente à superfamília de recetores de lipoproteína de baixa densidade, interage com vários ligandos e serve como mediador da endocitose. O seu gene está descrito como sendo um dos 10 genes mais deletados em cancro. Embora o papel do LRP1B no cancro não seja ainda totalmente claro, pensa-se que a sua atividade endocítica possa desempenhar um papel importante na modulação da disponibilidade de fatores no microambiente tumoral. Pode ainda intervir na internalização de fármacos e assim contribuir para a resistência de terapias lipossomais, como por exemplo à doxorubicina lipossomal em cancro de ovário. A maioria dos estudos sobre a disfunção do LRP1B têm por base a análise de DNA/RNA. Embora haja alguns estudos que referem a utilização de anticorpos para a deteção da proteína LRP1B, a informação é ainda escassa, provavelmente devido à pouca informação sobre os anticorpos utilizados e ao facto do LRP1B ser uma proteína de elevado peso molecular, codificada por um cDNA longo difícil de clonar. Nos últimos anos, novos anticorpos para o LRP1B têm começado a aparecer o que poderá ajudar na melhor caracterização da função desta proteína em cancro. Assim, este projeto teve como objetivo principal a análise da expressão e localização de LRP1B em carcinoma de ovário com recurso a anticorpos comerciais, usando as metodologias de *Western blot* e imunohistoquímica (IHQ). Pretendeu-se ainda com este trabalho adquirir competências em cultura celular de linhas celulares tumorais humanas e em metodologias de análise da resposta a fármacos usando, como modelo, linhas celulares de carcinoma de ovário com sobre-expressão de LRP1B. Se por um lado, não foi possível avaliar a expressão de LRP1B em linhas celulares tumorais de ovário por *Western blot* (devido à inespecificidade dos anticorpos usados nas condições testadas) por outro lado, os resultados obtidos com a metodologia de IHQ foram bastante positivos. De facto, foi possível não só a otimização dos anticorpos como também o seu uso na análise da expressão do LRP1B em cancro de ovário. Foi analisada uma série de amostras de carcinoma de ovário obtidas de pacientes sujeitas a tratamento com quimioterapia que incluía dois grupos: um de pacientes tratadas com doxorubicina lipossomal ("tratadas com DL") e outro de pacientes tratadas com outras quimioterapias ("não tratadas com DL"). O padrão de marcação LRP1B observado era maioritariamente citoplasmático e, em alguns casos, membranar. Uma análise semi-quantitativa dos casos permitiu fazer uma avaliação relativamente à intensidade da marcação de LRP1B (ausente, fraca, moderada e forte) e à percentagem de células tumorais marcadas positivamente (< 5%; 5-25%; 25-50%, 50-75% e > 75%). Não houve diferenças significativas na expressão do LRP1B entre os casos e os controlos. Por último, foi analisada a resposta de uma linha de carcinoma de ovário com sobre-expressão de LRP1B à doxorubicina lipossomal, tendo-se verificado uma tendência de aumento da sensibilidade a este fármaco, quando comparada com as células transfectadas com o vetor vazio. O presente trabalho não só permitiu adquirir competências no estudo da resposta de células a fármacos, como também no estudo da análise de proteínas em linhas celulares e em tecidos. Os resultados obtidos serão importantes para avaliar a relevância da expressão de LRP1B na resposta à terapia lipossomal de pacientes com carcinoma de ovário em tratamento.





**keywords**

LRP1B, cancer, immunohistochemistry, Western blot, antibodies, ovarian cancer

**abstract**

LRP1B (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B), belonging to the low-density lipoprotein receptor superfamily, interacts with various ligands and acts as a mediator of endocytosis. Its gene is described as one of the 10 most deleted in cancers. Although LRP1B's role in cancer has not been fully explored, its endocytic activity may play an important role in modulating the presence of tumor microenvironment factors. It may also affect drug internalization and contribute to resistance towards liposomal therapies, namely to liposomal doxorubicin in ovarian cancer. Most studies that focus on the dysfunction of LRP1B are based on DNA/RNA analysis. Although there are some studies reporting the use of antibodies for the detection of LRP1B protein, information is still scarce, probably due to limitations on the antibodies used and to the fact that LRP1B is a high molecular weight protein, encoded by a long cDNA difficult to clone. In the recent years, new antibodies to LRP1B have appeared which may allow to better characterize the function of this protein in cancer.

Therefore, this project aimed to analyze the expression and localization of LRP1B in ovarian carcinoma with commercially available antibodies, using Western blot and immunohistochemistry (IHC) methodologies. This work also aimed at the acquisition of competencies in cell culture of human tumor cell lines and in drug response analysis methodologies, using LRP1B-overexpressing ovarian carcinoma cell lines as a model.

Although it was not possible to evaluate LRP1B expression in ovarian tumor cell lines using Western blot (due to the lack of specificity of the antibodies used under the conditions tested) the results obtained with the IHC methodology were very positive. In fact, it was possible not only to optimize antibodies but also to use them to analyze LRP1B expression in ovarian cancer. A series of samples of ovarian carcinomas obtained from patients treated with chemotherapy comprising two groups were analyzed: patients treated with liposomal doxorubicin ("treated with DL") and controls treated with other chemotherapies ("non-treated with DL"). LRP1B staining pattern was mostly cytoplasmic and, in some cases, membranous. A semi-quantitative analysis of the cases allowed their evaluation in terms of intensity of LRP1B staining (absent, weak, moderate and strong) and also of the percentage of positively stained tumor cells (< 5%; 5-25%; 25-50%; 50-75% and > 75%). There were no significant differences in LRP1B expression between "treated with DL" and "not treated with DL".

Finally, the response to liposomal doxorubicin of an LRP1B-overexpressing ovarian carcinoma line was analyzed, and a tendency to increased sensitivity to this drug was observed, when comparing to cells transfected with the empty vector.

The present work allowed not only to acquire competencies in the study of cell response to drugs, but also in the study of protein analysis in cell lines and tissues. The results obtained will be important to evaluate the relevance of LRP1B expression in the response of patients undergoing ovarian carcinoma treatment to liposomal therapy.



# Índice

Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas .....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. LRP1B – Recetor de lipoproteína de baixa densidade ligado à proteína 1B .....	3
1.2. Membro da família dos recetores de lipoproteínas de baixa densidade.....	3
1.3. Função do LRP1B e o seu envolvimento no cancro.....	6
1.4. Limitações no estudo da função do LRP1B.....	9
1.5. Objetivos .....	12
2. Materiais e Métodos .....	13
2.1. Cultura Celular.....	15
2.1.1. Estudo da viabilidade celular após tratamento com fármaco .....	15
2.2. Análise da expressão proteica em linhas celulares tumorais por Western blot .....	16
2.2.1. Preparação dos lisados proteicos.....	16
2.2.2. Quantificação proteica .....	16
2.2.3. Western blot .....	17
2.2.3.1. SDS-PAGE ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ).....	17
2.2.3.2. Transferência e revelação .....	17
2.2.3.3. <i>Stripping</i> .....	18
2.2.4. Imunohistoquímica .....	18
2.2.4.1. Amostras .....	18
2.2.4.2. Análise da expressão de LRP1B .....	18
2.3. Análise estatística.....	20
3. Resultados e Discussão.....	21
3.1. Análise da expressão e localização de LRP1B em carcinoma de ovário usando as metodologias de Western blot e imunohistoquímica .....	23
3.1.1. Análise da expressão do LRP1B em linhas celulares por Western blot.....	23
3.1.2. Análise da expressão de LRP1B em tecidos humanos pela técnica de imunohistoquímica ...	26
3.2. Aquisição de competências em cultura celular de linhas celulares tumorais humanas e análise da resposta a um fármaco .....	34
3.2.1. Determinação da resposta de linhas celulares de ovário à doxorubicina lipossomal .....	34
4. Conclusões Gerais.....	37
5. Referências .....	43
6. Anexo I.....	49



## Lista de Figuras

**Figura 1** – Os sete membros principais da família LDLR em humanos.

**Figura 2** – Homologia estrutural entre o LRP1 e do LRP1B.

**Figura 3** – Comparação da estrutura proteica do LRP1B endógeno e o recetor contendo apenas o domínio IV (minirecetor).

**Figura 4** – Análise da expressão do LRP1B em células de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR8) transfectadas com mLRP1B ou com o vetor vazio (EV).

**Figura 5** – Análise da expressão do LRP1B em células de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR8) transfectadas com mLRP1B ou com o vetor vazio (EV).

**Figura 6** – Análise da expressão de LRP1B em tecidos de tiroide humana normal por IHQ, utilizando diferentes tampões na recuperação antigénica.

**Figura 7** – Análise de expressão de LRP1B em tecidos de tiroide humana normal, por IHQ, usando diferentes metodologias de recuperação antigénica em tampão EDTA.

**Figura 8** – Análise da expressão do LRP1B em diferentes tecidos humanos.

**Figura 9** – Comparação da intensidade de marcação entre o Anticorpo A e o Anticorpo B.

**Figura 10** – Diferentes intensidades de expressão de LRP1B observadas nos tecidos de carcinoma de ovário, por IHQ.

**Figura 11** – Análise da viabilidade celular das células OVCAR8 transfectadas com mLRP1B ou vetor vazio (EV), após tratamento com doxorubicina lipossomal.



## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1** – Alguns ligandos que interagem com o LRP1B.

**Tabela 2** – Diferentes condições testadas para a otimização dos anticorpos para IHQ.

**Tabela 3** – Sumário dos dados clínico-patológicos da série de carcinoma de ovário estudada.

**Tabela 4** – Classificação da expressão de LRP1B de acordo com a percentagem de células tumorais marcadas e intensidade de marcação.

**Tabela 5** – Resultados da análise da expressão de LRP1B na serie de carcinomas de ovário analisados.

**Tabela 6** – *Score* de marcação do LRP1B por IHQ em 43 amostras.





## Lista de Abreviaturas

---

ApoE	Apolipoproteína E
ApoER2	Receptor Apolipoproteína E2
ApoJ	Clusterina
APP	Proteína precursora de beta-amiloide
cDNA	DNA complementar
CGH	Hibridização genética comparativa
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanina
DL	Doxorrubicina lipossomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
HPV	Vírus do papiloma humano
HRG	Glicoproteína rica em histidina
IHQ	Imunohistoquímica
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LDLR	Receptores de Lipoproteínas de Baixa Densidade
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i> (Receptor de lipoproteína de Baixa Densidade ligado à Proteína 1)
LRP1B	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1B</i> (Receptor de lipoproteína de Baixa Densidade ligado à Proteína 1B)
LRP2	<i>Low density lipoprotein-related protein 2</i> (Receptor de lipoproteína de Baixa Densidade ligado à Proteína 2)
LRPAP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1</i>
LRP-DIT	LRP-“ <i>deleted in tumors</i> ”
mLRP1B	Minireceptor de lipoproteína de Baixa Densidade ligado à Proteína 1B
mLRP1B4	<i>domain IV-containing minireceptor</i>
MMP	Metaloproteínases de matriz
mRNA	RNA mensageiro
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogénio 1



PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGF-R	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
RAP	<i>Receptor-associated protein</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SAP	Componente P de amiloide sérico
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
uPA	Ativador do plasminogénio da uroquinase
uPAR	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i> (Receptor do ativador do plasminogénio da uroquinase)
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDLR	Receptor de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VTN	Vitronectina
WB	<i>Western blot</i>

---



# 1. Introdução

---



### **1.1. LRP1B – Recetor de lipoproteína de baixa densidade ligado à proteína 1B**

O gene LRP1B (Recetor de lipoproteína de baixa densidade ligado à Proteína 1B), inicialmente designado como LRP-DIT (*LRP-“deleted in tumors”*), localiza-se no cromossoma 2 (2q21.2) (C.-X. Liu, Li, Obermoeller-McCormick, Schwartz, & Bu, 2001). Está descrito como um dos 10 genes mais deletados em cancros humanos incluindo: pulmão, tiroide, mama, do ovário, urotelial e melanoma (Prazeres *et al.*, 2011), sendo considerado um possível gene supressor tumoral (C. X. Liu *et al.*, 2000). São vários os mecanismos associados à perda/diminuição da expressão do LRP1B, como: i) cromossómicos, onde o gene é deletado/mutado (Prazeres *et al.*, 2011) e ii) epigenéticos, envolvendo alterações na metilação do DNA (Asano *et al.*, 2019; Prazeres *et al.*, 2011), a desacetilação de histonas (Shiseki *et al.*, 1994; Sonoda *et al.*, 2004) e a expressão de microRNAs (Prazeres *et al.*, 2011).

### **1.2. Membro da família dos recetores de lipoproteínas de baixa densidade**

O gene LRP1B codifica um recetor com o mesmo nome que pertence à grande família de recetores de superfície celular “LDLR” (*Low density lipoprotein receptors*). Os LDLR foram descritos pela primeira vez por Joseph Goldstein e Michael Brown enquanto investigavam a possível associação de mutações no cromossoma 19 com hipercolesterolemia familiar (Brown & Goldstein, 1986). Esta família de recetores é composta por um grupo de glicoproteínas presentes na membrana celular (Beffert, Stolt, & Herz, 2004; Dietrich *et al.*, 2010). Até à data são reconhecidos treze membros desta família em humanos (HUGO Gene Nomenclature Committee, disponível em <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/634>, acessado em 20-05-2019), sendo que sete compõem um grupo “central” (Herz, Chen, Masiulis, & Zhou, 2009) altamente conservado ao nível estrutural (Figura 1). Estes membros contêm, no seu N-terminal, um domínio com repetições de ligações a ligandos (de comprimento variável), seguido por um domínio homólogo ao precursor do fator de crescimento epidérmico (EGF), ao qual se segue um domínio de açúcar ligado a oxigénio (nos casos das proteínas LDLR, VLDLR e ApoER2) ou um segmento de ligação a ligandos (no caso das proteínas LRP1, -1B e -2), um domínio transmembranar e, por fim, uma cauda citoplasmática contendo pelo menos um motivo endocítico NPXY (Herz *et al.*, 2009). Como é possível constatar na Figura 1, alguns membros desta família (as proteínas LRP1, -1B e -2), apresentam particularidades na sua estrutura, possuindo domínios relativamente longos que lhes conferem tamanhos bastante maiores que os demais (Go & Mani, 2012).

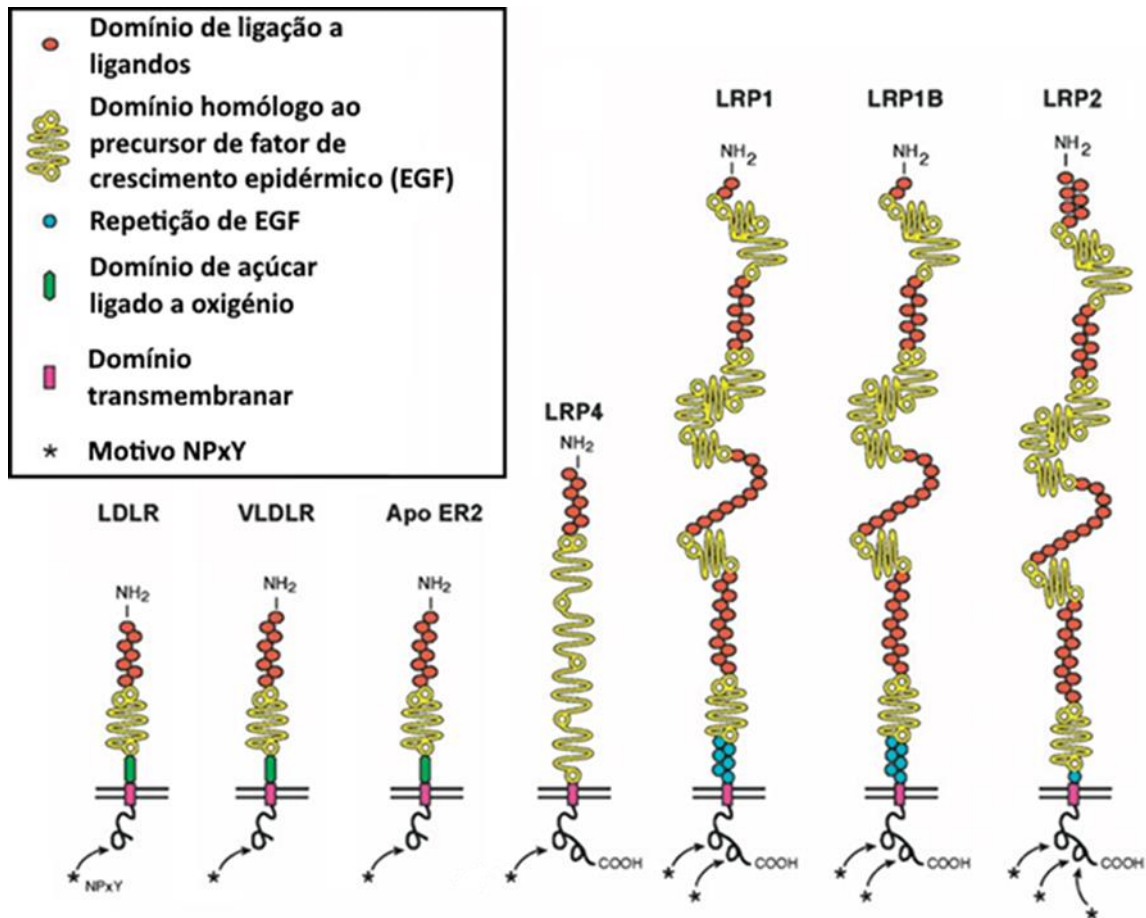
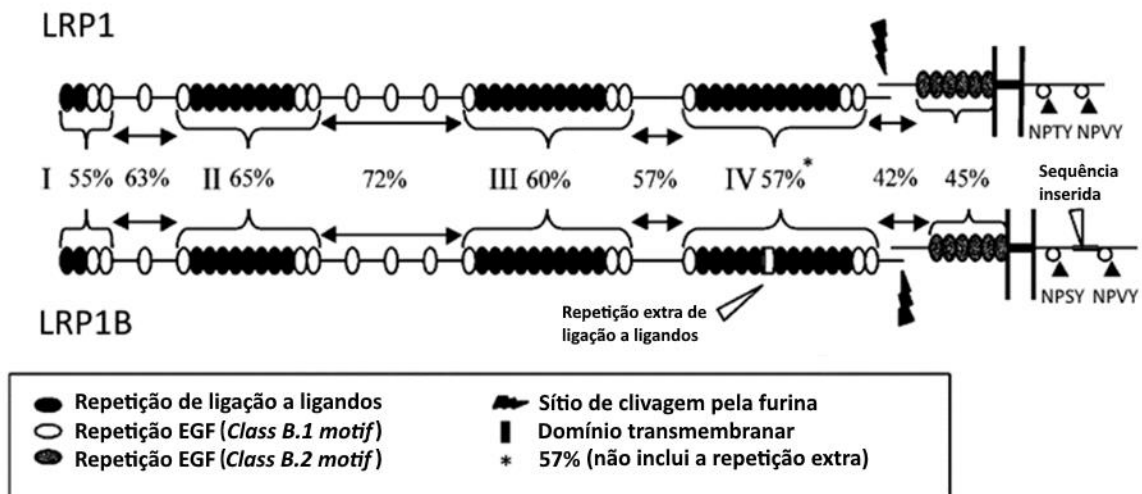


Figura 1 – Os sete membros principais da família LDLR em humanos. (Adaptado de Herz *et al.*, 2009)

O LRP1B é um dos membros de maior tamanho desta família, possuindo 4599 aminoácidos e com um peso molecular aproximado de 600 kDa (Beer *et al.*, 2016; C.-X. Liu *et al.*, 2001). Esta proteína é codificada por um gene com 91 exões (16,5 Kbp) (C.-X. Liu *et al.*, 2001). A sua formação envolve um processo de modificação pós-tradução que envolve uma endopeptidase, a furina. Assim, e após uma clivagem proteolítica, origina-se um heterodímero composto por uma subunidade extracelular de aproximadamente 515 kDa e por uma subunidade transmembranar com 85 kDa (C.-X. Liu *et al.*, 2001) ligadas não covalentemente (May, Woldt, Matz, & Boucher, 2007). É de realçar a sua elevada homologia estrutural com o outro recetor, o LRP1 (Figura 2).





**Figura 2 – Homologia estrutural entre o LRP1 e do LRP1B.** As percentagens representam o grau de homologia (ao nível dos aminoácidos) entre os dois recetores. (Adaptado de C.-X. Liu *et al.*, 2001)

Ambos os recetores são compostos por: i) quatro domínios de ligação a ligandos (I, II, III e IV) separados entre si por regiões homólogas de precursores de EGF (Haas *et al.*, 2011; C.-X. Liu *et al.*, 2001); ii) um domínio transmembranar e iii) uma cauda citoplasmática (Beer *et al.*, 2016; Haas *et al.*, 2011; C.-X. Liu *et al.*, 2001) com cinco motivos de endocitose: dois motivos de di-leucina, dois motivos NPXY e um motivo YXXL (Y. Li, Lu, & Bu, 2005). No entanto, existem algumas características que os distinguem como: i) o tamanho médio dos intrões ser dez vezes maior no LRP1B; ii) haver no domínio IV do LRP1B uma ligação extra para associação a ligandos (Y. Li *et al.*, 2005) e iii) o LRP1B possuir dois exões adicionais: o exão 68, que codifica uma repetição extra de ligação a ligandos no domínio IV (Haas *et al.*, 2011) e o exão 90, que codifica uma sequência de 33 aminoácidos na cauda citoplasmática (não havendo homólogo em nenhum outro LRP) (Pohlkamp, Wasser, & Herz, 2017).

### 1.3. Função do LRP1B e o seu envolvimento no cancro

No geral, a família dos LDLR (também conhecidos como recetores endocíticos da superfície celular (H. Wang, 2017)) interage com vários ligandos, tendo por isso um papel crucial na ligação e internalização de lipoproteínas e de complexos lipídicos (Go & Mani, 2012).

Os LRPs, em particular, possuem nas suas caudas citoplasmáticas elementos que são cruciais para a interação com adaptadores citoplasmáticos e proteínas do esqueleto celular (“*scaffold*”) (Bu, Li, & Cam, 2001). O facto de reconhecerem substratos para além de lípidos faz com que possam também atuar como mediadores na transdução de sinal e em processos de endocitose (Knisely *et al.*, 2007; Shiroshima, Oka, & Kawaichi, 2009; Sousa, Rodrigues, Prazeres, Lima, & Soares, 2018), assim como na entrada celular de vírus e toxinas e na ativação de enzimas lisossomais (Wasan, Brocks, Lee, Sachs-Barrable, & Thornton, 2008).

Dadas as já referidas semelhanças entre o LRP1B e LRP1, muitos ligandos descritos para estas proteínas (cerca de 30) são comuns (Lillis, Van Duyn, Murphy-Ullrich, & Strickland, 2008), sendo que alguns destes ligandos e a função que desempenham são referidos na Tabela 1. Embora possam ter os mesmos ligandos, as suas taxas de endocitose variam, estando descrito que a taxa de endocitose apresentada pelo LRP1B é mais baixa do que a do LRP1, nomeadamente para algumas proteinases (Cam *et al.*, 2004; C.-X. Liu *et al.*, 2001).

**Tabela 1 – Alguns ligandos que interagem com o LRP1B**

<b>Ligandos</b>	<b>Categoria Funcional</b>	<b>Referências</b>
<b>Clusterina (ApoJ)</b>	Metabolismo de lipoproteínas	(Pohlkamp <i>et al.</i> , 2017)
<b>Vitronectina (VTN)</b>	Adesão e migração celular	(Haas <i>et al.</i> , 2011)
<b>Glicoproteína rica em histidina (HRG)</b>	Coagulação sanguínea	(Haas <i>et al.</i> , 2011)
<b>Componente P de amiloide sérico (SAP)</b>	Estabilizador de agregados peptídicos Previne a clivagem proteolítica	(Haas <i>et al.</i> , 2011)
<b>Ativador do plasminogénio da uroquinase (uPA)</b>	Migração celular	(Y. Li <i>et al.</i> , 2002; C.-X. Liu <i>et al.</i> , 2001)
<b>Inibidor do ativador do plasminogénio 1 (PAI-1)</b>	Regula a atividade de tPA/uPA	(Y. Li <i>et al.</i> , 2002)
<b>Proteína precursora de <math>\beta</math>-amiloide (APP)</b>	Precursor de proteínas amiloide	(Cam <i>et al.</i> , 2004; Pohlkamp <i>et al.</i> , 2017)
<b>LRPAP1 (RAP)</b>	<i>Chaperone</i>	(Haas <i>et al.</i> , 2011; C.-X. Liu <i>et al.</i> , 2001)
<b>Apolipoproteína E (ApoE)</b>	Metabolismo de lipoproteínas	(Haas <i>et al.</i> , 2011)
<b>Antitrombina</b>	Regula coagulação sanguínea	(Herz & Strickland, 2001)
<b>Factor IXa</b>	Coagulação sanguínea	(Herz & Strickland, 2001)
<b>tPA</b>	Fibrinólise; Função na sinalização no cérebro	(Herz & Strickland, 2001)
<b>PDGF-R</b>	Migração de células de músculo liso	(Tanaga <i>et al.</i> , 2004)

De realçar que de entre os diversos ligandos, alguns estão associados a cancro, como por exemplo: metaloproteínases de matriz (MMPs) (Prazeres *et al.*, 2011; Song, Li, Lee, Schwartz, & Bu, 2009), complexos lipoproteicos (Prazeres *et al.*, 2011), fatores de crescimento (como o PDGF e TGF- $\beta$ ) (Takeda *et al.*, 2016; Tanaga *et al.*, 2004) e membros do ativador do plasminogénio da uroquinase (uPA) (Y. Li *et al.*, 2002; Tang & Han, 2013).

Como já referido, o LRP1B foi inicialmente descoberto como um gene frequentemente inativado em cancro de pulmão (C.-X. Liu *et al.*, 2001) e foi posteriormente descrito como sendo um dos genes

mais alterados em 3131 perfis genéticos de câncros (a sua maioria correspondendo a 26 tipos histológicos (Beroukhim *et al.*, 2010)). Assim é expectável que o seu envolvimento com o cancro seja uma área de interesse para a investigação, embora o seu papel não esteja totalmente esclarecido.

Alguns trabalhos anteriormente publicados têm explorado a relação entre a sua inativação e mecanismos associados a cancro, nomeadamente proliferação e invasão. Foi descrito em linhas celulares de CHO (*chinese hamster ovary*) que o LRP1B age como um regulador negativo da uPAR (Y. Li *et al.*, 2002). A inativação deste recetor poderá estar associada à ativação da cascata de sinalização de plasminogénio e ao conseqüente aumento da capacidade invasiva das células (Y. Li *et al.*, 2002). Liu *et al.* demonstraram que a resposta inflamatória e a proliferação de células da glia (H4) é afetada negativamente pela remoção do domínio intracelular do LRP1B após este sofrer uma proteólise intramembranar por um processo que depende da  $\gamma$ -secretase (C.-X. Liu, Ranganathan, Robinson, & Strickland, 2007). Wang *et al.* descobriram que o silenciamento do LRP1B (com *shRNA*) em linhas celulares de cancro de colon resulta num aumento da sua proliferação e migração, conseqüência da ativação aberrante da via de sinalização  $\beta$ -catenina/TCF (Z. Wang *et al.*, 2017).

Para além disto, a possibilidade do LRP1B poder modular o ambiente extracelular e, deste modo, afetar o potencial invasivo das células foi também alvo de análise de um estudo anterior do nosso grupo. Nesse estudo, analisando um meio condicionado de células de cancro da tiroide (8505C) com sobre-expressão de LRP1B, foi observado uma diminuição de algumas citocinas e metaloproteinases (Prazeres *et al.*, 2011). Estas células demonstraram também uma redução da sua capacidade invasiva em relação às transfectadas com o vetor vazio (Prazeres *et al.*, 2011). Isto poderá dever-se a mudanças no microambiente celular potenciadas pelo LRP1B, nomeadamente através da depleção de intermediários importantes de sistemas proteolíticos, como por exemplo o uPA (Prazeres *et al.*, 2011). O LRP1B poderá, deste modo, ser considerado também em abordagens terapêuticas, não focado nas células mas sim no microambiente tumoral (Prazeres *et al.*, 2011).

Um outro aspeto a considerar na função do LRP1B, que tem a ver com a sua atividade endocítica, é o seu possível envolvimento na internalização de fármacos (através de lipossomas) (Chung & Wasan, 2004), na medida em que a perda de expressão do LRP1B poderá contribuir para um aumento da resistência a terapias lipossomais (Cowin *et al.*, 2012). De facto, um estudo anterior de Cowin *et al.* em cancro de ovário demonstrou que a deleção ou diminuição de expressão do LRP1B se associava a uma pior resposta dos pacientes à terapia com doxorrubicina lipossomal (DL). Para além disso, usando linhas celulares de carcinoma do ovário, os mesmos autores verificaram uma diminuição da sensibilidade à DL em linhas celulares de cancro de ovário transfectadas com siRNAs

LRP1B, e o inverso quando sobre-expressavam LRP1B (i.e. um aumento na sensibilidade após o aumento de expressão de LRP1B por transfecção de LRP1B (Cowin *et al.*, 2012)).

#### **1.4. Limitações no estudo da função do LRP1B**

Embora haja vários estudos apontando uma relação entre alterações do LRP1B e o cancro, o seu papel continua por clarificar, em parte devido à dificuldade do estudo do LRP1B ao nível proteico. As próprias características do LRP1B dificultam o seu estudo, em particular o seu elevado tamanho, que ao nível do cDNA (16,5 kbp) (C.-X. Liu *et al.*, 2001) impossibilita a sua clonagem e o consequente estudo com recurso à sua sobre-expressão. Assim, a maioria dos estudos tem por base a sua análise ao nível do DNA e RNA, não havendo muita informação relativamente à sua expressão ao nível proteico, principalmente no que se refere à sua localização subcelular em tecidos.

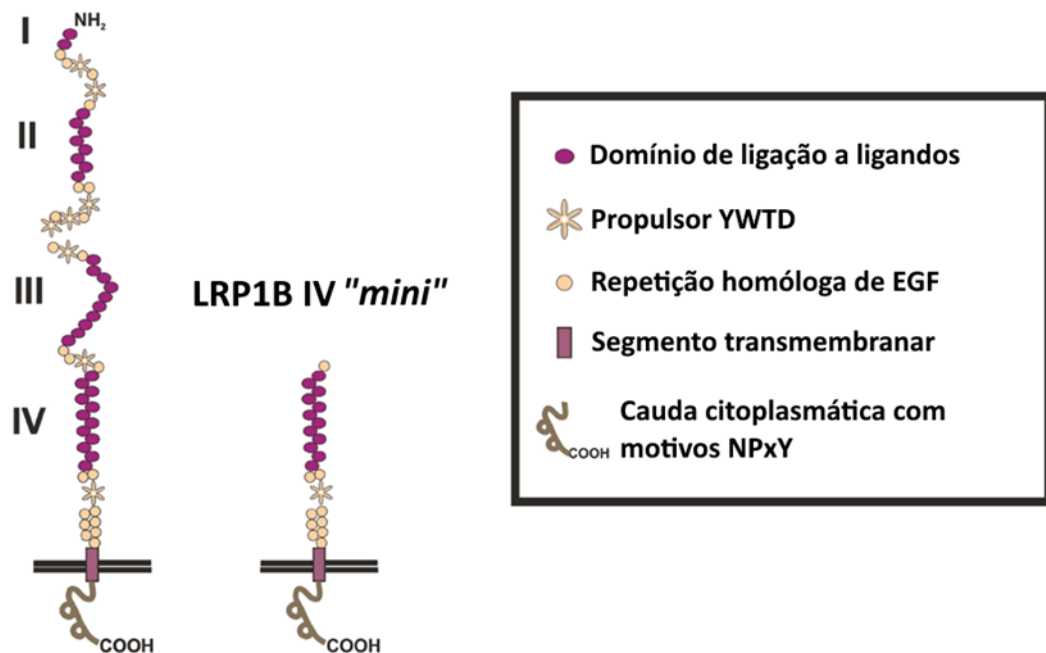
Ao nível do DNA, são vários os estudos que, através de diferentes metodologias, descrevem vários tipos de alterações em tumores de pacientes (ou linhas celulares tumorais), que incluem: deleções/mutações (Cowin *et al.*, 2012; B. Li *et al.*, 2019), alterações nos padrões de metilação (Nakagawa *et al.*, 2006; Prazeres *et al.*, 2011; Sonoda *et al.*, 2004), ou na acetilação de histonas e a expressão de microRNAs (Prazeres *et al.*, 2011; Zheng & Bai, 2019). Essas metodologias incluem sequenciação de Sanger e *Next Generation Sequencing* (B. Li *et al.*, 2019; Ross *et al.*, 2014), hibridização genética comparativa (CGH) (Hirai *et al.*, 2004) e análise de padrões de metilação com *microarrays* para ilhas CpG (Nakagawa *et al.*, 2006; Prazeres *et al.*, 2011; Sonoda *et al.*, 2004).

Relativamente aos estudos de LRP1B tendo por base a análise de RNA, Ni *et al.* analisaram, por hibridização *in situ*, os níveis da expressão de LRP1B em tecidos de carcinomas de células renais, verificando a sua ausência (Ni *et al.*, 2013). Noutro estudo, também através de hibridização *in situ*, Liu *et al.* verificaram que a expressão do mRNA do LRP1B em tecidos de carcinomas de células escamosas cervicais era significativamente inferior quando comparado com a expressão em tecidos cervicais normais (L. Liu, Ren, Han, Sun, & Zhu, 2018).

Para a análise de proteínas, duas técnicas frequentemente usadas são: *Western blot* (WB) e imunohistoquímica (IHQ), ambas baseadas no uso de anticorpos específicos para detetar a proteína de interesse. Embora haja alguns estudos publicados relativos à expressão do LRP1B usando estas metodologias, estes são escassos. Os estudos que usam a metodologia de WB e que apresentam os níveis desta proteína em tumores e em tecidos normais (ou mesmo em linhas celulares) usam na sua maioria anticorpos não comerciais e/ou a informação que existe sobre os anticorpos utilizados é escassa (C.-X. Liu *et al.*, 2001; Marschang *et al.*, 2004). Há, no entanto, atualmente mais

anticorpos para o LRP1B a aparecerem comercialmente (Z. Wang *et al.*, 2017). Como já referido, o tamanho do LRP1B dificulta o seu estudo (Beer *et al.*, 2016), justificando também a escassez de estudos nesta área. Uma das estratégias que tem sido mais utilizada para estudar este recetor (e as suas associações) ao nível proteico tem por base a sobre-expressão da proteína nas células com recurso a minireceptores (Asano *et al.*, 2019) que mimetizam, pelo menos em parte, a função da proteína. O primeiro minireceptor descrito para o LRP1B, denominado “mLRP1B4 (*domain IV-containing minireceptor*)”, foi desenvolvido por Liu *et al.* (Figura 3) integrando os aminoácidos 3276 a 4599 do LRP1B, que correspondem à repetição de domínios de ligação a ligandos e à repetição EGF presentes no domínio IV, no terminal citoplasmático do recetor (C.-X. Liu *et al.*, 2001). Esta estratégia foi particularmente importante para a descrição de alguns dos ligandos do LRP1B, como o RAP [*receptor-associated protein* que funciona como inibidor do LRP1B (assim como do LRP1 e do LRP2)], da uPA, tPA e PAI-1, anteriormente referidos (Cam *et al.*, 2004; C. X. Liu *et al.*, 2001). Para além disso, esta estratégia tem dado algumas indicações importantes no que se refere à função do LRP1B na proliferação/invasão.

### LRP1B "full length"



**Figura 3** – Comparação da estrutura proteica do LRP1B endógeno e o recetor contendo apenas o domínio IV (minireceptor). (Adaptado de Beer *et al.*, 2016)

Apesar de os minireceptores serem boas ferramentas para investigar a função de várias proteínas (como verificado para o LRP1), o facto de no minireceptor apenas se incluir uma parte da proteína (Figura 3) poderá limitar o estudo da função da proteína na sua totalidade. Embora o ideal fosse a transfecção de células com o LRP1B humano total, até à data só um estudo apresentou a possibilidade de clonar o gene homólogo (*lrp1b*) de ratinhos (Beer *et al.*, 2016). Neste estudo, através da transfecção de linhas celulares de cancro de pulmão com este “*Lrp1b* completo” (de ratinho) foi possível confirmar a diminuição nos níveis de proliferação celular (Beer *et al.*, 2016), como previamente observado noutros estudos efetuados com mLRP1B4 e o carácter de supressor tumoral do LRP1B (C.-X. Liu *et al.*, 2001). No mesmo estudo é ainda referido que certos ligandos, que interagem com o mLRP1B4 (nomeadamente o Fibrinogénio e VLDL), não foram capazes de se ligar ao *Lrp1b* expresso com esta metodologia (Beer *et al.*, 2016). Apesar de não se tratar do LRP1B humano, este facto fortalece o argumento que minireceptores limitam o estudo da função da proteína. De qualquer modo, também ao nível da deteção do LRP1B por *Western blot* pode haver limitações nos anticorpos usados.

Relativamente aos estudos de Imunohistoquímica (IHQ) para a análise da expressão de LRP1, a informação é limitada. Num estudo realizado em 2004 usando anticorpo anti-LRP1B produzido em galinha (anti-LRP1B IgY), foi analisada a expressão de LRP1B em artérias coronárias humanas (Tanaga *et al.*, 2004). Num outro estudo, confirmou-se a menor expressão de LRP1B em tumores do colon em relação a tecidos normais (Z. Wang *et al.*, 2017). No entanto, o anticorpo primário utilizado pela equipa não é mencionado no artigo, sendo possível que tenham usado um anticorpo não comercial. Muito recentemente, num estudo realizado por IHQ, onde foi usado um anticorpo comercial anti-LRP1B (Human Protein Atlas, disponível em <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168702-LRP1B/antibody>, acessado em 10-03-2019), é referido que o LRP1B, juntamente com outros dois outros biomarcadores (HMGA2 e TP63), poderiam ser considerados como possíveis marcadores para a estratificação de cancros, em *screenings* de HPV (vírus do papiloma humano) em pacientes com cancro do colo do útero (Jiang *et al.*, 2019). A evidente escassez de estudos, aliada à falta de informação dos anticorpos utilizados ou da especificidade dos anticorpos comerciais disponíveis, foram problemas que tiveram de ser enfrentados durante o presente trabalho.

### **1.5. Objetivos**

Como referido, a grande maioria dos estudos relativos à expressão de LRP1B tem por bases estudos realizados ao nível do DNA (e alguns do RNA), havendo pouca informação relativamente à expressão proteica, principalmente no que respeita à sua expressão ao nível dos tecidos. Existem poucos trabalhos que se referem à expressão proteica do LRP1B, sendo que há limitações no que se refere aos anticorpos e/ou na informação relativa aos mesmos. No entanto, novos anticorpos têm vindo a ser comercializados para o LRP1B.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi analisar a expressão e a localização de LRP1B em carcinoma de ovário usando as metodologias de *Western blot* e imunohistoquímica.

Para além deste objetivo pretendeu-se com este trabalho adquirir competências em cultura celular (de linhas celulares tumorais humanas) e em metodologias de análise da resposta a fármacos usando, como modelo, linhas celulares de carcinoma de ovário com sobre-expressão de LRP1B.



## 2. Materiais e Métodos

---



## 2.1. Cultura Celular

Foram utilizadas duas linhas celulares tumorais humanas de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR8) gentilmente cedidas por colaboradores do grupo. Para além das linhas parentais (*wild type*, Wt) foram usadas as mesmas linhas celulares com sobre-expressão do minireceptor LRP1B (através da transfecção com o vetor mLRP1B, referido na secção 3.1) e com o vetor vazio. A confirmação da sobre-expressão de LRP1B nas linhas transfectadas tinha sido previamente confirmada por PCR quantitativo em tempo real.

Todas as linhas celulares foram mantidas em cultura numa estufa (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C com uma atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>. As linhas celulares foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 com glutamina estável (Gibco), suplementado com 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, inativos por calor, Gibco), 1% de *Penicillina/Streptomycin* (Gibco) e 0,5% de Fungizona (Anfotericina B, Gibco), a partir de agora designado por “Meio Completo”.

Para a manutenção das células ou preparação de células para experiências, quando as culturas atingiam 70-90% de confluência, as células foram tripsinizadas, usando TrypLE Express (Alfagene). Resumidamente, após lavagem das células com PBS (Tampão fosfato salino -*Phosphate Buffer Saline*), as células foram incubadas com 0,5 ml de TrypLE Express (frasco 25 cm<sup>2</sup>) durante 5 minutos a 37 °C. Através da adição de meio completo, foi feita a inativação da ação da tripsina e a diluição das células. As células destacadas foram então divididas em novos frascos ou congeladas a -80 °C [em meio de congelação constituído por 10% DMSO (dimetilsulfóxido) em FBS, e numa caixa de congelação de células (Mr.Frosty, Nalgene) contendo isopropanol] para manutenção dos *stocks* de células para estudos posteriores.

### 2.1.1. Estudo da viabilidade celular após tratamento com fármaco

Após tripsinização das células (de acordo com a secção 2.1), a densidade celular foi determinada. Para isso, 50 µl de suspensão celular foram diluídos em 10 ml de solução ISOTON (Beckman Coulter) e a sua concentração determinada no Z2 *Coulter Particle Counter and Size Analyser* (Beckman Coulter). Após diluição em meio completo, 5x10<sup>3</sup> células/poço, foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µl/poço) e incubadas durante 24 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram incubadas com as diluições seriadas de doxorubicina lipossomal (Caelix, Schering-Plough) de 1,17 µg/ml a 75 µg/ml. Como controlo, as células foram incubadas com meio completo ou com um volume equivalente de solvente (água) ao volume máximo do fármaco. Após 48 h de incubação, lavaram-se os poços duas vezes com meio RPMI (não suplementado) e incubou-se com 50 µl de

Presto Blue™ (Thermo Fisher Scientific, previamente diluído a 10% em meio RPMI completo) durante 45 minutos a 37 °C. Os valores da fluorescência (comprimento de onda de excitação: 560 nm e de absorção 590 nm) foram obtidos utilizando o leitor de multiplacas Synergy Mx (Biotek's Synergy™ Mx Microplate Reader).

## **2.2. Análise da expressão proteica em linhas celulares tumorais por Western blot**

### **2.2.1. Preparação dos lisados proteicos**

Para a obtenção de lisados proteicos celulares, as suspensões celulares (obtidas de acordo com a secção 2.1.) foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos (Centrifuge 5417R, eppendorf). Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 1 ml de PBS, centrifugado novamente. Depois de descartar o sobrenadante, foram adicionados ao *pellet* 30 µl de tampão lise (tampão RIPA constituído por 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA; pH 7,5) suplementado com um *cocktail* de inibidor de proteases sem EDTA (Roche Applied Science) e com inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich). Durante a lise celular, as amostras foram mantidas em gelo durante 10 minutos, com agitação frequente no vórtex. O lisado foi centrifugado a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Centrifuge 5417R, eppendorf), tendo-se recolhido o sobrenadante e armazenado a -20 °C até ser analisado.

### **2.2.2. Quantificação proteica**

Para a quantificação proteica, foi utilizado Kit *Bio-Rad DC Protein Assay* (que tem por base a técnica de Lowry) de acordo com as indicações do fabricante. Resumidamente, foram colocados 5 µl de lisados proteicos em placas de 96 poços (previamente diluídos em água 1:5 ou 1:10), aos quais foram adicionados 25 µl de Reagente A' (previamente preparado por adição de 20 µl de Reagente S a 1 ml de Reagente A), posteriormente 200 µl de Reagente B e incubados durante 15-45 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Para determinação da curva de calibração foram usados padrões de concentração determinada de BSA (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 3 mg/ml). Procedeu-se à determinação dos valores de absorção (comprimento de onda de 655 nm) usando o leitor de placas Synergy Mx (Biotek's Synergy™ Mx Microplate Reader). Os valores obtidos foram usados para a determinação de uma reta padrão que permitiu a determinação, por interpolação, do valor da concentração proteica das amostras em análise.

### 2.2.3. Western blot

#### 2.2.3.1. SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Para a separação das proteínas de acordo com o peso, procedeu-se à eletroforese em SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) usando o sistema Novex, destinado a géis comerciais. Neste trabalho, foram usados géis de gradiente 3% - 8% de poliacrilamida, 1,0 mm x 10 poços (NuPAGE Tris-Acetate Gels, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), recomendado pelo fabricante para proteínas de grande peso molecular. Os géis foram colocados no sistema de eletroforese e submerso em *Running buffer* (Novex Tris-Acetate SDS Running Buffer, Thermo Fisher Scientific), previamente diluído em água destilada. Ao tampão que fica em contacto com os géis (zona interior do sistema) foram adicionados 500 µl de antioxidante (NuPAGE Antioxidant, Thermo Fisher Scientific), de modo a evitar a reoxidação das amostras e a manter as proteínas num estado reduzido durante os processos de eletroforese. Para a preparação das amostras, a 50 µg de lisado celular, juntaram-se 5 µl de *NuPAGE LDS Sample buffer* (Thermo Fisher Scientific), 2 µl de *NuPAGE Sample Reducing Agent 10x* (Thermo Fisher Scientific) e água destilada (dH<sub>2</sub>O) para um volume total de 20 µl. A desnaturação das proteínas foi feita a 70 °C durante 10 minutos num bloco térmico (*Thermomixer Comfort*, Eppendorf). Os lisados foram então carregados nos poços do gel, tendo um dos poços (de cada gel) 10 µl de um marcador de peso molecular (*HiMark Pre-stained Protein Standard*, Thermo Fisher Scientific). Procedeu-se à realização da electroforese, a uma voltagem de 70 V nos primeiros 30 minutos, sendo depois aumentada para 100-120 V durante aproximadamente 1 h.

#### 2.2.3.2. Transferência e revelação

A transferência das proteínas do gel para uma membrana PVDF (iBlot2 PVDF Regular Stacks, Thermo Fisher Scientific) foi feita através do sistema de transferência iBlot2 Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific), 20 V/min durante 7 minutos. Após este período, a membrana foi incubada com *Ponceau S* (Sigma-Aldrich) para verificar a qualidade da transferência. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite com baixo teor de gordura em PBS-Tween 0,2% (PBS-T) durante 1 h à temperatura ambiente com agitação. Procedeu-se então à incubação das membranas com os seguintes anticorpos primários diluídos em 5% leite em PBS-T: *rabbit* anti-LRP1B (PA5-64396, Thermo Fisher Scientific, diluição 1:1000), *rabbit* anti-LRP1B (SAB4200326, Sigma-Aldrich, diluição 1:1000) ambos incubados durante a noite a 4 °C e *mouse* anti-tubulin (Sigma-Aldrich; diluição 1:8000) incubado durante 1 h à temperatura ambiente. Todas as incubações foram sujeitas a

agitação orbital (roller mixer SRT9D, Stuart). Depois de realizadas 3 lavagens das membranas em PBS-T, de 10 minutos incubou-se com o respetivo anticorpo secundário conjugado com HRP, anti-*rabbit* IgG HRP ou anti-*mouse* IgG-HRP (GE Healthcare; diluídos 1:2000 em 5% leite em PBS-T) durante 1 h à temperatura ambiente. Depois de lavada 3 vezes (10 minutos) em PBS-T, a membrana foi incubada com a solução *Western Lightning Plus-ECL* (PerkinElmer), preparada pela adição dos reagentes A e B na proporção 1:1 do respetivo kit. O sinal foi detetado através de exposição ao filme radiográfico (Amersham Hyperfilm).

#### **2.2.3.3. Stripping**

Para analisar a expressão de outras proteínas nas membranas previamente reveladas para outros anticorpos, as membranas foram incubadas com uma solução de “stripping” (2,5 ml de Glicina 1M, 10 ml de 10% SDS e 87,5 ml de dH<sub>2</sub>O) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois foram feitas 5 lavagens com PBS-T de 5 minutos cada lavagem. A membrana foi novamente bloqueada e procedeu-se com o protocolo de incubação com anticorpo, indicado na seção anterior.

#### **2.2.4. Imunohistoquímica**

##### **2.2.4.1. Amostras**

Neste trabalho foram utilizados blocos histológicos pertencentes a um conjunto de pacientes com cancro de ovário sujeitas a quimioterapia. A série inicial era constituída por 68 pacientes, sendo que apenas foram analisados 43 casos neste trabalho por IHQ: 25 receberam terapia com doxorubicina lipossomal (“Tratadas com DL”) e 18 não receberam (“Não tratadas com DL”). Para a IHQ foram utilizados cortes parafinados, previamente seccionados dos blocos histológicos, com uma espessura de 3 µm e aderentes em lâminas adesivas Superfrost®Plus.

##### **2.2.4.2. Análise da expressão de LRP1B**

Para a realização da IHQ, foram usados dois anticorpos policlonais de coelho disponíveis comercialmente e já referidos na secção 2.2.3.2: anti-LRP1B, (PA5-64396, Thermo Fisher Scientific) e anti-LRP1B (SAB4200326, Sigma-Aldrich).

Os cortes de carcinoma de ovário foram desparafinados e hidratados através da imersão sequencial nas seguintes soluções: xilol 1 (10min); xilol 2 (10min); álcool 100% (10min); álcool 95% (5min); álcool 70% (5min); água corrente (5–10min). Foram utilizados dois tampões de recuperação

antigénica, tendo por isso as lâminas sido colocadas num tampão com base de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), *Epitope Retrieval Solution* (10x, pH9 Novacastra, Leica) ou tampão Citrato, pH6 (Citrato Buffer 10x, Thermo Fisher Scientific), ambos diluídos em água. Para a otimização, diferentes métodos de recuperação foram usados: *steamer* a 95 °C durante 45 minutos, panela de pressão a 95 °C durante 30 minutos ou micro-ondas a 600 Watts durante 20 minutos. Após o arrefecimento por aproximadamente 20–30 minutos, foram realizadas 2 lavagens em PBS-Tween 0,02% de 5 minutos, e depois realizou-se o bloqueio da enzima peroxidase endógena, usando o *UltraVision Hydrogen Peroxide Block* (Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a lavagem dos tecidos (três vezes em PBS-Tween 0,02% durante 5 minutos, cada lavagem), procedeu-se ao bloqueio da proteína durante 10 minutos, à temperatura ambiente, usando o *UltraVision Protein Block* (UltraVision Quanto Detection System HRP, Thermo Fisher Scientific). A incubação com os anticorpos primários previamente indicados: anti-LRP1B, Thermo (diluído 1:250, 1:500, 1:750 e 1:1000 em PBS-Tween 0,02%) e anti-LRP1B, Sigma (diluídos 1:500, 1:600 e 1:1000 em PBS-Tween 0,02%) foi realizada durante 1 h à temperatura ambiente. Depois da incubação, procedeu-se a 3 lavagens de 5 minutos em PBS-Tween 0,02% e aplicou-se o “*Primary Antibody Amplifier*” (UltraVision Quanto Detection System HRP, Thermo Fisher Scientific) e “*HRP Polymer Quanto*” (UltraVision Quanto Detection System HRP, Thermo Fisher Scientific), intercalados com 2 lavagens de PBS-Tween 0,02% durante 5 minutos cada lavagem. A revelação foi feita tendo em conta a atividade da peroxidase, expondo o tecido ao cromogénio DAB (3-3'-diaminobenzidina), previamente diluído 3% em diluente (DAB Quanto, Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos. As lâminas foram colocadas em água corrente durante 5 minutos, para remover o excesso de DAB. Após incubação em hematoxilina de Mayer (Thermo Fisher Scientific) com agitação durante 1 minuto, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente durante 5-10 minutos. Procedeu-se à desidratação e clarificação de acordo com a sequência: álcool 96%; álcool 100%; Xilol 1 e Xilol 2 durante 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com um meio de montagem (Richard-Allan Scientific, Thermo Fisher Scientific) e observadas ao microscópio Axioskop 2 (Zeiss) tendo sido captadas imagens representativas com a câmara Nikon DS-L1 com magnificação 400.

### **2.3. Análise estatística**

Para a análise estatística na avaliação da resposta das células ao tratamento com o fármaco foi usado o teste *t* de *Student* no software Excel para comparar a resposta das células com sobre-expressão de LRP1B em relação as células transfectadas com vetor vazio.

A análise estatística relativa à expressão do LRP1B avaliada por imunohistoquímica foi realizada pela Dra. Isabel Sousa (CHSJ) com o software “25.0 SPSS statistical package” usando os testes de  $\chi^2$  e o teste *t* de Student.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas sempre que  $P \leq 0,05$ .



## **3. Resultados e Discussão**

---



Como referido anteriormente, este projeto teve dois objetivos:

- 1) A análise da expressão e localização de LRP1B em carcinoma de ovário usando as metodologias de *Western blot* e imunohistoquímica.
- 2) Aquisição de competências em cultura celular de linhas celulares tumorais humanas e em metodologias de análise da resposta a fármacos usando, como modelo, linhas celulares de carcinoma de ovário com sobre-expressão de LRP1B.

Assim, esta secção de resultados será dividida em duas partes relativas a cada um destes objetivos.

### **3.1. Análise da expressão e localização de LRP1B em carcinoma de ovário usando as metodologias de Western blot e imunohistoquímica**

#### **3.1.1. Análise da expressão do LRP1B em linhas celulares por Western blot**

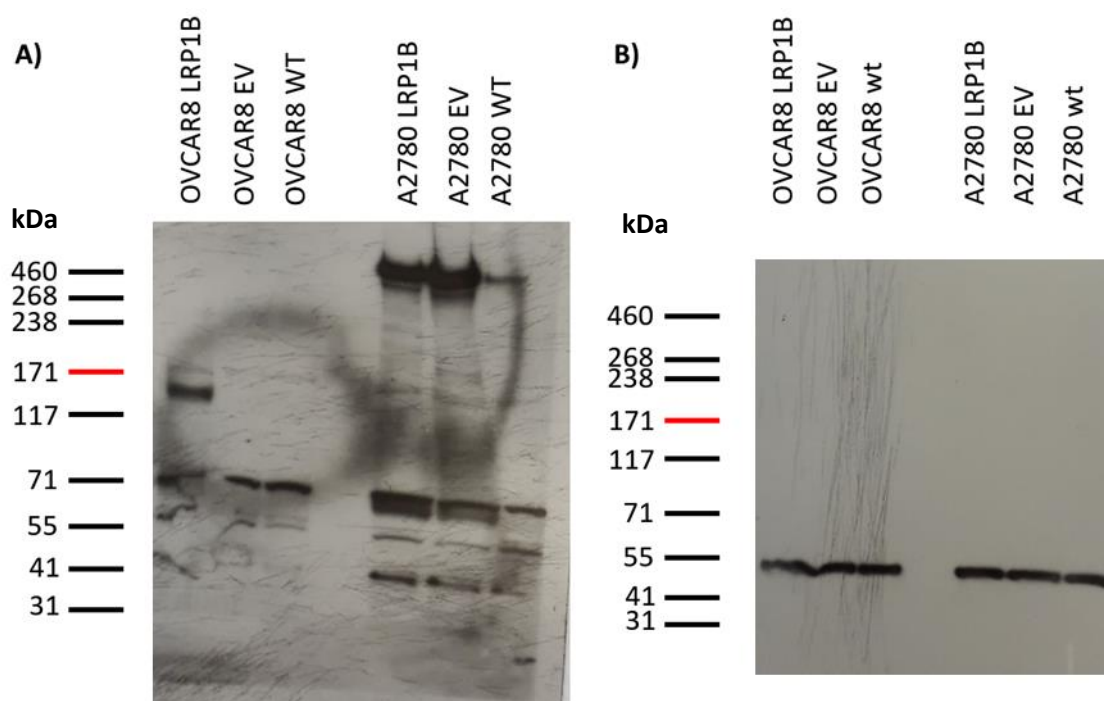
Com o objetivo de analisar a expressão de LRP1B em linhas celulares de carcinoma de ovário, começamos o trabalho utilizando a metodologia de *Western blot*.

Como modelo, foram usadas duas linhas celulares de carcinoma de ovário, designadas *OVCAR8* e *A2780*. A expressão de LRP1B ao nível do mRNA era já conhecida por estudos anteriores do grupo realizados com PCR quantitativo em tempo real, sendo que ao contrário da linha celular *A2780* (que expressava mRNA para o LRP1B) na linha *OVCAR8* o mRNA não era expresso. Para além das linhas celulares parentais (*wild type*), foram usadas as mesmas linhas previamente transfectadas com o vetor mLRP1B (para sobre-expressão de LRP1B) e, como controlo, células transfectadas com o vetor vazio (*empty vector*, EV). As células transfectadas usadas resultaram da seleção clonal, por diluição seriada de células seleccionadas por resistência ao G418 (cujo gene de resistência estava também inserido no vetor). A confirmação da (sobre)expressão de LRP1B nas células utilizadas tinha sido previamente realizada por PCR quantitativo em tempo real por outros elementos do grupo.

A análise da expressão LRP1B nas linhas celulares referidas por *Western blot* foi feita com recurso a dois anticorpos (anti-LRP1B) disponíveis comercialmente. O primeiro anticorpo, da marca Thermo Fisher Scientific (a partir de agora designado por “Anticorpo A”) é um anticorpo que reconhece o mesmo epítopo que um anticorpo descrito no site de referência “*Atlas Antibodies*” (Human Protein Atlas, 2019) como estando aprovado para deteção do LRP1B em tecidos, através da técnica de imunohistoquímica. O segundo anticorpo utilizado pertence à marca Sigma-Aldrich (“Anticorpo B”). Este anticorpo tem indicações do fabricante para ser utilizado em diferentes técnicas (como *Western blot*, imunoprecipitação e imunofluorescência), mas não refere, no entanto, a sua

aplicação em imunohistoquímica. Ambos os anticorpos são policlonais e produzidos em coelho. Embora ambos estejam descritos como tendo os seus epítomos a região C-terminal do LRP1B (Human Protein Atlas, 2019), a sua sequência imunogénica apenas está descrita para o anticorpo “Anticorpo A”.

Com base nos resultados obtidos após revelação com o “Anticorpo A” (Figura 4), verificou-se no geral pouca especificidade deste anticorpo, sendo possível observar várias bandas no gel, independentemente da linha celular e/ou do facto de serem ou não transfectadas.



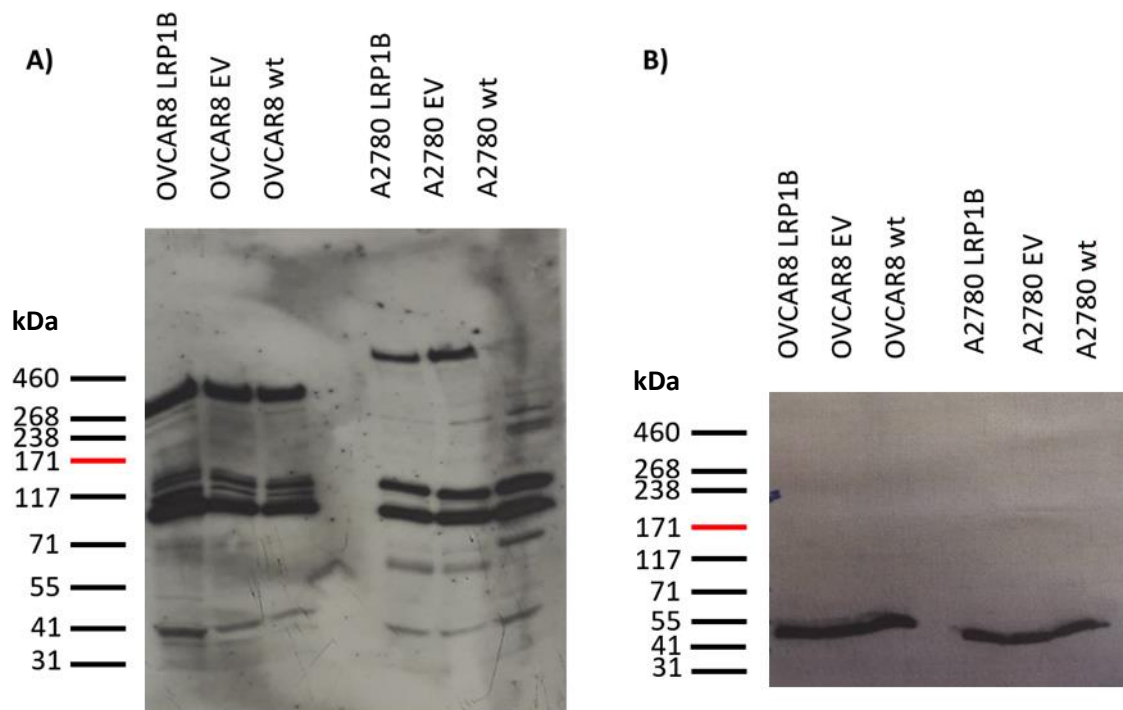
**Figura 4 – Análise da expressão do LRP1B em células de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR8) transfectadas com mLRP1B ou com o vetor vazio (EV). Usando o anticorpo A (A). A análise da tubulina foi usada como controlo de loading (B). À esquerda dos géis estão identificados os padrões de peso molecular.**

Analisando-se o padrão de bandas obtidas para os lisados da linha celular A2780 e foi possível observar a presença de bandas acima dos 460 kDa (o peso molecular maior que se consegue identificar com base no padrão usado). É possível que estas bandas correspondam à subunidade extracelular do LRP1B (de aproximadamente 515 kDa) uma vez que a linha A2780 expressa LRP1B, confirmado por membros do grupo através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (Saraiva, 2018). De facto, esta banda não é visível nos lisados da linha celular OVCAR8, o que era já esperado, pois esta linha não expressa LRP1B. De referir, que a intensidade desta banda (515 kDa) é mais fraca

na linha celular A2780 wt quando comparada com as linhas transfectadas. Tal não seria de esperar pois, as linhas transfectadas não deveriam expressar mais LRP1B (na forma total). Para além disso, pelos níveis de tubulina observados nas diferentes linhas, podemos verificar que a quantidade de proteína analisada é idêntica. A análise do padrão de bandas obtidos para todos os lisados analisados também não nos permite detectar presença da banda correspondente à subunidade menor do LRP1B de 85 kDa (composta pela parte transmembranar e pela cauda citoplasmática) resultante da atividade da furina.

Segundo a literatura, o LRP1B resultante da transfeção com o vetor mLRP1B deveria apresentar o tamanho de bandas 210 kDa e também 120 kDa (resultante da clivagem da furina) (C.-X. Liu *et al.*, 2001). De facto, quando analisado o padrão de expressão na linha OVCAR8 transfectada com mLRP1B é possível observar uma banda acima dos 117 kDa. Como seria de esperar, se correspondesse à banda de 120 Kda descrita, esta banda é apenas detetada nas células OVCAR8 transfectadas com LRP1B. No entanto, e ao contrário do esperado esta banda não é detetada nas células A2780 transfectadas com LRP1B.

Analisando os resultados obtidos com o anticorpo B, é possível observar que este também é pouco específico (figura 5).



**Figura 5 – Análise da expressão do LRP1B em células de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR8) transfectadas com mLRP1B ou com o vetor vazio (EV). Usando o anticorpo B (A). A análise da tubulina foi usada como controlo de *loading* (B). À esquerda dos géis estão identificados os padrões de peso molecular.**

Assim, como foi observado com o Anticorpo A, existe um padrão de bandas acima dos 460 kDa apenas na linha celular A2780. Foi ainda possível observar a presença de bandas acima do marcador de peso molecular de 268 kDa, apenas para a linha celular OVCAR8. No entanto o facto da intensidade da banda ser idêntica nos lisados das células transfectadas (EV e LRP1B) e não transfectadas (wt), e o facto desta linha não expressar LRP1B, reforça a inespecificidade deste anticorpo nas condições testadas.

Assim, os resultados obtidos não nos permitiram determinar com certeza a expressão da proteína LRP1B nas diferentes linhas celulares, na sua forma total ou na forma expressa pelo minireceptor mLRP1B.

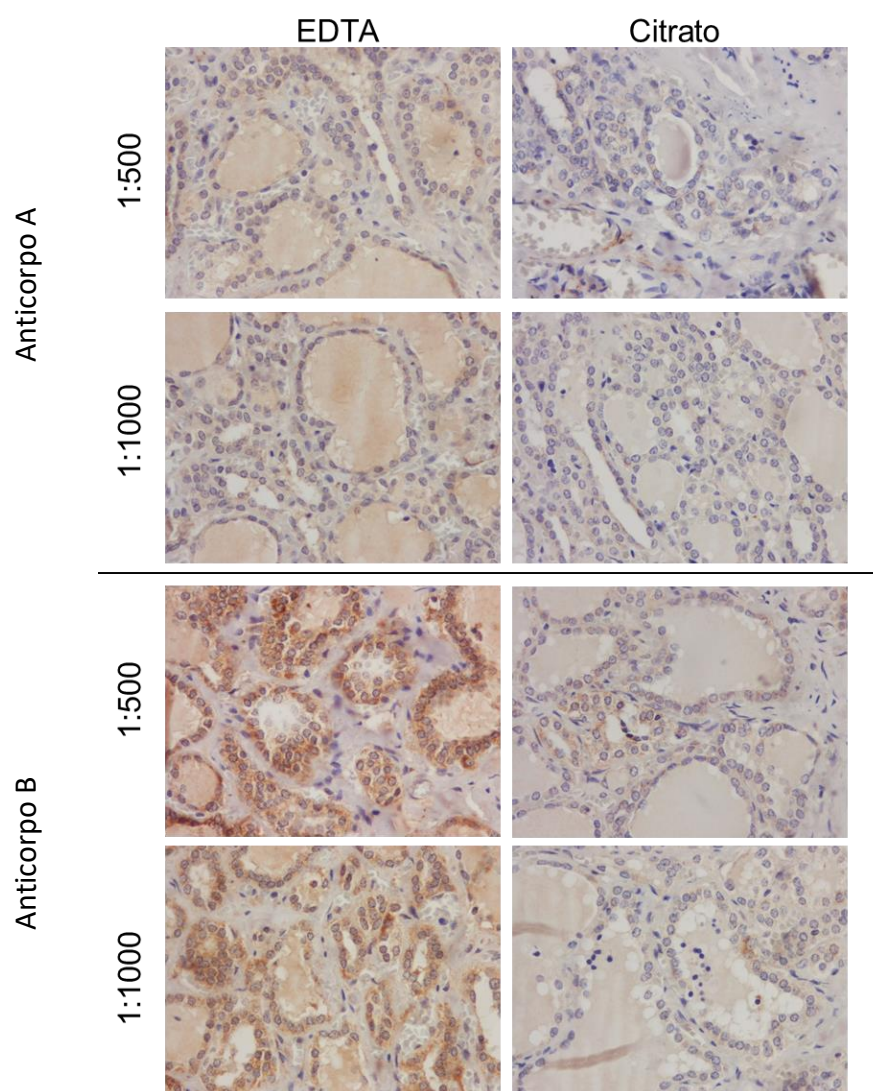
### **3.1.2. Análise da expressão de LRP1B em tecidos humanos pela técnica de imunohistoquímica**

Para além da análise da expressão do LRP1B em linhas celulares, através de *Western blot*, pretendeu-se com este trabalho analisar a expressão e localização desta proteína em tecidos humanos pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). Usando os mesmos anticorpos previamente descritos (“Anticorpo A” e “Anticorpo B”), iniciamos a metodologia de IHQ usando um protocolo base do grupo ao qual foram feitas algumas alterações para otimizar as condições de utilização dos mesmos. Estas alterações incluíram: i) diferentes métodos de recuperação antigénica (usando para isso *steamer*, micro-ondas ou panela de pressão), ii) diferentes tampões de recuperação antigénica (citrato ou EDTA) e iii) diferentes diluições dos anticorpos. Inicialmente usou-se como tecido controlo cortes histológicos de tiroide humana “normal” (adjacente ao tumor), descrita como um tecido que expressa elevados níveis de LRP1B (C.-X. Liu *et al.*, 2001).

**Tabela 2 – Diferentes condições testadas para a otimização dos anticorpos para IHQ.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Recuperação antigénica</b>	<b>Diluições do anticorpo testadas</b>
"Anticorpo A"	<i>Steamer</i> (Citrato)	1:500
		1:750
		1:1000
	Micro-ondas (EDTA)	1:250
	<i>Steamer</i> (EDTA)	
	Panela de Pressão (EDTA)	
	Micro-ondas (EDTA)	1:500
	Panela de Pressão (EDTA)	
	<i>Steamer</i> (EDTA)	1:600
		1:750
1:1000		
"Anticorpo B"	<i>Steamer</i> (Citrato)	1:500
		1:1000
	<i>Steamer</i> (EDTA)	1:500
		1:600
		1:1000

Numa primeira abordagem, procedeu-se ao teste dos dois anticorpos (A e B) diluídos 1:500 a 1:1000, usando apenas o *steamer* para recuperação antigénica com dois tampões diferentes: tampão citrato ou tampão EDTA. Após a realização da técnica de IHQ, as lâminas foram observadas ao microscópio tendo-se observado imunorreactividade nas condições testadas (Figura 6).

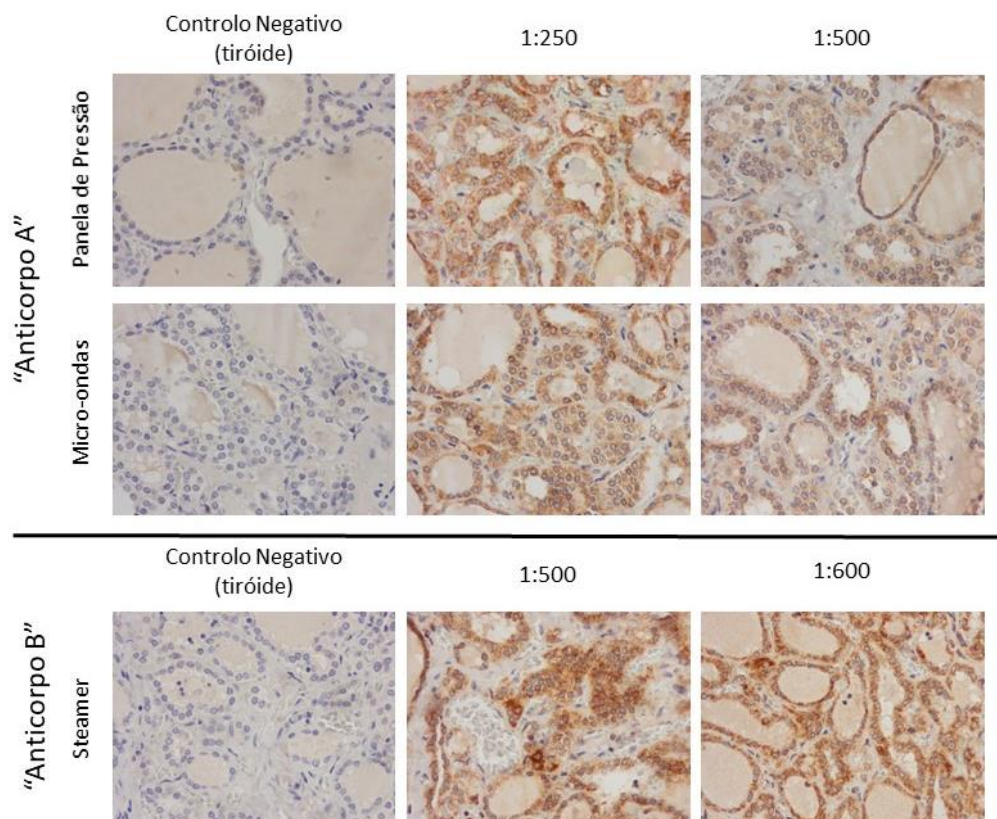


**Figura 6 – Análise da expressão de LRP1B em tecidos de tireoide humana normal por IHQ, utilizando diferentes tampões na recuperação antigénica. Imagens representativas das condições indicadas. Ampliação 400x.**

Comparando os resultados obtidos com as diferentes soluções tampão, detetamos que no geral a marcação era mais intensa quando se usou o tampão EDTA. Relativamente às diluições dos dois anticorpos testados, verificou-se que os anticorpos menos diluídos eram mais específicos e apresentavam menos fundo. No geral, o padrão de marcação dos anticorpos era idêntico, sendo maioritariamente citoplasmático, mas por vezes também membranar.

Com base nestes resultados, prosseguimos os testes de otimização usando diferentes métodos de recuperação antigénica (i.e., usando o *steamer*, micro-ondas e/ou panela de pressão) e diluições menores de anticorpo.

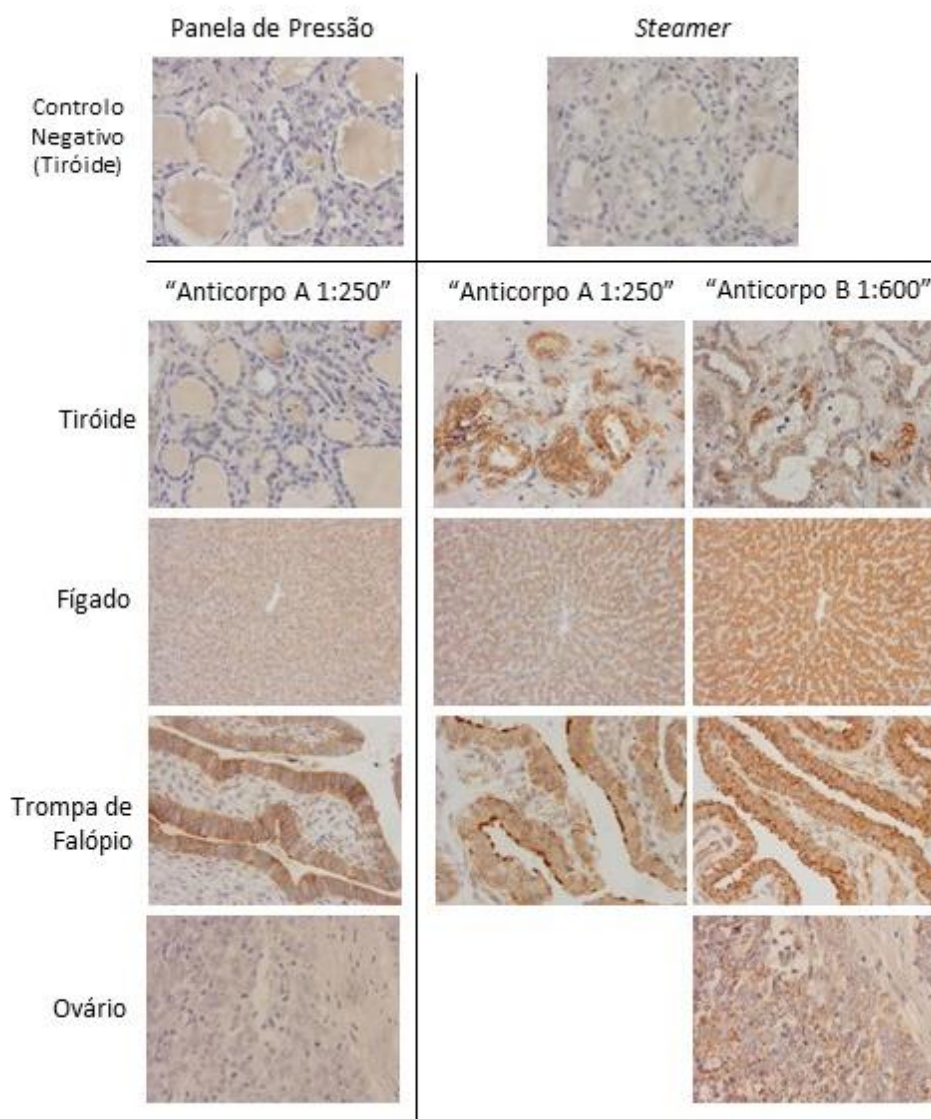




**Figura 7 – Análise de expressão de LRP1B em tecidos de tiroide humana normal, por IHQ, usando diferentes metodologias de recuperação antigénica em tampão EDTA.** A recuperação antigénica foi efetuada com *steamer*, micro-ondas ou panela de pressão. Imagens representativas das condições indicadas. Ampliação 400x.

Através da análise de marcação de todas as condições testadas (Figura 7), consideramos que as melhores condições para a deteção de LRP1B foram as seguintes: i) anticorpo A: diluição 1:250, com recuperação antigénica no *steamer* ou na panela de pressão e ii) anticorpo B, diluição 1:600, com uma recuperação antigénica no *steamer*.

Usando estas condições, procedeu-se à análise da expressão do LRP1B noutros tecidos humanos, nomeadamente: fígado, descrito como expressando elevados níveis de LRP1B (C.-X. Liu *et al.*, 2001), ovário e trompa de Falópio (selecionados devido ao facto da série que pretendemos analisar incluir carcinomas destes tecidos, e assim podermos analisar também a sua expressão normal nestes tecidos) (Figura 8).



**Figura 8 – Análise da expressão do LRP1B em diferentes tecidos humanos.** Imagens representativas das condições indicadas. Os controlos negativos apresentados referem-se a tecidos de tiroide. Ampliação 400x.

Como é possível observar na Figura 8, verificou-se marcação em todos os tecidos (menos nos controlos negativos, como esperado) sendo que, nos tecidos de tiroide e de fígado a marcação era mais intensa em comparação com os tecidos de ovário e de trompa. Esta diferença de marcação, indicativa de maior expressão de LRP1B nestes tecidos confirma o que tinha sido já referido na literatura (C.-X. Liu *et al.*, 2001).

Procedeu-se então à análise da expressão do LRP1B em amostras de pacientes com carcinoma de ovário. As amostras analisadas faziam parte de uma série que nos foi gentilmente cedida pela Dra. Isabel Sousa (CHSJ - Centro Hospitalar São João) que incluía 2 grupos de pacientes, um grupo constituído por 37 pacientes que foram tratadas com a terapia lipossomal (designada por “tratadas

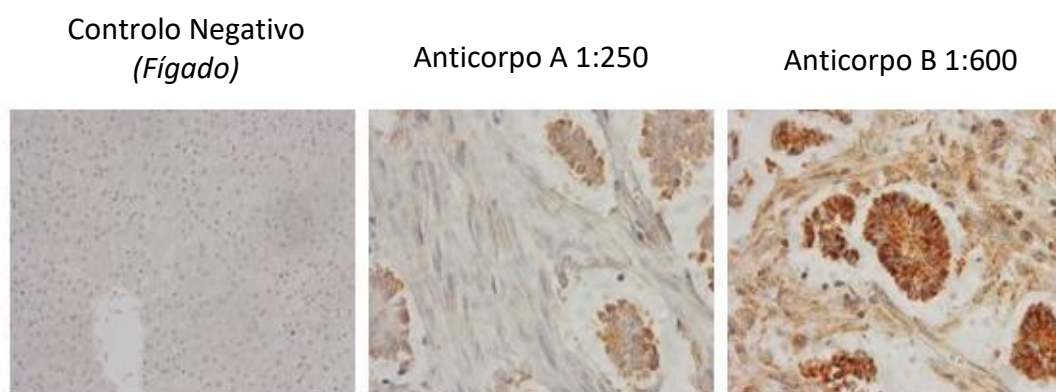
com DL”) e o outro grupo composto por 31 pacientes que foram submetidos a outras terapias (designada por “não tratadas com DL”). Alguns dados clínico-patológicos da série (idade dos pacientes, o estágio do diagnóstico e o subtipo histológico) estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 – Sumário dos dados clínico-patológicos da série de carcinoma de ovário estudada.**

	<i>“Tratadas com DL”</i> (n=37)	<i>“Não tratadas com DL”</i> (n=31)	<i>p-value</i>
Idade média dos pacientes	56,5 (39-73)	58,5 (39-78)	0,057
Estádio do diagnóstico*			
II	5 (13,5%)	9 (29,0%)	0,233
III	28 (75,7%)	20 (64,5%)	
IV	4 (10,8%)	2 (6,5%)	
Subtipo Histológico			
Carcinoma seroso de alto grau	22 (59,5%)	15 (48,4%)	0,801
Carcinoma seroso de baixo grau	8 (21,6%)	10 (32,3%)	
Carcinoma Mucinoso	3 (8,1%)	2 (6,5%)	
<i>Clear Cells</i>	2 (5,4%)	2 (6,5%)	
Endometrioma	2 (5,4%)	2 (6,5%)	

\* Estádio I – Tumor limitado a um ovário. Estádio II – Tumor em ambos os ovários ou com extensão ao útero, trompas ou pélvis. Estádio III – Tumor com implantes além das pélvis e/ou linfonodos inguinais, pélvicos e/ou retroperitoneais positivos. A ocorrência de metástases com extensão ao intestino delgado ou omento. Estádio IV – Tumor com metástases à distância.

Inicialmente, e sendo o material biológico escasso, optamos por analisar os dois anticorpos num número mais restrito de amostras (n=11), para verificar se poderíamos optar apenas por um deles.



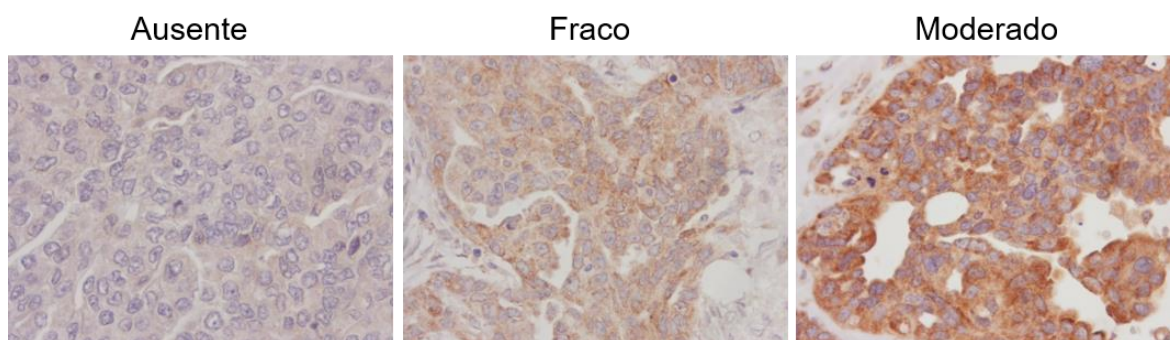
**Figura 9 – Comparação da intensidade de marcação entre o Anticorpo A e o Anticorpo B.**

Verificamos, no entanto, que no geral, o anticorpo A em comparação com o B era mais específico e mostrava menos fundo, pelo que optamos por prosseguir a análise da expressão de LRP1B nas restantes amostras usando apenas este anticorpo.

Estudos de IHQ para o LRP1B foram realizados em 43 amostras (25 “tratadas com DL” e 18 “não tratadas com DL”). Para além da localização da marcação, a expressão IHQ do LRP1B foi avaliada de forma semi-quantitativa tendo em conta os seguintes parâmetros, indicados na Tabela 4: percentagem de células tumorais positivamente para LRP1B e intensidade da marcação (figura 10).

**Tabela 4 – Classificação da expressão de LRP1B de acordo com a percentagem de células tumorais marcadas e intensidade de marcação.**

<i>Percentagem de células tumorais marcadas</i>	Classificação	<i>Intensidade de marcação</i>	Classificação
<5%	0	Ausente	0
5-25%	1	Fraca	1
25-50%	2	Moderada	2
50-75%	3	Forte	3
>75%	4		



**Figura 10 – Diferentes intensidades de expressão de LRP1B observadas nos tecidos de carcinoma de ovário, por IHQ.** As imagens são representativas de casos com diferentes intensidades categorizadas como Ausente, Fraco ou Moderado. Ampliação 400x.

A marcação de LRP1B nas amostras analisadas foi principalmente citoplasmática, sem nenhum padrão nuclear (Tabela 5), sendo que 4 amostras do grupo “não tratadas com DL”, foi observada marcação membranar.

A maioria das amostras apresentou uma percentagem de células positivas para LRP1B superior a 75% (52,0% nas “tratadas com DL” e 44,4% nas “não tratadas com DL”). Relativamente à intensidade de marcação para as “tratadas com DL”, esta foi fraca em 56,0%, moderada em 36,0% e em nenhum das “tratadas com DL” foi forte. Nas “não tratadas com DL”, a intensidade de marcação foi fraca em 61,1%, moderada em 22,2% e também nunca foi considerada forte.

**Tabela 5 – Resultados da análise da expressão de LRP1B na serie de carcinomas de ovário analisados.**

<b>LRP1B</b>	<b>“Tratadas com DL” (n=25)</b>	<b>“Não tratadas com DL” (n=18)</b>	<b>p-value</b>
Percentagem de células tumorais marcadas			
<5%	3 (12,0%)	3 (16,7%)	0,508
5-25%	0 (0,0%)	2 (11,1%)	
25-50%	4 (16,0%)	2 (11,1%)	
50-75%	5 (20,0%)	3 (16,7%)	
>75%	13 (52,0%)	8 (44,4%)	
Intensidade de marcação			
Ausente	2 (8,0%)	3 (16,7%)	0,502
Fraco	14 (56,0%)	11 (61,1%)	
Moderado	9 (36,0%)	4 (22, 2%)	
Forte	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Localização			
Membranar	0 (0,0%)	2 (11,1%)	0,169
Citoplasmática	23 (92,0%)	15 (83,3%)	0,634
M+C**	0 (0,0%)	2 (11,1%)	0,169

\*\* M- Membranar; C- Citoplasmática

A partir da soma dos valores atribuídos à percentagem de células positivas com os valores da intensidade da mesma, foi calculado um “score” de marcação para todas as amostras analisadas. Este “score” foi idêntico nos 2 grupos, como mostrado na tabela 6, sendo que a maioria das amostras apresentou um score  $\geq 3$ . A análise IHQ do LRP1B revelou que o score 0 foi observado em 5,3% dos casos e o score 1 em 2,6% das amostras. Nenhum deles apresentou score 2, enquanto os



scores 3 e 4 foram observados em 10,5% dos casos. Além disso, o score 5 foi encontrado em 15,8% e o score 6 em 21,1% dos casos.

**Tabela 6 – Score de marcação do LRP1B por IHQ em 43 amostras.**

<i>Staining score</i>	<i>“Tratadas com DL” 25 analisadas</i>	<i>“Não tratadas com DL” 18 analisadas</i>	<i>p-value</i>
0	2 (5,3%)	3 (9,4%)	
1	1 (2,6%)	0 (0,0%)	
2	0 (0,0%)	2 (6,3%)	
3	4 (10,5%)	2 (6,3%)	0,434
4	4 (10,5%)	2 (6,3%)	
5	6 (15,8%)	6 (18,8%)	
6	8 (21,1%)	3 (9,4%)	

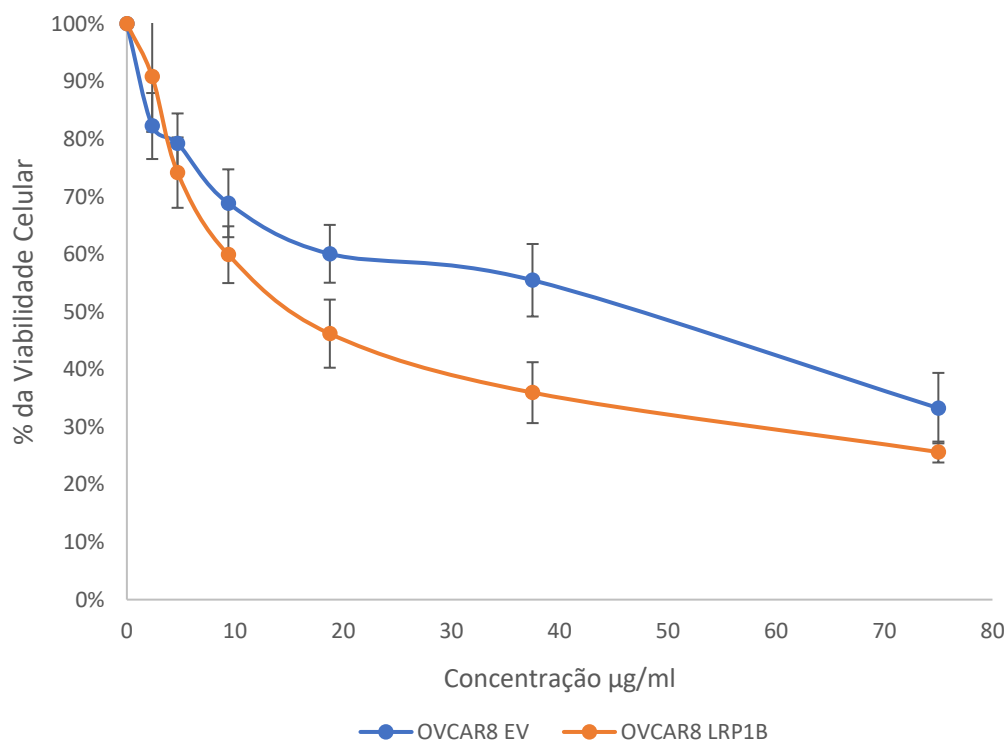
### **3.2. Aquisição de competências em cultura celular de linhas celulares tumorais humanas e análise da resposta a um fármaco**

#### **3.2.1. Determinação da resposta de linhas celulares de ovário à doxorubicina lipossomal**

Como já referido, durante este trabalho foram realizadas experiências com linhas celulares de carcinoma de ovário A2780 e OVCAR8. O trabalho desenvolvido permitiu que se ganhassem competências no âmbito da cultura celular quer no que respeita a sua manutenção em cultura, bem como o seu congelamento ou preparação para experiências.

Foram também realizados estudos de avaliação da resposta das linhas celulares transfectadas relativamente ao tratamento. Assim para a análise da resposta das OVCAR8 (EV e LRP1B) à doxorubicina lipossomal, foi realizado o ensaio de viabilidade com Presto Blue (PB). Este composto, baseado na resazurina, permite avaliar indiretamente a viabilidade celular através da capacidade redutora das células.

Após o tratamento das células com concentrações crescentes de doxorubicina lipossomal durante 48 h, realizou-se o ensaio. Os dados relativos aos valores da fluorescência (resultantes da atividade redutora da célula) após tratamento com o fármaco, foram avaliados em relação ao valor obtido nas células sem tratamento com o fármaco (sendo este 100%) (Figura 11).



**Figura 11 – Análise da viabilidade celular das células OVCAR8 transfetadas com mLRP1B ou vetor vazio (EV), após tratamento com doxorrubicina lipossomal.** As células foram incubadas com o fármaco durante 48 h. A viabilidade é apresentada em relação às células não tratadas (100%). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 experiências independentes.

Em ambas as linhas transfetadas é possível observar uma diminuição da viabilidade celular com concentrações crescentes de fármaco. As células transfetadas com mLRP1B são ligeiramente mais sensíveis para este fármaco do que as células transfetadas com o vetor vazio. No entanto, este efeito não é estatisticamente significativo.





## **4. Conclusões Gerais**

---



O gene *LRP1B* é um dos 10 genes mais deletados em câncros humanos (Prazeres *et al.*, 2011), sendo considerado um potencial gene supressor tumoral (C. X. Liu *et al.*, 2000). Este gene codifica para uma proteína de grande peso molecular, o LRP1B, membro da família dos LDLR, capaz de interagir com vários ligandos (Go & Mani, 2012) e estando envolvido em processos de endocitose. Alterações no LRP1B (mutações / deleções e outras envolvendo mecanismos epigenéticos) foram já associados com cancro, no entanto o seu papel necessita ainda ser clarificado, principalmente no que se refere à sua atividade endocítica (de ligandos ou mesmo de fármacos como os lipossomais).

Embora haja vários estudos que exploram a expressão do LRP1B no cancro, estes focam-se maioritariamente na sua análise molecular ao nível do DNA ou RNA (estes em menor número), sendo escassa a informação no que se refere à expressão do LRP1B ao nível da proteína, em especial a sua expressão e localização subcelular em tecidos.

Assim, o objetivo principal desta tese foi estabelecer a análise da expressão e localização do LRP1B em carcinoma de ovário usando as metodologias de *Western blot* e imunohistoquímica.

Uma das limitações encontradas durante o nosso estudo foi a falta de informação sobre o tipo de anticorpo (muitas vezes não comercial) utilizado por parte dos autores. De modo a ultrapassar este problema, recorreremos a anticorpos desenvolvidos para o LRP1B recentemente comercializados que, no geral, ainda necessitavam de ser validados experimentalmente.

Assim, neste trabalho foram usados dois anticorpos diferentes em ambas as metodologias de análise proteica abordadas: *Western blot* (WB) e imunohistoquímica (IHQ).

Para analisar a expressão de LRP1B em linhas celulares com (sobre)expressão de LRP1B, recorreremos à técnica de WB. As linhas usadas foram escolhidas por terem expressão basal diferente de LRP1B ao nível de RNA, sendo que A2780 expressava mRNA para o LRP1B ao contrário da linha OVCAR8 (em que os níveis de mRNA não tinham sido detetados ou eram muito baixos quando analisados por RT-PCR quantitativo em tempo real (Saraiva, 2018)). Os resultados obtidos indicaram que, nas condições testadas, ambos os anticorpos são apresentam elevada inespecificidade. No entanto, para ambos os anticorpos foi possível observar uma banda superior a 460 kDa, que poderá corresponder à subunidade extracelular do LRP1B (peso molecular de 515 kDa), uma vez que não é observada na linha celular OVCAR8 (C.-X. Liu *et al.*, 2001). Relativamente às linhas com sobre-expressão de LRP1B resultante da transfecção com o vetor mLRP1B, foi possível detetar, apenas na linha celular OVCAR8 e com o anticorpo A, uma banda entre os 117 kDa e os 171 kDa. Estudos publicados com este vetor descrevem a presença de duas bandas: i) uma de 210 kDa (não observada no presente estudo) possivelmente resultante da expressão da subunidade extracelular, não clivada pela furina e, por isso, não funcional) e ii) outra de 120 kDa (possivelmente a observada

no presente trabalho), que deverá corresponder à subunidade extracelular do receptor, já clivada pela furina (C.-X. Liu *et al.*, 2001). De qualquer modo, neste trabalho, com exceção da banda de tamanho superior (a 460 kDa) observada para a linha A2780 com ambos os anticorpos, nenhuma outra banda que pareça específica é detetada por nenhum dos anticorpos testados, não permitindo tirando mais conclusões. É por isso necessário no futuro tentar ultrapassar o problema da inespecificidade destes anticorpos. Para tal, poderão ser realizadas alterações ao protocolo usado que passa pela alteração do tipo de bloqueio, tempo e diluições dos anticorpos, ou mesmo a análise de outros anticorpos. Eventualmente, uma outra metodologia que poderá ser utilizada para verificar a especificidade das bandas detetadas será com recurso a técnicas de proteómica.

Neste trabalho foi realizada uma outra abordagem para análise da expressão ao nível proteico do LRP1B: a sua análise em tecidos humanos (especialmente em carcinoma de ovário) recorrendo à metodologia de IHQ. Utilizando os mesmos anticorpos da metodologia anterior foram realizadas alterações a um protocolo base do grupo variando algumas condições (método/tampão de recuperação antigénica e diluições dos anticorpos usados) e testando a expressão de LRP1B em cortes histológicos de diferentes tecidos humanos (tiroide, fígado, ovário e trompa de Falópio). Foi assim possível determinar as melhores condições para a deteção do LRP1B em tecidos com os dois anticorpos. Sendo que ambos os anticorpos apresentam um padrão de marcação idêntico (maioritariamente citoplasmático, por vezes membranar), optou-se pelo anticorpo A por apresentar menos fundo. Com esta informação, procedeu-se à análise da expressão de LRP1B numa série de amostras de pacientes com cancro de ovário (que incluíam ainda trompa de Falópio ou peritoneal primário). Esta série era composta por dois grupos: 37 pacientes tratados com doxorubicina lipossomal (“tratadas com DL”) e 31 controlos tratados com outras quimioterapias (“não tratadas com DL”) dos quais foram analisados neste trabalho 25 e 18 casos, respetivamente. Os resultados obtidos em ambos os grupos, demonstram que o LRP1B tem uma localização predominantemente citoplasmática nas “tratadas com DL” (92,0%) e nas “não tratadas com DL” (83,3%). De salientar que alguns casos “não tratadas com DL” (11,1%) apresentavam uma localização membranar para o LRP1B que não foi observada para nenhum dos casos “tratadas com DL”. Um estudo recente de Asano *et al.* em cancro da mama, em que usaram anticorpos produzidos em coelho para o domínio intracelular do LRP1B refere, pela primeira vez, um padrão de marcação nuclear do LRP1B em alguns tumores (Asano *et al.*, 2019). A marcação nuclear não foi observada neste estudo, nem tinha sido verificada anteriormente, pelo menos que tenhamos conhecimento. Num outro estudo também recente, a técnica de IHQ foi usada para analisar a expressão de LRP1B em cancro do colo do útero em pacientes infetados com o vírus do papiloma humano (Jiang *et al.*,

2019). Os autores usaram nesse estudo um outro anticorpo comercial descrito no *Atlas Antibody* (Human Protein Atlas, 2019) como aprovado para detecção imunohistoquímica do LRP1B) que possui as mesmas características que o nosso anticorpo A (reconhecendo o mesmo epítipo). Analisando o padrão de marcação apresentado no trabalho de Jiang *et al.*, consideramos que os nossos casos apresentavam uma imunorreatividade mais específica, permitindo assim uma melhor interpretação da expressão e localização do LRP1B. No entanto, não podemos excluir o facto de estarmos a comparar tecidos diferentes.

Relativamente aos resultados obtidos comparando os grupos analisados (“tratadas com DL” e “não tratadas com DL”), não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos. Uma grande parte das amostras (52% nas “tratadas com DL” e 44,4% nas “não tratadas com DL”) apresentou uma percentagem de células positivas para LRP1B superior a 75%. A intensidade da marcação nas “tratadas com DL” foi fraca (61,1%) e moderada (22,2%), não havendo marcação considerada forte em nenhum dos casos.

Os resultados obtidos neste trabalho serão incluídos num estudo em curso que integra a avaliação de várias características clinico-patológicas dos pacientes. Esse estudo pretende analisar expressão de LRP1B nestas pacientes se está associada com a resposta à terapia com doxorubicina lipossomal.

Por último, este trabalho também permitiu adquirir competências em cultura de linhas celulares tumorais humanas e em metodologias de análise da resposta a fármacos. Usando como modelo a linha celular OVCAR8 com sobre-expressão de LRP1B, foi possível verificar um ligeiro aumento (não estatisticamente significativo) na sensibilidade à doxorubicina lipossomal, quando comparada com as células transfectadas com o vetor vazio. No geral, os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Cowin *et al.* em que a mesma estratégia permitiu aumentar a sensibilidade de outras linhas celulares de carcinoma de ovário.

No geral, o trabalho desenvolvido neste projeto permitiu adquirir competências para o estudo não só da resposta de células a fármacos, mas também no que respeita à análise da expressão de proteínas em linhas celulares e em tecidos. Os resultados obtidos relativamente à expressão de LRP1B em pacientes de carcinoma de ovário em tratamento serão importantes para aferir o potencial do LRP1B na resposta destes pacientes à terapia lipossomal.



## 5. Referências

---





- Asano, Y., Takeuchi, T., Okubo, H., Saigo, C., Kito, Y., Iwata, Y., ... Yoshida, K. (2019). Nuclear localization of LDL receptor-related protein 1B in mammary gland carcinogenesis. *Journal of Molecular Medicine*, 97(2), 257–268. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11897>
- Beer, A. G., Zenzmaier, C., Schreinlechner, M., Haas, J., Dietrich, M. F., Herz, J., & Marschang, P. (2016). Expression of a recombinant full-length LRP1B receptor in human non-small cell lung cancer cells confirms the postulated growth-suppressing function of this large LDL receptor family member. *Oncotarget*, 7(42), 68721–68733. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11897>
- Beffert, U., Stolt, P. C., & Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *Journal of Lipid Research*, 45(3), 403–409. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300017-JLR200>
- Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., ... Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), 899–905. <https://doi.org/10.1126/science.3513311>
- Brown, M., & Goldstein, J. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34–47. <https://doi.org/10.1126/science.3513311>
- Bu, G., Li, Y., & Cam, J. (2001). Low-Density Lipoprotein Receptor Family: endocytosis and signal transduction. *Molecular Neurobiology*, 23(1), 53–68. <https://doi.org/10.1385/MN:23:1:53>
- Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Knisely, J. M., Hecimovic, S., Li, Y., & Bu, G. (2004). The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1B Retains  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein at the Cell Surface and Reduces Amyloid- $\beta$  Peptide Production. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29639–29646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313893200>
- Chung, N. S., & Wasan, K. M. (2004). Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1315–1334. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.003>
- Cowin, P. A., George, J., Fereday, S., Loehrer, E., Van Loo, P., Cullinane, C., ... Bowtell, D. D. L. (2012). LRP1B Deletion in High-Grade Serous Ovarian Cancers Is Associated with Acquired Chemotherapy Resistance to Liposomal Doxorubicin. *Cancer Research*, 72(16), 4060–4073. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0203>
- Dietrich, M. F., van der Weyden, L., Prosser, H. M., Bradley, A., Herz, J., & Adams, D. J. (2010). Ectodomains of the LDL Receptor-Related Proteins LRP1b and LRP4 Have Anchorage Independent Functions In Vivo. *PLoS ONE*, 5(4), e9960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009960>
- Go, G.-W., & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(1), 19–28. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.569573>
- Haas, J., Beer, A. G., Widschwendter, P., Oberdanner, J., Salzmann, K., Sarg, B., ... Marschang, P. (2011). LRP1b shows restricted expression in human tissues and binds to several extracellular ligands, including fibrinogen and apoE – carrying lipoproteins. *Atherosclerosis*, 216(2), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.030>
- Herz, J., Chen, Y., Masiulis, I., & Zhou, L. (2009). Expanding functions of lipoprotein receptors. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S287–S292. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800077-JLR200>
- Herz, J., & Strickland, D. K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 779–784. <https://doi.org/10.1172/JCI13992>

- Hirai, Y., Utsugi, K., Takeshima, N., Kawamata, Y., Furuta, R., Kitagawa, T., ... Noda, S. T. (2004). Putative gene loci associated with carcinogenesis and metastasis of endocervical adenocarcinomas of uterus determined by conventional and array-based CGH. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(4), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.04.015>
- HUGO Gene Nomenclature Committee. (2019). Low density lipoprotein receptors (LRP). Retrieved May 20, 2019, from <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/634>
- Human Protein Atlas. (2019). LRP1B - Antibodies. Retrieved March 10, 2019, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168702-LRP1B/antibody>
- Jiang, Y., Zhu, C., He, D., Gao, Q., Tian, X., Ma, X., ... Hu, Z. (2019). Cytological Immunostaining of HMGA2, LRP1B, and TP63 as Potential Biomarkers for Triaging Human Papillomavirus-Positive Women. *Translational Oncology*, 12(7), 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.012>
- Knisely, J. M., Li, Y., Griffith, J. M., Geuze, H. J., Schwartz, A. L., & Bu, G. (2007). Slow endocytosis of the LDL receptor-related protein 1B: Implications for a novel cytoplasmic tail conformation. *Experimental Cell Research*, 313(15), 3298–3307. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.05.026>
- Li, B., Liu, C., Cheng, G., Peng, M., Qin, X., Liu, Y., ... Qin, D. (2019). LRP1B polymorphisms are associated with multiple myeloma risk in a Chinese Han population. *Journal of Cancer*, 10(3), 577–582. <https://doi.org/10.7150/jca.28905>
- Li, Y., Knisely, J. M., Lu, W., McCormick, L. M., Wang, J., Henkin, J., ... Bu, G. (2002). Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1B Impairs Urokinase Receptor Regeneration on the Cell Surface and Inhibits Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42366–42371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207705200>
- Li, Y., Lu, W., & Bu, G. (2005). Striking differences of LDL receptor-related protein 1B expression in mouse and human. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3), 868–873. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.170>
- Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E., & Strickland, D. K. (2008). LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *Physiological Reviews*, 88(3), 887–918. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2007>
- Liu, C.-X., Li, Y., Obermoeller-McCormick, L. M., Schwartz, A. L., & Bu, G. (2001). The Putative Tumor Suppressor LRP1B, a Novel Member of the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Family, Exhibits Both Overlapping and Distinct Properties with the LDL Receptor-related Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 28889–28896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102727200>
- Liu, C.-X., Ranganathan, S., Robinson, S., & Strickland, D. K. (2007).  $\gamma$ -Secretase-mediated Release of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1B Intracellular Domain Suppresses Anchorage-independent Growth of Neuroglioma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7504–7511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608088200>
- Liu, C. X., Musco, S., Lisitsina, N. M., Forgacs, E., Minna, J. D., & Lisitsyn, N. A. (2000). LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 60(7), 1961–1967. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766186>
- Liu, L., Ren, M., Han, S., Sun, L., & Zhu, L. (2018). Expression level and clinical significance of low-density lipoprotein receptor-related protein 1B gene in cervical squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(3), 1701–1706.

- Marschang, P., Brich, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Shelton, J. M., Richardson, J. a, ... Herz, J. (2004). Normal Development and Fertility of Knockout Mice Lacking the Tumor Suppressor Gene LRP1b Suggest Functional Compensation by LRP1. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3782–3793. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.9.3782-3793.2004>
- May, P., Woldt, E., Matz, R. L., & Boucher, P. (2007). The LDL receptor-related protein (LRP) family: An old family of proteins with new physiological functions. *Annals of Medicine*, 39(3), 219–228. <https://doi.org/10.1080/07853890701214881>
- Nakagawa, T., Pimkhaokham, A., Suzuki, E., Omura, K., Inazawa, J., & Imoto, I. (2006). Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 97(10), 1070–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00283.x>
- Ni, S., Hu, J., Duan, Y., Shi, S., Li, R., Wu, H., ... Li, Y. (2013). Down expression of LRP1B promotes cell migration via RhoA/Cdc42 pathway and actin cytoskeleton remodeling in renal cell cancer. *Cancer Science*, 104(7), 817–825. <https://doi.org/10.1111/cas.12157>
- Pohlkamp, T., Wasser, C. R., & Herz, J. (2017). Functional Roles of the Interaction of APP and Lipoprotein Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(March), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00054>
- Prazeres, H., Torres, J., Rodrigues, F., Pinto, M., Pastoriza, M. C., Gomes, D., ... Soares, P. (2011). Chromosomal, epigenetic and microRNA-mediated inactivation of LRP1B, a modulator of the extracellular environment of thyroid cancer cells. *Oncogene*, 30(11), 1302–1317. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.512>
- Ross, J. S., Wang, K., Rand, J. V., Gay, L., Presta, M. J., Sheehan, C. E., ... Stephens, P. J. (2014). Next-generation sequencing of adrenocortical carcinoma reveals new routes to targeted therapies. *Journal of Clinical Pathology*, 67(11), 968–973. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202514>
- Saraiva, I. (2018). *Evaluation of the role of LRP1B in the response of human ovarian cancer cells to liposomal doxorubicin* (Universidade NOVA de Lisboa). Retrieved from <https://run.unl.pt/handle/10362/56826>
- Shiroshima, T., Oka, C., & Kawaichi, M. (2009). Identification of LRP1B-interacting proteins and inhibition of protein kinase C $\alpha$ -phosphorylation of LRP1B by association with PICK1. *FEBS Letters*, 583(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.045>
- Shiseki, M., Kohno, T., Nishikawa, R., Sameshima, Y., Mizoguchi, H., & Yokota, J. (1994). Frequent allelic losses on chromosomes 2q, 18q, and 22q in advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 54(21), 5643–5648. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923210>
- Song, H., Li, Y., Lee, J., Schwartz, A. L., & Bu, G. (2009). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Research*, 69(3), 879–886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3379>
- Sonoda, I., Imoto, I., Inoue, J., Shibata, T., Shimada, Y., Chin, K., ... Inazawa, J. (2004). Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1B (LRP1B) Expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 64(11), 3741–3747. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0172>
- Sousa, I., Rodrigues, F., Prazeres, H., Lima, R. T., & Soares, P. (2018). Liposomal therapies in oncology: does one size fit all? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 82(5), 741–755. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3668-7>

- Takeda, H., Rust, A. G., Ward, J. M., Yew, C. C. K., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (2016). Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies genes that cooperate with mutant Smad4 in gastric cancer development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(14), E2057–E2065. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603223113>
- Tanaga, K., Bujo, H., Zhu, Y., Kanaki, T., Hirayama, S., Takahashi, K., ... Saito, Y. (2004). LRP1B Attenuates the Migration of Smooth Muscle Cells by Reducing Membrane Localization of Urokinase and PDGF Receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(8), 1422–1428. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133607.80554.09>
- Tang, L., & Han, X. (2013). The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *67*(2), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2012.10.003>
- Wang, H. (2017). Endocytosis and membrane receptor internalization implication of F-BAR protein Carom. *Frontiers in Bioscience*, *22*(9), 4552. <https://doi.org/10.2741/4552>
- Wang, Z., Sun, P., Gao, C., Chen, J., Li, J., Chen, Z., ... Xie, J. (2017). Down-regulation of LRP1B in colon cancer promoted the growth and migration of cancer cells. *Experimental Cell Research*, *357*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.010>
- Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K., & Thornton, S. J. (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(1), 84–99. <https://doi.org/10.1038/nrd2353>
- Zheng, H., & Bai, L. (2019). Hypoxia induced microRNA-301b-3p overexpression promotes proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by targeting LRP1B. *Experimental and Molecular Pathology*, *111*, 104301. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.104301>

## **6. Anexo I**

---



# i3S ANNUAL MEETING

## 28-29 November 2019

### **LRP1B expression in ovarian cancer tissues: An immunohistochemical approach**

Ana Isabel Cunha<sup>1,2,3</sup>, Isabel Sousa<sup>4,5</sup>, Raquel Portugal<sup>4,6</sup>, Etel R.P. Gimba<sup>7,8</sup>, Hugo Prazeres<sup>1,2</sup>, Paula Soares<sup>1,2,4,6</sup>, Raquel T. Lima<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Portugal; <sup>2</sup> Cancer Signaling and Metabolism Group, IPATIMUP - Institute of Molecular Pathology and Immunology, University of Porto, Portugal; <sup>3</sup> Department of Biology, University of Aveiro, Portugal; <sup>4</sup> Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal; <sup>5</sup> Department of Oncology, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal; <sup>6</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal; <sup>7</sup> Research Coordination, National Institute of Cancer, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>8</sup> Natural Science Department, Health and Humanities Institute, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil.

LRP1B (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1B) is one of 10 most significantly deleted genes in human cancers [1]. It binds multiple ligands and mediates endocytosis [2]. Although its role in cancer has not been fully disclosed, its endocytic activity has been hypothesized to have clinical impact (affecting drug internalization) and may contribute to resistance to liposomal therapies, namely in ovarian cancer [3,4]. Mostly, the studies on LRP1B dysfunction are based on DNA/RNA analysis, lacking information of LRP1B at protein levels and subcellular localization in tissues.

This study aimed at optimizing an immunohistochemical (IHC) approach that allowed evaluating LRP1B in histologically confirmed tissues from ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer patients treated with chemotherapy.

Different IHC conditions were tested to assess immunoreactivity of two commercially available anti-LRP1B antibodies in human tissues (thyroid, liver, ovary and fallopian tube). In addition, LRP1B expression was evaluated in a series of samples from patients with ovarian cancers. This series comprised two groups: 37 cases patients treated with liposomal doxorubicin (LD) and 31 controls (treated with chemotherapy other than LD). A semi-quantitative evaluation was carried out regarding LRP1B staining intensity (absent, faint, moderate and strong) and the percentage of positively stained cells (<5%; 5-25%; 25-50%, 50-75% and >75%).

# i3S ANNUAL MEETING

## 28-29 November 2019

Results showed similar immunoreactivity for both antibodies, with LRP1B staining being mainly cytoplasmic (and membranous, in few cases). The antibody presenting higher specificity was chosen to proceed analysis within the series of ovarian cancer tissues. LRP1B expression showed no significant differences between cases and controls concerning the proportion of positive stained cells or staining intensity.

This study allowed assessing the expression of LRP1B in a series of ovarian tumor tissues treated with chemotherapy including LD. These results are now being evaluated taken into account the clinic-pathological features and follow-up analysis in order to evaluate whether LRP1B expression is associated with response to LD or with survival outcomes (progression free survival or overall survival).

- [1] Beroukhi R et al. (2010) *Nature*. 463:899-905
- [2] Chung N. S., Wasan K. M. (2004) *Adv Drug Deliv Rev*. 56:1315-34.
- [3] Cowin P. A. et al. (2012). *Cancer Res*. 72(16):4060-73.
- [4] Sousa I. et al. *Cancer Chemother Pharmacol*. (2018) 82(5):741-55

### Acknowledgments

FEDER—COMPETE 2020-POCI, Portugal 2020, FCT/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação in the framework of the projects POCI-01-0145-FEDER-007274 and POCI 01-0145-FEDER-031520 (PTDC/MEC-ONC/31520/2017); Project NORTE-01-0145- FEDER-000029; “Projetos Estruturados de I&D&I”- Norte 2020—Programa Operacional Regional do Norte.