

Tesis de Posgrado

PECAM-1/CD31 en células tumorales : Un nuevo blanco para la terapia antitumoral?

Lutzky, Viviana Paula

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lutzky, Viviana Paula. (2002). PECAM-1/CD31 en células tumorales : Un nuevo blanco para la terapia antitumoral?. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3492_Lutzky.pdf

Cita tipo Chicago:

Lutzky, Viviana Paula. "PECAM-1/CD31 en células tumorales : Un nuevo blanco para la terapia antitumoral?". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3492_Lutzky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TESIS
CS. BIOLÓGICAS
3492
Lutzky
Viviana Paula

Biblioteca FCEyN • UBA

03492

CELULAS TUMORALES: ¿UN NUEVO BLANCO PARA LA TERAPIA ANTITUMORAL?

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BS. AS.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Autor

Lic. Viviana Paula Lutzky

Director

Dr. Eduardo Chuluyan

■ *a Rauli*

- A Rauli por acompañarme y apoyarme en todo momento, por estar siempre presente y listo para ayudarme, especialmente por su compañía durante la confección de mi tesis. En definitiva por todos estos años de amor.
- A mis padres y hermana, por apoyarme y alentarme durante toda la carrera, por permitirme crecer en un ambiente familiar, rodeada de amor y cariño. A Andre por los lindos momentos compartidos, por su alegría y a mis padres por preocuparse en todo momento por mi futuro y por brindarme la mejor educación.
- A Vani por todos los años de amistad compartidos, por estar en las buenas y en las no tan buenas, por ser mi mejor amiga.
- A mis amigos de la Facultad, por todos estos años de amistad, a Pau y Mechi por todas las horas que compartimos de estudio, a Javi, Lau, Ogui, Dani, Luz, Pao, Diego y Cami por los momentos de estudio, mate y diversión. Por continuar con nuestra amistad, aún fuera de la carrera.
- A la familia de Raul por su cariño y comprensión. En especial a Leo por su invaluable ayuda y por sus consejos para la confección de mi tesis.
- A mis amigas de laboratorio, Adriana, Andrea, Carolina, Evangelina, Florencia, Graciela y Sandra por compartir tantos lindos momentos fuera y dentro del laboratorio, por hacer mas fácil y divertido el trabajo diario.
- A mis compañeros de laboratorio por estar siempre dispuestos a prestarme su ayuda y por las divertidas charlas en el comedor. En especial a mis compañeros de grupo, Mariano, Paulo, Fernanda y Ana por su ayuda y compañía.
- Al Dr Eduardo Chuluyan por sus consejos y sugerencias para la elaboración de la tesis, por contribuir con mi formación científica, por enseñarme con paciencia y dedicación y estar a mi lado orientándome en las tareas de laboratorio.
- Al Dr Leonardo Fainboim por brindarme la posibilidad de trabajar en el laboratorio de Inmunogenética y poner a mi disposición los materiales presentes en el mismo. Al Dr Osvaldo Podhajcer por brindarme su apoyo y facilitarme las líneas celulares utilizadas en este trabajo.
- Al Dr. Miguel Brunstein por ayudarme a dar los primeros pasos en el campo de la investigación científica.
- Agradezco sinceramente a cada una de las personas que me acompañan brindándome su afecto.

INDICE



I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	
Progresión tumoral	3
Moléculas de adhesión	6
Integrinas	6
Cadherinas	11
Selectinas	12
Sialomucinas	13
Superfamilia de inmunoglobulinas	13
Molécula de adhesión celular endotelial y plaquetaria (PECAM-1/CD31)	16
Estructura del gen y la proteína	16
Distribución y expresión de PECAM-1	17
Regulación de la expresión de PECAM-1/CD31	18
Estudios bioquímicos, biológicos y ligandos	18
Señales intracelulares mediadas por PECAM-1/CD31	20
Dominios ITIM e ITAM en PECAM-1/CD31	21
Roles fisiológicos de PECAM-1/CD31	24
Tráfico intracelular de moléculas	25
IV. Objetivos	28
V. Materiales y métodos	
Cultivos celulares	29
Líneas celulares	29
Cultivo de células tumorales	29
Células endoteliales (HUVEC)	29
Purificación de monocitos y neutrófilos humanos de donantes normales	30
Generación de células dendríticas (DC)	30
Determinación de las moléculas por inmunomarcación	31

Inmunofluorescencia simple indirecta	31
Inmunofluorescencia intracitoplasmática	31
Inmunofluorescencia doble	32
Ensayos de internalización	32
Microscopía Confocal	33
<i>Cell Sorting</i>	33
Estudio del mecanismo de adhesión	33
Adhesión a proteínas de matriz extracelular	33
Ensayos de adhesión a células endoteliales de vena de cordón umbilical humano	34
Bloqueo de la adhesión	34
Generación de transfectantes	35
Oligonucleótidos	35
<i>Western blot</i>	35
Ensayo de co-ligación	36
Ensayo de apoptosis	36
Análisis de resultados	36
Análisis estadístico	37
Anticuerpos monoclonales	37
VI. Resultados	
Expresión de PECAM-1/CD31	39
Modulación de la expresión	46
Expresión de CD31 citoplasmático	49
Interacción de las células tumorales con proteínas de matriz extracelular	59
Señales intracelulares mediadas por moléculas de adhesión	64
VII. Discusión	68
VIII. Conclusiones	80
IX. Referencias bibliográficas	81
X. Abreviaturas	95

RESUMEN



Las moléculas de adhesión han sido implicadas en la metástasis y la progresión tumoral. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión y el rol de las moléculas de adhesión, en particular PECAM-1/CD31 en las células tumorales humanas. PECAM-1/CD31 es una glicoproteína de 130kDa perteneciente a la superfamilia de Inmunoglobulinas. Se encuentra presente en células endoteliales, plaquetas y en la mayoría de los leucocitos. Sin embargo, en este trabajo se demostró, por inmunofluorescencia y *Western blot*, la presencia de la molécula en líneas de células de melanoma y de adenocarcinoma. La expresión cuantitativa y cualitativa de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales es diferente a la de los leucocitos y células endoteliales, ya que en las células tumorales la expresión es menor, y además, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los dominios-2 y -6 no reaccionan con la molécula. La expresión de PECAM-1/CD31 sobre la superficie de las células tumorales fue modulada por interacciones célula-célula, siendo mayor en las células provenientes de cultivos sub-confluentes y en las células desprendidas espontáneamente de monocapas de células tumorales confluentes. La fijación y la permeabilización de las células tumorales reveló la presencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31. Por otro lado, la expresión de PECAM-1/CD31 aumentó y disminuyó en presencia de citocalasina B y brefeldina A, respectivamente.

Las células de melanoma se adhirieron a células endoteliales y a proteínas de matriz extracelular. En el primer caso, la adhesión fue parcialmente mediada por PECAM-1/CD31, ya que la transfección de las células de melanoma con un oligonucleótido antisentido para PECAM-1/CD31, disminuyó la expresión de esta molécula y su adhesión. Lo mismo sucedió al tratar las células tumorales con anticuerpos dirigidos contra los dominios-1, -3 y -4/-5. En cambio la adhesión a las distintas proteínas de matriz extracelular fue mediada por las integrinas α_1 (para colágeno IV); α_3 (para matrigel, laminina, colágeno IV y colágeno I); α_4 y α_5 (para fibronectina); α_6 (para matrigel) y β_1 (para matrigel, colágeno IV, colágeno I y fibronectina). Finalmente, la coligación de PECAM-1/CD31 con anticuerpos dirigidos contra el dominio 3 en las células de melanoma y adenocarcinoma, tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que existe un reservorio intracelular de PECAM-1/CD31 en células tumorales que probablemente module la expresión de CD31 en la superficie celular. Además sugieren un rol de esta molécula en el crecimiento tumoral y en la metástasis.

ABSTRACT



Tumor progression and metastasis have been related to the adhesion molecules expression. The aim of the present study was to examine the expression and the role of adhesion molecules on tumor cells, in particular PECAM-1/CD31.

PECAM-1/CD31 is a 130-kDa member of the Immunoglobulin gene superfamily that is highly expressed on endothelial cells, platelets and most leukocytes. However, herein it is demonstrated by Western Blot and immunofluorescence that some melanoma cells and adenocarcinoma cells express PECAM-1/CD31 on the cell surface. The expression of PECAM-1/CD31 on tumor cells seems to be different from normal cells, since the expression was low compared to endothelial cells and leukocytes, and based on the absence of reactivity of monoclonal antibodies directed to domains 2 and 6. Furthermore, the tumor cells surface expression of PECAM-1/CD31 can be regulated by cell-cell contact, being higher on sparse and spontaneously detached cells. Fixing and permeabilizing tumor cells revealed a cytoplasmic pool of the molecule. Indeed, cell surface CD31 was internalized following mAb binding and the expression was enhanced and decreased by cytochalasin B and brefeldin A, respectively.

Melanoma cells were able to adhere to endothelial cells and to extracellular matrix proteins, using different adhesion molecules. The interaction of melanoma cells with endothelial cells was partially mediated by PECAM-1, since decreasing the expression of CD31 on tumor cells by CD31-specific antisense oligonucleotide or by treatment with mAbs to domains -1, -3, -4/-5 decreased the adhesion to endothelium.

Melanoma cells adhesion to ECM proteins was mediated by α_1 (for collagen type IV); α_3 (for matrigel, laminin, collagen type IV and collagen type I); α_4 and α_5 (for fibronectin); α_6 (for matrigel) and β_1 (for matrigel, collagen type IV, collagen type I and fibronectin). Furthermore, ligation of CD31 via domain -3 but not β_1 integrin inhibited proliferation of melanoma and adenocarcinoma cells. Overall, these results indicate that there is an intracellular pool of CD31 on tumor cells which might modulate CD31 surface expression and its role in cancer cell growth and metastasis.

INTRODUCCION



PROGRESION TUMORAL

El movimiento de células o grupos de células es un proceso que se observa tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas; por ejemplo en la embriogénesis, la inflamación, la cicatrización, la respuesta inmune y en la formación de metástasis[1]. En todos estos casos existen interacciones adhesivas entre las distintas poblaciones celulares. En el caso de las metástasis, la célula tumoral abandona un foco tumoral primario penetrando al torrente sanguíneo a través del sistema linfático y anida en un sitio distante al tumor primario. En general se considera que el sitio de metástasis depende del drenaje linfático del órgano y de la presencia de un microambiente favorable, dado por las hormonas y los factores de crecimiento[2] (figura 1).

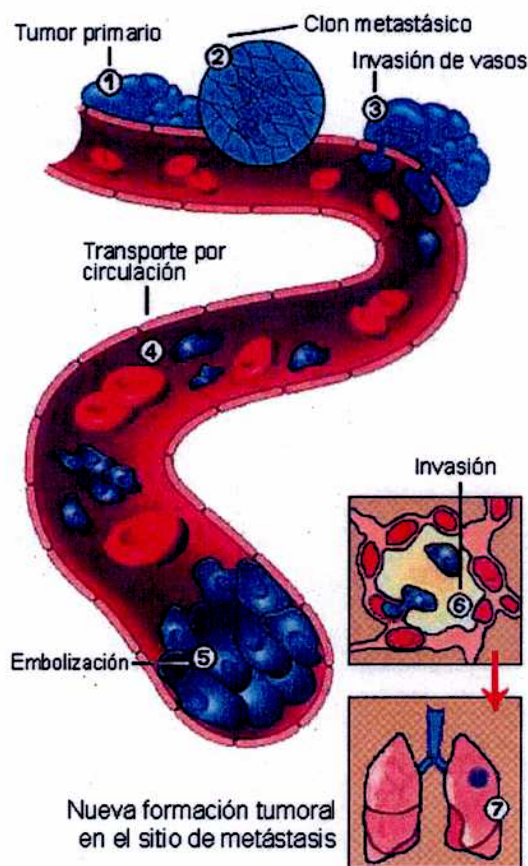


Figura 1: Estadios de la progresión tumoral

(1) Las células que componen el tumor primario comienzan a proliferar de manera descontrolada, originando un clon metastásico (2) que continua su crecimiento y comienza a invadir los vasos (3). Las células tumorales son transportadas por la circulación (4), donde se acumulan originando una embolización (5). Finalmente invaden otros tejidos (6) y forman una nueva masa tumoral en el sitio de la metástasis (7).

El tumor maligno de la piel de origen melanocítico, denominado melanoma, se caracterizan por su gran capacidad invasiva. Comienza con la malignización de las células productoras de melanina, los melanocitos. La proliferación descontrolada de melanocitos transformados, forma una gruesa masa tumoral que invade el tejido sano. Una vez que entra en contacto con la dermis, llega a los vasos sanguíneos y linfáticos, favoreciendo el comienzo de la formación de las metástasis[3].

Todas las células, incluidas las tumorales, presentan una matriz extracelular. La composición de esta matriz extracelular varía dependiendo del tipo celular. En el caso de las células tumorales, la matriz extracelular es más desorganizada que la matriz de las células normales. Una forma especializada de la matriz es la membrana basal, cuyos componentes son las proteínas colágeno (Col) de tipo IV, laminina (LM) y heparan sulfato. En general, la matriz extracelular sirve no sólo como barrera mecánica para la invasión tumoral, sino también para regular la adhesión y la migración celular, la morfogénesis y en el control de la proliferación y la diferenciación celular[2, 4].

La disrupción de la membrana basal es una característica patognomónica del frente invasivo de un tumor, la cual involucra diferentes pasos: i) la adhesión de las células tumorales a los componentes de la membrana basal, por medio de receptores específicos; ii) la activación de enzimas que dañan la membrana basal; iii) la emisión de pseudópodos hacia la zona de lisis; y iv) la migración tumoral. Estos pasos están coordinados; mientras que el frente de avance del tumor activa las enzimas líticas, la porción distal del tumor se adhiere firmemente a la matriz. Luego, las enzimas se inactivan inhibiéndose la adhesión, dando paso a la migración celular[2]. Es importante señalar que este proceso de migración difiere de la migración transendotelial de leucocitos, en dos aspectos: i) la presencia de daño endotelial, y ii) la mayor duración del proceso migratorio[5]. De todos estos pasos, el primero de ellos es esencial en el proceso de invasión tumoral. Esto se pone en evidencia al inhibir la invasión tumoral utilizando péptidos bloqueantes derivados de fibronectina (FN) y LM[6, 7] y en la mayor expresión de receptores para LM presentes sobre células altamente metastásicas comparados con las células derivadas de tumores benignos[8].

Las interacciones entre las células tumorales con las plaquetas, las células endoteliales y la matriz subendotelial son consideradas pasos intermedios,

esenciales para completar la “cascada metastásica”. Las células tumorales emplean receptores de superficie para cumplir con estas interacciones célula–célula y célula–matriz extracelular. La especificidad del sitio de metástasis tumoral, sugiere que distintas células tumorales utilizan diferentes repertorios de receptores de adhesión[9]. Estos receptores de adhesión, son glicoproteínas denominadas moléculas de adhesión y han sido clasificados en cinco familias: integrinas, superfamilia de inmunoglobulinas, cadherinas, selectinas y sialomucinas[10] (figura 2).

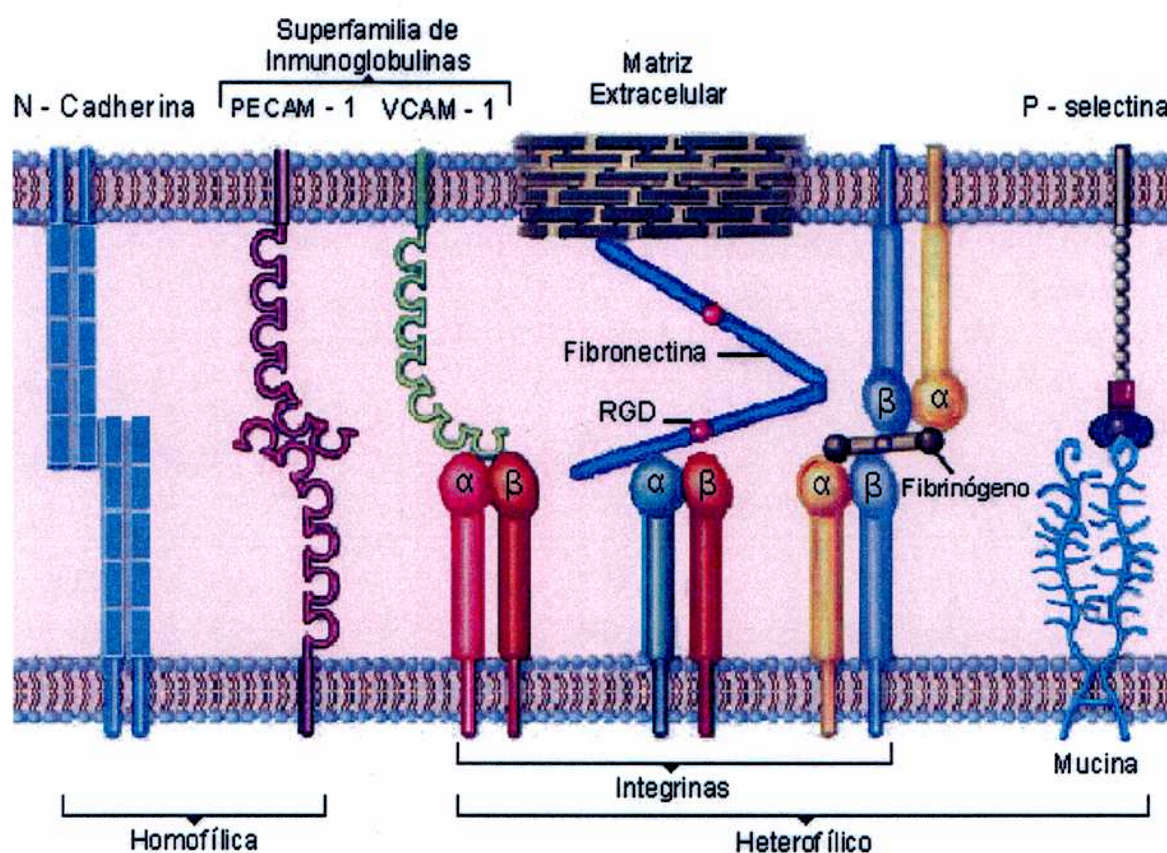


Figura 2: Familias de moléculas de adhesión

Las cadherinas interaccionan de manera homofílica, mientras que los miembros de la Superfamilia de Inmunoglobulinas interaccionan de forma homofílica o heterofílica, con los miembros de la familia de las integrinas. Estas últimas poseen además sitios de unión para componentes de la matriz extracelular. Las selectinas interaccionan de manera heterofílica con las mucinas.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión están involucradas en la unión física entre las células y a la matriz extracelular. Como fue mencionado, la pérdida de la adhesión celular es crítica para que los tumores invadan los tejidos circundantes y accedan al sistema linfático vascular para la formación de focos metastásicos. Estos mecanismos de adhesión celular mediados por moléculas de adhesión están íntimamente ligados con los eventos de señalización celular, al estabilizar la unión de otras moléculas de la superficie celular con sus ligandos y al actuar *per se* como moléculas transductoras de señales, controlando la activación y la proliferación celular[11].

INTEGRINAS

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas formadas por una cadena α y una cadena β unidas no covalentemente; capaces de mediar la adhesión célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-factor soluble[11]. Ambas cadenas presentan un segmento hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático capaz de interactuar con proteínas del citoesqueleto. La presencia de ambas subunidades α y β es necesaria para que las integrinas puedan interactuar con el citoesqueleto y con la matriz extracelular[12].

Según el tipo de subunidad beta que posean, las integrinas se clasifican en subfamilias. Hasta el momento se conocen 16 subunidades α y 8 subunidades β . La subunidad β es muy similar; en cambio la subunidad α presenta mayor heterogeneidad. Esta última contiene un dominio citoplasmático carboxilo terminal, una región transmembrana y un dominio globular extracelular que contiene regiones de unión a calcio.

La expresión de integrinas es universal, encontrándose al menos un miembro de la familia de integrinas en cada célula y tejido estudiado[13, 14].

Una de las principales características de las integrinas es su capacidad de unir a más de un ligando (Tabla I). Estas uniones son de muy baja afinidad (10^{-6} M aproximadamente), dependen de cationes, y reconocen secuencias aminoacídicas específicas, siendo la más estudiada, la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Esta

secuencia RGD se la puede hallar en muchas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno, trombospondina, vitronectina, laminina y colágeno tipo I[13].

<i>Integrina</i>	<i>Otra nomenclatura</i>	<i>Ligando en ECM</i>
$\alpha 1\beta 1$	VLA-1, CD49a/CD29	Colágeno, Laminina
$\alpha 2\beta 1$	VLA-2, CD49b/CD29	Colágeno, Laminina
$\alpha 3\beta 1$	VLA-3, CD49c/CD29	Colágeno, Laminina, Fibronectina, Entactina
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4, CD49d/CD29	Fibronectina
$\alpha 5\beta 1$	VLA-5, CD49e/CD29	Fibronectina
$\alpha 6\beta 1$	VLA-6, CD49f/CD29	Laminina
$\alpha 7\beta 1$		Laminina
$\alpha 8\beta 1$		Fibronectina, Vitronectina
$\alpha 9\beta 1$		Colágeno tipo I, Laminina
$\alpha v\beta 1$	CD51/CD29	Fibronectina, Vitronectina
$\alpha L\beta 2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M\beta 2$	Mac-1, CD11b/C18	ICAM-1, Fibrinógeno, Factor X, C3b
$\alpha X\beta 2$	gp150.95, CD11c/CD18	Fibrinógeno, C3b
$\alpha v\beta 3$	CD51CD61	Fibronectina, Vitronectina, Colágeno I y IV, Entactina, factor Von Willebrand
$\alpha 6\beta 4$	CD49f /CD104	Laminina
$\alpha v\beta 5$	CD51	Fibronectina, Vitronectina
$\alpha v\beta 6$		Fibronectina
$\alpha 4\beta 7$		Fibronectina
$\alpha v\beta 8$		Fibronectina, Vitronectina

Tabla I: Integrinas que participan en la adhesión celular a matriz extracelular y sus ligandos.

Otra de las características principales de las integrinas son los cambios conformacionales de la molécula que le permiten presentarse en un estado activo o en un estado inactivo. El paso de un estado a otro se produce rápidamente como resultado de un estímulo. Por ejemplo, la activación puede ocurrir por mediadores inflamatorios (citoquinas), ligandos[15], ésteres de forbol[16] y por anticuerpos activadores[1]. Se ha demostrado que el estado de activación de las integrinas puede modularse por señales procedentes del interior celular (*inside-out*) o por señales provenientes del exterior celular (*outside-in*)[17]. Por ejemplo, la activación de una célula puede inducir cambios conformacionales en el dominio extracelular de las integrinas. En este caso el dominio citoplasmático mantiene a la integrina en un estado inactivo hasta que la activación celular provoca un cambio conformacional del dominio extracelular, aumentando su afinidad por el ligando (*inside-out*).

En otros casos la interacción de integrinas con sus ligandos lleva a la activación de segundos mensajeros, la elevación del pH y el Ca^{2+} citoplasmático y la activación de quinasas de tirosina (*outside-in signaling*). Estos cambios intracelulares finalmente concluyen en eventos celulares como crecimiento y proliferación celular (por ejemplo para los linfocitos T) e inducción del estallido respiratorio (por ejemplo para los leucocitos polimorfonucleares) y de genes que codifican para mediadores de la respuesta inflamatoria (por ejemplo en monocitos)[12]. De esta manera, la regulación de la adhesión por las moléculas de integrinas se puede dar por cambios en los niveles de expresión de las integrinas o por cambios en el estado de activación de las mismas.

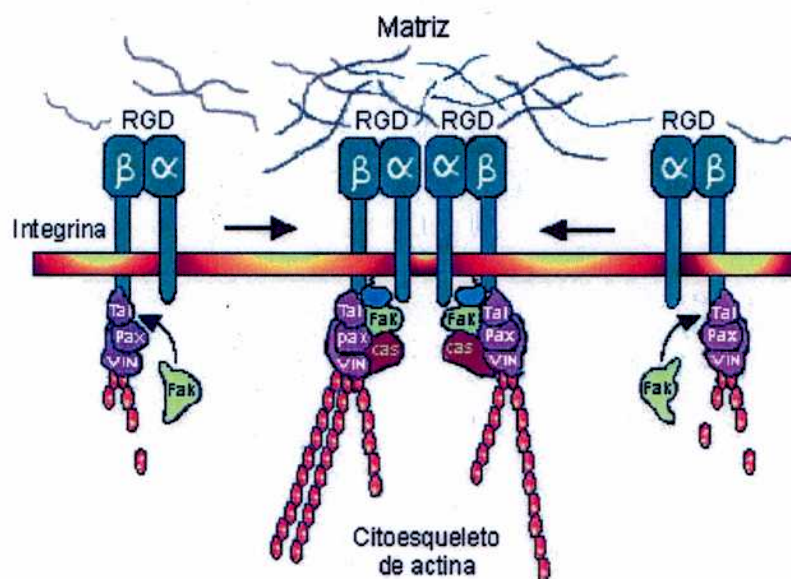


Figura 3: Interacción de integrinas

La unión a la matriz extracelular promueve la asociación de integrinas con el citoesqueleto y la transmisión de señales recibidas. RGD, motivo de unión de integrinas Arg-Gly-Asp; Tal, talina; Pax, paxilina; Vin, vinculina; CAS, p 130 CAS .

Algunas de las subfamilias de integrinas más estudiadas son las β_1 , β_2 y β_3 integrinas. Por ejemplo, la subfamilia β_1 (CD29), presente sobre la mayoría de las células, funciona en la adhesión célula-célula y célula-sustrato. Algunos ejemplos de esta subfamilia son los receptores de fibronectina ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$) y los de laminina ($\alpha_6\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$)[13]. En cambio la subfamilia β_2 (CD18) sólo se halla presente en leucocitos y comprende tres subtipos de receptores según el tipo de cadena α presente: LFA-1 (CD11a), MAC-1 (CD11b), gp150,95 (CD11c). LFA-1 tiene un rol en la interacción entre leucocitos, en la adhesión de leucocitos al endotelio y en la citotoxicidad mediada por LT y NK. Su ligando es ICAM-1 que se expresa en células activadas. MAC-1 se encuentra en neutrófilos y monocitos; siendo sus ligandos ICAM-1, iC3b, fibrinógeno y el factor X de coagulación. Se ha descrito su participación en la unión al complemento, en la fagocitosis y en la unión célula-célula; en particular en la unión de neutrófilos al endotelio[13]. Por su parte gp150,95 se expresa sobre monocitos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMNLs) y NK. Esta integrina participa en la unión al complemento por poseer como ligando a iC3b. La subfamilia β_3 está formada por la glicoproteína de

plaquetas IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) y el receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$. El primero funciona como receptor de fibrinógeno y en menor medida de fibronectina y trombospondina. En cambio $\alpha_v\beta_3$ une vitronectina (VN), fibrinógeno, trombospondina y el factor de von Willebrand[13].

El proceso de adhesión de las células a la matriz extracelular tiene una implicancia fundamental para el funcionamiento celular. En el caso de las células adherentes, éstas necesitan adherirse a la matriz extracelular para sobrevivir, proliferar y diferenciarse. La pérdida de adhesión a la matriz extracelular, fundamental para el mantenimiento de la integridad de los tejidos, conduce a la apoptosis, proceso conocido como *anoikis* [18]. Al igual que el crecimiento celular, la *anoikis* puede ser controlada por la matriz extracelular en una manera dependiente de integrinas, ya que la integrina $\alpha_5\beta_1$ (receptor de FN), induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Otra integrina, $\alpha_v\beta_3$, promueve la supervivencia en células endoteliales y de melanoma[19]. Las células tumorales, por lo general son resistentes a la *anoikis* y pueden proliferar sin adherirse a la matriz y de esta manera pueden abandonar el sitio original y metastatizar. Por otra parte, la proliferación dependerá de la correcta activación de los receptores para factores de crecimiento. Esto ocurre, siempre y cuando exista una apropiada adhesión celular, ya que la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk 4/6 y Cdk 2) es regulada por las integrinas. La adhesión a través de integrinas facilita también el abandono del ciclo celular y provee señales para la diferenciación, para lo cual se requiere la integración de señales provistas por las integrinas y por los factores solubles de diferenciación[17].

En definitiva, las integrinas no son simples receptores de adhesión celular, sino que modulan su actividad según las necesidades de la célula y pueden actuar transmitiendo señales al interior celular. De esta manera es posible considerar a las integrinas como “reguladores maestros” de la función celular porque pueden activar múltiples caminos de señalización.

El desarrollo de tumores malignos y el proceso metastásico está acompañado de una acumulación de alteraciones funcionales en una variedad de productos génicos, algunas de las cuales involucran a las integrinas. Por ejemplo, la reducción en los niveles de expresión de $\alpha_5\beta_1$ se correlaciona con una menor

adhesión a FN y con un aumento en la progresión tumoral[20]. Otra integrina, $\alpha_v\beta_3$, se encuentra presente en los melanomas malignos pero ausente en melanocitos; es probable que esta integrina esté relacionada con las propiedades invasivas del melanoma maligno[21, 22]. En general se observa una falta de organización espacial en la expresión de integrinas en tumores epiteliales. En el epitelio normal, las integrinas se expresan mayoritariamente en la superficie basolateral, en proximidad con la membrana basal. Por el contrario, en carcinomas la distribución espacial de las integrinas es desordenada con menor distribución intracelular. Estos cambios se correlacionan con la desorganización de la estructura de la membrana basal[23]. La importancia de la adhesión celular mediada por integrinas en la metástasis de melanoma también queda demostrado por el hecho de que péptidos que contienen RGD inhiben la migración de las células tumorales y la formación de metástasis[24]. Estos estudios permiten concluir que los patrones alterados en la expresión de integrinas están íntimamente relacionados con el fenotipo maligno.

CADHERINAS

Las cadherinas son una familia de proteínas dependientes de Ca^{2+} que median uniones estables entre células a través de uniones homofílicas, regulando la morfogénesis [13, 25]. Estructuralmente las cadherinas presentan cuatro motivos homólogos repetidos en su dominio extracelular, de los cuales el más distal es el que determina la especificidad de unión. El dominio intracelular es funcionalmente muy importante y es la región más conservada en esta familia de moléculas de adhesión. Su delección parcial o completa, altera la función adhesiva aunque su dominio extracelular se encuentre intacto[1]. En general, las cadherinas se concentran en los sitios de contacto entre células en asociación con el citoesqueleto y con proteínas citoplasmáticas conocidas como cateninas α , β y γ [26]. Se han descrito al menos cuatro subclases: la E-cadherina (presente en células epiteliales); la N-cadherina (presente en tejido neural y músculo); la P-cadherina (presente en placenta y células epiteliales) y la VE-cadherina (presente en uniones intercelulares de células endoteliales).

Existe cierta correlación entre la expresión de cadherinas y la capacidad de invasión tumoral[27]. Por ejemplo, se observó que la disminución en la expresión de E-cadherina promueve la invasión tumoral, mientras que su expresión en líneas

metastásicas, disminuye su habilidad invasiva[28, 29]. Por lo tanto se sugiere que la E-cadherina está codificada por un gen tumoral supresor involucrado en la patogénesis de ciertos carcinomas[29].

SELECTINAS

Las selectinas forman una familia de moléculas estructuralmente relacionadas, con un dominio N-terminal de tipo lectina, seguido por un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF). Las selectinas median la unión transitoria de leucocitos circulantes al endotelio vascular a través de uniones lábiles que permiten el rodamiento de los leucocitos sobre las células endoteliales en la dirección de la corriente sanguínea[30, 31].

Existen tres tipos de selectinas. La L-selectina se expresa constitutivamente en todos los leucocitos circulantes excepto por una subpoblación de linfocitos de memoria. La P-selectina se produce y almacena en los gránulos plaquetarios y en los cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales. En respuesta a mediadores de la inflamación como trombina e histamina, la P-selectina se moviliza rápidamente a la membrana plasmática para unirse a su ligando presentes en neutrófilos y monocitos. La E-selectina es inducida en las células endoteliales vasculares por citoquinas como la IL-1, el LPS o el TNF y requiere la síntesis de ARN mensajero y proteínas. Esta selectina también ha sido relacionada en los procesos metastásicos[32]. Todas las selectinas reconocen carbohidratos sialilados. La E-selectina y la P-selectina reconocen una estructura diferente pero relacionada con el tetrasacárido fucosilado sialil Lewis^x y su isómero sialil Lewis^a. El ligando para la L-selectina está relacionado con sialil Lewis^a y Lewis^x y contiene ácido siálico y sulfato[33]. Se han encontrado formas solubles de las tres clases y su expresión se modula luego de la activación celular.

La relación entre selectinas y metástasis se deduce de los trabajos en los que se describe la ausencia de P-selectina en la microvasculatura de melanomas primarios y en las metástasis derivadas del mismo. Se postula que la ausencia de esta proteína evitaría la infiltración de leucocitos, evadiendo los mecanismos de la respuesta inmune antitumoral[34].

SIALOMUCINAS

Esta familia de proteínas se caracteriza por presentar gran cantidad de serinas y treoninas altamente O-glicosiladas. Entre las mucinas, se hallan la MAdCAM (*Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule*; molécula de adhesión celular adresina de las mucosas), GlyCAM-1 (*Glycosilated Cell Adhesion Molecule-1*; molécula de adhesión glicosilada), CD34, PSGL-1 (*P-selectin glycosilated ligand-1*; ligando glicosilado de la P-selectina), y las MUC. Las moléculas CD34 y GlyCAM-1 se expresan en el endotelio vascular alto de los nódulos linfáticos, mientras que MAdCAM está presente en el endotelio de mucosas. Tanto MAdCAM, GlyCAM-1, CD34 y PSGL-1 son capaces de interactuar con L-selectina, iniciando la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales[35]. Por otra parte, se observó que las células tumorales con alta expresión de la mucina MUC4, poseen una mayor capacidad invasiva[36], probablemente al enmascarar los antígenos tumorales e inhibir la respuesta citotóxica de los linfocitos[37].

SUPERFAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS

Los miembros de la superfamilia de Inmunoglobulinas (Ig) comparten una estructura común, que tiene una secuencia aproximada de 100 aminoácidos (Aa) con un puente disulfuro central que estabiliza a una serie de hojas β antiparalelas (figura 4). A pesar de que los miembros de esta familia tienen funciones muy diversas, la mayoría son moléculas involucradas en el reconocimiento de otras moléculas solubles o asociadas a la membrana. Este reconocimiento puede ser homofílico o heterofílico y por lo general ocurre entre miembros de la superfamilia de Inmunoglobulinas [38, 39].

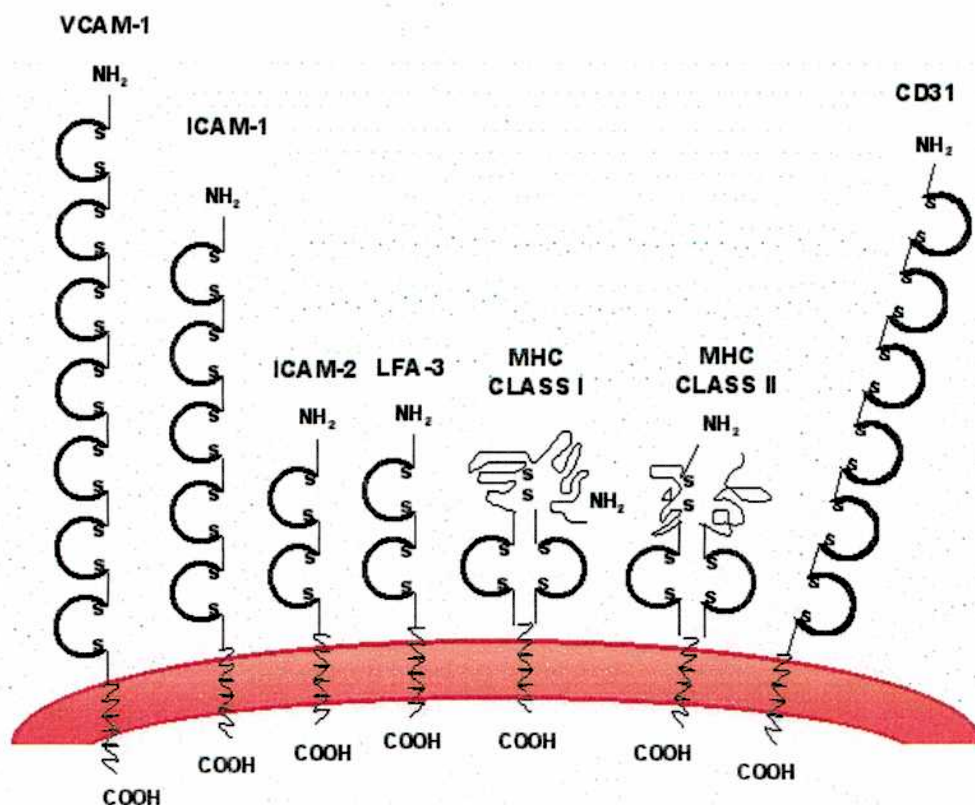


Figura 4: Superfamilia de Inmunoglobulinas (Ig)

Diagrama esquemático de los miembros de la Superfamilia de Inmunoglobulinas. Todos poseen dominios tipo Ig, estabilizados por puentes disulfuro.

Dentro de esta superfamilia, se han descrito más de 50 moléculas diferentes entre las que se distinguen, por su relevancia en la adhesión celular, ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) y PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*).

Al igual que las integrinas y las cadherinas, las moléculas de adhesión celular (CAM) contribuyen al proceso de la metástasis tumoral a través de la neoexpresión, aumento o disminución de su expresión en las células malignas. En ciertos casos la expresión de nuevas CAM le brindará a la célula tumoral potenciales sitios de adhesión y contribuirá a la migración, invasión y extravasación celular. En otros casos, una disminución de la expresión, permitiría la evasión del reconocimiento inmunológico y/o la liberación de las células de sus controles regulatorios mediados por contacto celular. Un gran número de

moléculas de la superfamilia de Ig han sido implicadas en la tumorigénesis y en la metástasis.

La molécula ICAM-1/CD54 se expresa en la membrana de células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, leucocitos y varias células tumorales. Su expresión aumenta en respuesta a mediadores inflamatorios. También se ha detectado la presencia de ICAM-1 soluble en casos de inflamación, infección y cáncer. Los niveles circulantes de ICAM-1 han sido correlacionados con metástasis hepáticas y con la progresión de la enfermedad en el caso de melanomas[40, 41]. Además, ICAM-1 soluble producido por células de melanoma es capaz de bloquear la muerte celular mediada por LT citotóxicos, sugiriendo otro posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune por el tumor[42].

La molécula VCAM-1/CD106 se distribuye en células endoteliales y epiteliales, macrófagos y células dendríticas y es regulada por mediadores inflamatorios. También se han detectado niveles solubles de esta molécula en los pacientes con cáncer y en las enfermedades inflamatorias[43]. Además, se ha demostrado que VCAM-1 expresada en células endoteliales activadas, media la adhesión tumoral a través de la unión a $\alpha_4\beta_1$ integrina[44].

La molécula NCAM/CD56 fue la primera en ser aislada, caracterizada y clonada. Originalmente identificada en tejidos neuronales, se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario, cumpliendo un rol importante en la interacción célula-célula en diversos tejidos. Esta molécula media la adhesión entre células de melanoma al interactuar de forma heterofílica con la integrina $\alpha_v\beta_3$ [45]. Además se observó que las células de melanoma que expresan mayor densidad de NCAM, presentan un mayor poder metastásico, indicando su participación en el proceso de invasión tumoral[46].

La molécula PECAM-1/CD31 se expresa en la superficie de plaquetas, monocitos, neutrófilos y en una subpoblación de LT. Esta molécula será exhaustivamente analizada en las siguientes secciones, dada su relevancia en el presente trabajo de tesis.

MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR ENDOTELIAL Y PLAQUETARIA (PECAM-1/CD31)

La molécula PECAM-1/CD31 fue identificada por primera vez a mediados de la década de 1980. En 1987 Newman[47] clonó una proteína de superficie de 130kDa y dado que se encontraba en plaquetas y células endoteliales y pertenecía a la superfamilia de Inmunoglobulinas, la denominó PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*)[48]. Posteriormente también fue identificada en la superficie de monocitos, neutrófilos, una subpoblación de LT y en las uniones intercelulares entre células endoteliales[49]. Por lo general no se expresa en fibroblastos, epitelio, músculo u otras células no vasculares. Además existe una forma soluble, hallándose valores de 10–25 ng/ml en el plasma humano normal[50]. En las células endoteliales PECAM-1 es sintetizada en 1 a 3 horas como un precursor de 110 kDa. Antes de ser transferida a la superficie celular, la proteína es procesada dando origen a la proteína madura de 130kDa. El precursor es rico en carbohidratos de manosas, que son procesados en el aparato de Golgi, siendo la tasa de recambio de la proteína de aproximadamente 48 horas[50].

ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA

PECAM-1 presenta una porción extracelular de 574 Aa organizada en seis dominios extracelulares del tipo de Ig, un dominio transmembrana de 19 Aa y un dominio citoplasmático de 118 Aa[51]. La molécula está codificada por un gen de 75 kilobases (kb) que se encuentra al final del brazo largo del cromosoma 17[52]. El gen que codifica PECAM-1 está organizado en 16 exones. Cada uno de los seis dominios extracelulares está codificado por su propio exón (exones 3-8). El exón 9 codifica para la región transmembrana y una serie de siete exones diferentes codifican para la cola citoplasmática[53] (figura 5). Estos últimos pueden sufrir *splicing* generando diferentes isoformas; y además contienen un número importante de residuos que pueden ser fosforilados luego de la activación celular; entre ellos 5 tirosinas (Y), 5 treoninas y 12 residuos serina. Además existen nueve potenciales sitios para N glicosilación que justifican que los carbohidratos constituyan alrededor de un 40% de la masa de la proteína madura[54].

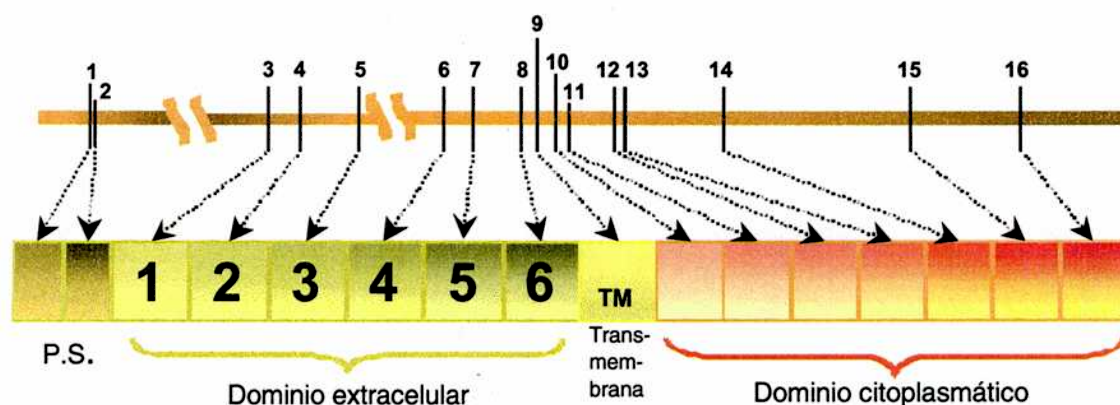


Figura 5: Organización genómica y proteica de PECAM-1

El gen que codifica PECAM-1 está formado por 16 exones. Cada uno de los dominios extracelulares está codificado por un exón (3 al 8). El dominio transmembrana está codificado por el exón 9, mientras que el dominio citoplasmático está codificado por 7 exones (10 al 16) y los exones 1 y 2 codifican el péptido señal. La posición y tamaño relativo de cada exón codificante está ilustrado por cajas sólidas. Las flechas unen los exones codificantes con la región correspondiente de la proteína; PS: péptido señal.

Se han identificado varias formas de PECAM-1 humano y murino originadas por *splicing alternativo*. Estas formas difieren en el dominio transmembrana o en el citoplasmático. Dentro de las variantes humanas se encuentran: una isoforma que carece de una región de 63 pares de bases en la cola citoplasmática, que corresponde al exón 13; una isoforma soluble aislada de células endoteliales de venas de cordón umbilical que surge del *splicing* del exón 9; otra isoforma aislada de HUVEC que está presente en bajas cantidades y que carece del exón 14. El análisis de la expresión de PECAM-1 en el embrión murino, permitió identificar seis isoformas denominadas: *full length* (FL), $\Delta 12$, $\Delta 14$, $\Delta 15$, $\Delta 12\&15$, $\Delta 14\&15$ y $\Delta 12,14\&15$ [55].

DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DE PECAM-1

La molécula se encuentra ampliamente distribuida en células del compartimento vascular. Las plaquetas contienen alrededor de 5.000 moléculas por célula, mientras que los glóbulos blancos expresan aproximadamente 85.000 moléculas[49]. Por su parte las células endoteliales expresan casi un millón de moléculas de PECAM-1 en su superficie[54]. *In situ*, PECAM-1 se encuentra

constitutivamente en el endotelio continuo de todos los tipos de vasos y es empleado como marcador inmunohistoquímico de vasos sanguíneos particularmente al comienzo de la angiogénesis.

Dentro de los glóbulos blancos, PECAM-1 se expresa fuertemente en monocitos, neutrófilos y en una subpoblación de LT asociada con el fenotipo CD8⁺CD45RA⁺[56, 57]. Además se observan bajos niveles de expresión en células de memoria CD45RO⁺, CD4⁺ y linfocitos B[58]. También está presente en *stem cells* de médula ósea y en líneas celulares transformadas de linajes mieloide y megacariocítico[59]. Tang y colaboradores describen la expresión de PECAM-1 en líneas de tumores sólidos humanos, murinos y de rata, aunque este trabajo ha sido muy cuestionado[60].

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PECAM-1/CD31

Es bien conocido que TNF- α induce la expresión de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 e INF- γ aumenta la expresión de ICAM-1[10, 61]. Pero ninguna de estas citoquinas modifica la expresión de PECAM-1. Sin embargo, Shaw y colaboradores observaron que en células endoteliales, la combinación de TNF- α e INF- γ produce una redistribución de PECAM-1[62]. Por su parte Rival y colaboradores observaron que el TNF- α y el INF- γ inducen la internalización e inhiben la síntesis de PECAM-1/CD31; lo que en última instancia lleva a una disminución en la expresión y una menor migración de leucocitos a través de las monocapas de células endoteliales[63].

La expresión de PECAM-1/CD31 también puede ser incrementada. Esto se puede observar en células de origen mieloide durante el proceso de diferenciación a macrófagos y luego del tratamiento con TGF- β [64]. En cambio, en LT se observa una disminución en el ARN mensajero de PECAM-1 (a nivel de la transcripción) luego de la activación del LT[65].

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y LIGANDOS

PECAM-1 es una proteína dimérica de transmembrana de tipo I que interactúa en forma homofílica. La homología entre PECAM-1 y las moléculas de adhesión de la

Superfamilia de Ig, sugieren que funciona como molécula de adhesión. Un anticuerpo contra el dominio 1 de PECAM-1 inhibe en un 70-90% la migración transendotelial de leucocitos[66].

La unión homotípica involucra la interdigitación de CD31 opuestos y compromete a sitios de unión localizados en los dominios 2 y 3 y los dominios 5 y 6[67]. Actualmente se acepta que la adhesión homofílica depende de los dos primeros dominios[68], y es regulada por la estructura del dominio citoplasmático[68, 69].

También se ha descrito una interacción heterofílica que involucra proteoglicanos y heparan sulfato en la lámina basal del endotelio[70, 71]. La presencia de una secuencia consenso de reconocimiento de glicosaminoglicanos en el dominio 2 extracelular, sugiere que PECAM-1 se une a proteoglicanos de células adyacentes. Esta secuencia X-B-B-X-B-X (donde B es un residuo básico y X es un residuo hidropático) se encuentra en el segmento hidrofílico del dominio 2 (entre los Aa 151-156)[72].

La región citoplasmática de PECAM-1 también tiene un rol importante en la interacción de los dominios extracelulares con sus ligandos y es necesaria para que PECAM-1 se localice en los bordes de la célula[73]. La delección de la región C-terminal del dominio citoplasmático (exón 14-16) convierte a la adhesión heterofílica en homofílica[73]. El exón 14 modula las propiedades adhesivas extracelulares de PECAM-1, ya que las isoformas que contienen el exón 14 presentan adhesiones heterofílicas dependientes de calcio y heparina; mientras que las isoformas que carecen de este exón se adhieren de manera homofílica independiente de calcio y heparina. La pérdida de la Y⁶⁸⁶ del exón 14 o de su fosforilación cambia la especificidad del ligando de PECAM-1 convirtiendo la unión de heterofílica a homofílica[74].

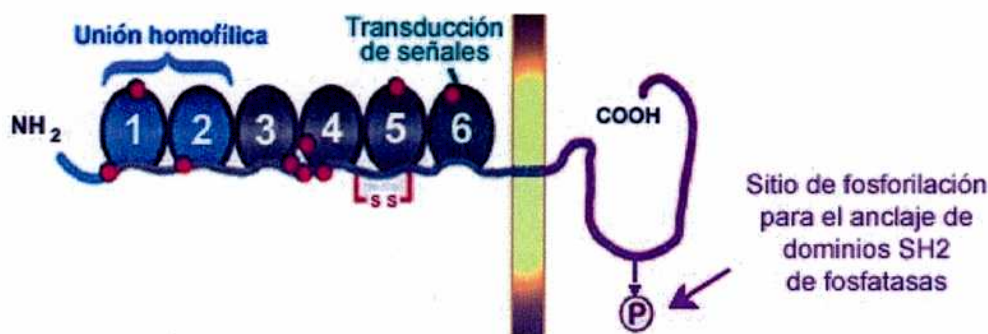


Figura 6: Estructura proteica de PECAM-1

PECAM-1 presenta seis dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Los dominios 1 y 2 participan de la interacción homofílica, mientras que el dominio 6 es responsable de la transducción de señales. El dominio citoplasmático posee sitios de fosforilación que permiten el ensamblado de las moléculas transductoras de señales.

Se han descrito varios ligandos para PECAM-1 además de CD31 y de proteoglicanos; entre ellos T-CD31L (presente en LT), la integrina $\alpha_v\beta_3$, una molécula expresada por eritrocitos parasitados con *Plasmodium falciparum* (RBC) y la ADP-ribosil ciclasa CD38. Sin embargo, se duda de la importancia de las uniones heterofílicas y se cree que existe un mecanismo indirecto entre PECAM-1 y su ligando, donde PECAM-1 funciona como un receptor agonista y su activación inicia un camino de transducción de señales específico, que resulta en eventos de adhesión secundaria mediada por receptores diferentes a PECAM-1.

Entre los ligandos descritos, se destaca la integrina $\alpha_v\beta_3$ expresada por células endoteliales, LT activados y NK. Esta molécula es receptor para moléculas de la matriz extracelular y para productos de la cascada de la coagulación[75, 76]. Por otro lado, el otro ligando descrito, CD38, es una ADP-ribosil ciclasa de 45kDa, presente tempranamente en células hematopoyéticas. Las interacciones CD38-CD31 iniciarían señales intracelulares que producen variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular y en la producción de citoquinas (IL-6, IL-10, INF- γ y GM-CSF)[77].

SEÑALES INTRACELULARES MEDIADAS POR PECAM-1/CD31

La dimerización de PECAM-1 lleva a la activación de las integrinas β_1 sobre la superficie de LT[78] y de β_2 en neutrófilos, NK y monocitos[79, 80]. En estos

últimos, la coligación de CD31 lleva a la inducción de citoquinas proinflamatorias[81]. En tanto que en eosinófilos, la interacción de $\alpha_v\beta_3$ con CD31 amplifica la adhesión de eosinófilos a células endoteliales a través de la activación de la integrina β_1 [82].

La fosforilación de proteínas en residuos tirosina provee de un mecanismo de control para los procesos de señalización intracelular que regulan el crecimiento celular, la proliferación, la adhesión, la diferenciación y el metabolismo. El nivel de fosforilación en tirosina de las proteínas celulares es controlado por la acción coordinada de las quinasas y de las fosfatasas de tirosina. La transmisión de señales por fosforilación en tirosina, es mediada por la unión secuencial específica de dominios Src homólogos-2 (SH2) presentes en las moléculas citosólicas de señalización. En el caso de PECAM-1/CD31, la activación de integrinas modula el grado de fosforilación de la molécula. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios. Lu y colaboradores encontraron que la activación de integrinas en células endoteliales lleva a la desfosforilación de PECAM-1[83]. En cambio Jackson y colaboradores observaron que las interacciones mediadas por integrinas, producen un aumento en la fosforilación en tirosina de PECAM-1[84].

DOMINIOS ITIM E ITAM EN PECAM-1/CD31

Los dominios ITIM (inmunoreceptores con motivos tirosina inhibitorios) y los ITAM (inmunoreceptores con motivos tirosina activadores) son motivos conservados presentes en los dominios citoplasmáticos de varias moléculas (figura 7). Por ejemplo se ha hallado ITIM (L/I/V/S-x-Y-x-x-L/V) en las moléculas Fc γ RIIB, KIR y CD22[85, 86]. Su presencia regula negativamente los programas de activación celular. En cambio ITAM (Y-x-x-L-x₆₋₈-Y-x-x-L) se encuentra en el TCR, el receptor Fc γ R y la molécula CD3. A diferencia de los ITIMs, los ITAMs regulan positivamente los programas de activación celular y su fosforilación induce la asociación con quinasas[87]. Estos motivos se encuentran espaciados por segmentos más pequeños que los que separan a los ITIMs, lo que les brinda una mayor afinidad por los dominios SH2 presentes en las quinasas de tirosina[88].

A pesar de que el dominio citoplasmático de PECAM-1 no contiene actividad quinasa ni fosfatasa intrínseca, miembros de las quinasas en tirosina (Src y Csk)

pueden fosforilar las tirosinas Y⁶⁶³ y Y⁶⁸⁶. Una vez fosforilados, estos residuos son responsables de reclutar y activar a las tirosina fosfatasas SHP-1 y SHP-2 que contienen dominios Src homólogos 2 (SH2).

Existen evidencias que sugieren que PECAM-1 funcionaría como ITAM. Entre ellas: i) la presencia de homología entre los Aa que rodean a las Y⁶⁶³ y Y⁶⁸⁶ y la secuencia consenso de ITAM; ii) el exón 12, 13 y 14 que codifican para el primer aspartato, el segundo aspartato y para Y⁶⁶³ y Y⁶⁸⁶ respectivamente. Se debe mencionar que en las moléculas ITAM, los residuos tirosina están codificados por dos exones diferentes y el primer aspartato/glutamato es el producto de otro exón; iii) el dominio citoplasmático de PECAM-1 es fosforilado por c-Src (pp60) y se asocia con PLC- γ 1 (una proteína de señal que clásicamente se une a ITAM) y con SHIP (que se asocia tanto con ITIM como con ITAM); iv) el espacio entre los dos residuos de fosfotirosina en PECAM-1 (22 Aa) si bien no es tan corto como el espacio de los ITAM (10–15 Aa), tampoco es tan grande como el presente en los ITIM (mayor a 25 Aa).

El concepto actual es considerar a PECAM-1 tanto dentro de las moléculas de tipo ITAM, como de tipo ITIM[89]. El dominio citoplasmático de PECAM-1 contiene dos ITIMs, uno alrededor de la Y⁶⁶³ y el otro alrededor de la Y⁶⁸⁶. Estos residuos tirosina se fosforilan en respuesta a numerosos estímulos como ser la agregación plaquetaria[84], el *crosslinking* de PECAM-1 con anticuerpos monoclonales[90], la activación del receptor de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI)[91], los estímulos mecánico de células endoteliales[92], la agregación del complejo receptor T (TCR) en LT[93], el estrés oxidativo[94] y el tratamiento con un inhibidor de fosfatasas. Una vez fosforilados, estos residuos tirosina reclutan y activan a las fosfatasas de tirosinas SHP-1 y SHP-2[95].

La mayoría de los LT CD4⁺ y la mitad de los LT CD8⁺ pierden la expresión de PECAM-1 en su transición de célula *naïve* a célula de memoria. Como fue dicho, los LT CD4⁺CD31⁻ cumplen una mejor función colaboradora, responden mejor a los antígenos, secretan más IL-4 y proveen de mayor ayuda para la producción de anticuerpos que los LT CD4⁺CD31⁺[96]. Es decir que PECAM-1 funcionaría como un receptor inhibitorio que modula la señal de transducción mediada por la quinasa de tirosina en los LT[97].

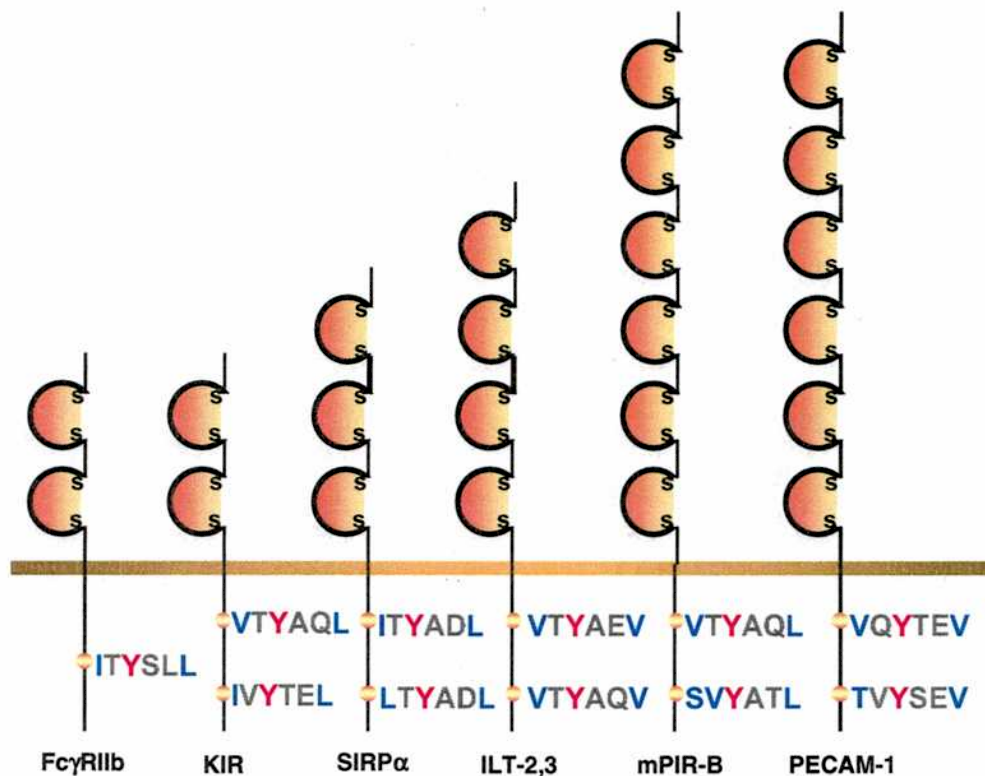


Figura 7: Dominios ITIM en los miembros de la Superfamilia de Inmunoglobulinas

Diagrama esquemático de los miembros de la Superfamilia de Inmunoglobulinas que poseen uno o más ITIMs (L/I/V/SxYxxL/N). ILT, "Ig-like transcript"; KIR, "killer inhibitory receptor"; PIR-B, "paired Ig-like receptor-braking protein"; SIRP, "signal regulatoy protein".

La fosforilación del dominio citoplasmático de PECAM-1, crea un sitio de anclaje para el dominio Src-homólogo 2 (SH2) de la fosfatasa de tirosina (SHP-2)[93, 98]. Esta proteína contiene un dominio SH2 amino terminal, seguido por un dominio catalítico de fosfatasa y un dominio carboxi terminal que se puede fosforilar en tirosina. La asociación de SHP-2 a PECAM-1 requiere de las Y⁶⁶³ que se une al N-SH2 y Y⁶⁸⁶ que se une al C-SH2 de SHP-2 y de esta manera se estimula la actividad catalítica de SHP-2. Este último se une a residuos de fosfotirosina presentes en algunos receptores para factores de crecimiento y citoquinas como por ejemplo el EGF, la IL-6, el receptor FcεRI, el TCR y el complejo receptor B (BCR). Su actividad catalítica aumenta por su fosforilación en tirosina y también por la ocupación de su dominio SH2 aminoterminal. La fosforilación de su Y⁵⁴² del SH2 en el COOH terminal, crea un sitio de anclaje para Grb-2, lo que conduce a la unión de Grb2-Sos a SHP-2 para activar al camino de señalización Ras-Raf[99].

Estos eventos, en última instancia, cambian el estado de activación celular o la expresión de ciertas moléculas, constituyendo junto con su papel en la interacción celular, una de las principales funciones de PECAM-1 descritas hasta el momento.

ROLES FISIOLÓGICOS DE PECAM-1/CD31

El reclutamiento de leucocitos al sitio inflamatorio involucra una cascada de eventos secuenciales donde las moléculas de adhesión, las citoquinas y las quimoquinas trabajan de manera coordinada para dirigir a los leucocitos desde el lumen vascular, a través del endotelio hacia el estímulo inflamatorio. PECAM-1 participa en esta cascada de eventos denominada “cascada de adhesión” que lleva a la extravasación de leucocitos durante el proceso inflamatorio.

La migración transendotelial de leucocitos involucra dos pasos: pasaje inicial a través de las uniones intercelulares endoteliales (diapédesis), seguido del movimiento a través de la membrana basal. PECAM-1 estaría involucrado en ambos pasos ya que *in vitro* se puede bloquear la migración transendotelial utilizando anticuerpos monoclonales que bloquean la adhesión homofílica y heterofílica[100]. *In vivo*, también se observó que anticuerpos anti PECAM-1 bloquean la acumulación de neutrófilos en la cavidad peritoneal y en el compartimento alveolar[101-103]. Estos resultados fueron confirmados por la generación de ratones *knock out* para PECAM-1, en los que se observó no sólo un defecto en el proceso inflamatorio, sino también en la función plaquetaria [104].

Otras funciones relacionadas con la molécula PECAM-1/CD31 son la formación de vasos y la activación linfocitaria. La primera de ellas se manifiesta en la incapacidad de formar monocapas de células endoteliales cuando se cultivan estas células con anticuerpos contra PECAM-1/CD31[105, 106]. En cuanto a la activación linfocitaria, se observó que anticuerpos contra el dominio 6 o péptidos conteniendo los Aa 551 a 574 de PECAM-1, inhiben la activación de LT en un cultivo mixto linfocitario de manera específica y dosis dependiente[65, 107, 108]. También se observó que los LT en reposo CD4⁺CD31⁺ al igual que las CD4⁺CD45RA⁺ proveen de poca actividad colaboradora para la síntesis de IgG. Mientras que los CD4⁺CD31⁻ al igual que los CD4⁺CD45RO⁺ responden al máximo frente a antígenos como el toxoide tetánico y proveen de máxima actividad colaboradora para la síntesis de IgG[96, 107].

TRÁFICO INTRACELULAR DE MOLÉCULAS

El transporte intracelular de proteínas de la membrana celular hacia la superficie es continuo y ocurre en ausencia de señales específicas. Sin embargo, el transporte selectivo hacia organelas intracelulares especializadas requiere de señales presentes en los dominios citoplasmáticos de las proteínas.

Una vez sintetizadas las proteínas, éstas pasan del citosol al retículo endoplásmico, desde allí al aparato de Golgi, donde son transportadas entre las cisternas para llegar al *trans* Golgi (TGN). Allí son enviadas a su destino final según la señal que posean; a saber: membrana plasmática, lisosoma (si poseen manosa 6–fosfato característico de las enzimas lisosomales) o vesícula secretoria. Solo las proteínas que se encuentran bien ensambladas pueden abandonar el RE y pasar al aparato de Golgi donde ocurre la síntesis y la glicosilación. Algunas proteínas contienen una señal de retención al RE. En estos casos, cuando la proteína llega al Golgi, luego es devuelta al RE[109].

Las señales o secuencias presentes en los dominios citoplasmáticos de las proteínas que direccionan hacia el endosoma son YXXZ/NXXY y LZ donde Z indica un Aa hidrofóbico (L, I, V, M, C o A). Estas señales son reconocidas en el TGN o en la membrana plasmática. Por ejemplo, las señales YXXZ como YSKV, FPHL y YRGV producen el pasaje de proteínas de la membrana hacia los endosomas tempranos. Para el caso del transportador de glucosa GLUT–4, existe un motivo FQQI en el extremo N terminal de la cola citoplasmática que le permite ser transportado a la membrana celular y un motivo LL en el extremo C terminal que le permite volver a ser endocitado desde la membrana hacia el endosoma. Otro ejemplo es la cadena invariante (Ii) del MHC de tipo II, la que posee múltiples señales citoplasmáticas LZ y señales LI y ML que la dirigen desde el TGN al endosoma. Por otro lado, la secuencia YQRL cerca del extremo C terminal de la cola citoplasmática de la proteína TGN 38 es esencial para su localización en la membrana del TGN. También se sabe que las moléculas EGFR y CD4 poseen motivos LL en su cola citoplasmática y que son internalizados luego de la fosforilación por la proteína quinasa C (PKC), lo que indicaría que cuando los residuos serina/treonina cercanos al motivo di–leucina (LL), son fosforilados, este motivo actúa como señal de internalización provocando la disminución de la molécula en la membrana plasmática[110].

Se han descrito dos mecanismos de internalización para los receptores; uno dependiente de clatrina y otro independiente. El ciclo endocítico comienza en una región especializada de la membrana conocida como fosas recubiertas de clatrina. Estas, luego se transforman en vesículas que se dirigen y fusionan con los endosomas tempranos y posteriormente con los endosomas tardíos. En las fosas de clatrina hay proteínas adaptadoras (AP), las que promueven el ensamblado de la clatrina, uniéndola a ésta con la membrana e interactuando con las proteínas de la membrana[111]. Ejemplos de este tipo de mecanismo de internalización dependiente de clatrina son los receptores de transferrina, la lipoproteína de baja densidad y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R)[112].

El sistema endocítico comprende un sistema de vesículas interconectadas, vacuolas y túbulos que se comunican entre sí y con la membrana plasmática y el TGN. Los endosomas tempranos son las primeras estructuras que reciben el material endocitado y tienen un pH menos ácido que los endosomas tardíos. Las proteínas que reciclan como el receptor de transferrina pasan desde los endosomas tempranos hacia la membrana mientras que las proteínas que no reciclan son transportadas a los endosomas tardíos y a los lisosomas[113]. En los lisosomas, los ligandos se disocian de su receptor y son degradados, en tanto que el receptor puede o no volver a la membrana celular (en el caso de LDL y transferrina). Si no vuelve a la membrana celular, el receptor puede ser degradado en el lisosoma (por ejemplo el receptor de EGF) o puede sufrir transcitosis[114].

Estos mecanismos de transporte intracelular de las moléculas pueden tener un rol importante en los procesos de progresión tumoral.

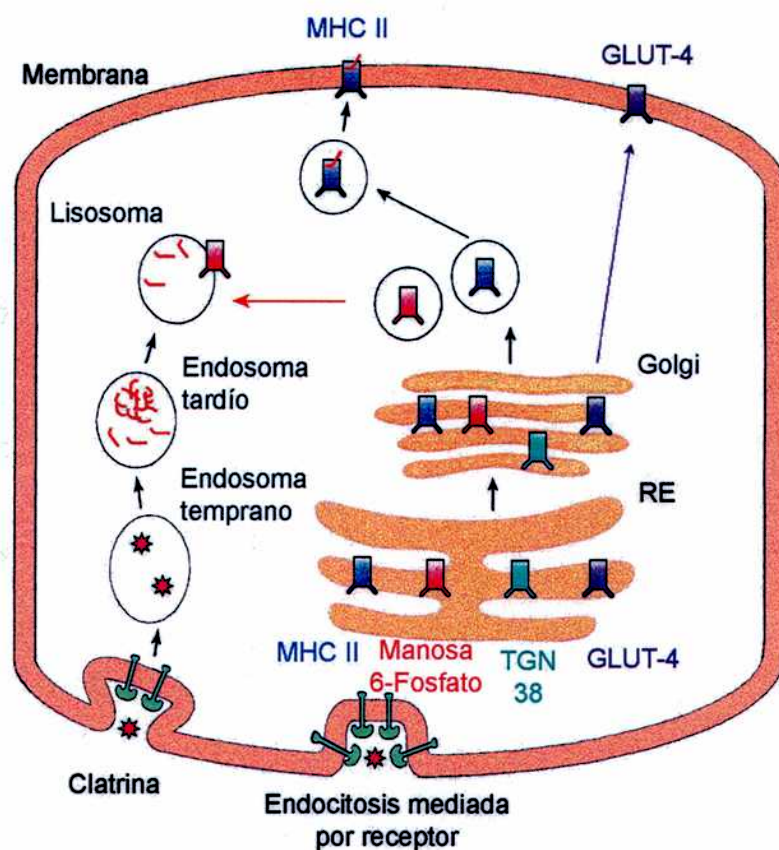


Figura 8: Vías de las proteínas

Tráfico intracelular de las proteínas manosa 6- fosfato (■), el TGN-38 (■) la GLUT-4 (■) y el MHC II (■), cuyos destinos finales son el lisosoma, el aparato de Golgi o la membrana plasmática respectivamente. Además se muestra la endocitosis de los receptores de transferrina que es clatrina dependiente.

O B J E T I V O S

El objetivo general de la tesis de doctorado fue caracterizar la expresión y el rol de las moléculas de adhesión, especialmente PECAM-1/CD31, en líneas de células tumorales humanas. En particular se examinó:

I) La **expresión** de PECAM-1/CD31 en líneas celulares de melanoma, adenocarcinoma y se comparó con la expresión presente en leucocitos y células endoteliales.

II) La **modulación** en la expresión de PECAM-1/CD31 sobre la superficie de las células tumorales, modificando los factores y condiciones del medio de cultivo o a través de la utilización de oligonucleótidos antisentido para la molécula.

III) La **presencia** de mecanismos de tráfico intracelular y de reservorios intracelulares para PECAM-1/CD31 en células normales y tumorales.

IV) La **interacción** y **caracterización** de los mecanismos de adhesión de las células tumorales a matrices extracelulares y a células endoteliales.

V) El **rol** de CD31 en la proliferación de las células tumorales.

MATERIALES Y METODOS



CULTIVOS CELULARES

Líneas celulares

Las líneas celulares de melanoma humano IIB-MEL-LES y IIB-MEL-J fueron establecidas a partir de un melanoma metastásico[115, 116] y la línea celular HCT-116 de adenocarcinoma de colon humano fue obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, USA).

Cultivo de células tumorales

Las células de melanoma fueron cultivadas en *Dulbecco's Modified Eagle Medium + Nutrient Mixture F-12* (D-MEM/F-12) (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, Mo, USA) suplementado con 10 % Suero Bovino Fetal (SBF) (*Gibco Rockville*, MD, USA), ácido ascórbico(17,6 µg/ml), ácido pirúvico (150 µg/ml), selenito (3,5 µg/ml), galactosa (300 µg/ml), glutamina (292 µg/ml), insulina (5 µg/ml), penicilina (64 µg/ml) y estreptomycin (132 µg/ml) y mantenidas a 37°C en estufa con 5 % CO₂. Las células de adenocarcinoma fueron crecidas en DMEM suplementado con 10 % SBF (*Gibco Rockville*, MD, USA).

Todas las líneas de melanoma como las de adenocarcinoma crecen en monocapa. Para la amplificación de las células de melanoma y adenocarcinoma se utilizó una solución de 0,05 % tripsina / 0,02 % Etilendiaminotetracetato disódico (EDTA).

En algunos experimentos, las células de melanoma fueron llevadas a confluencia. A partir de ese momento, las células espontáneamente desprendidas de la monocapa fueron recuperadas a las dieciséis horas, analizándose la expresión de CD31 por inmunofluorescencia.

En ciertas ocasiones, al medio de cultivo de las células de melanoma, se le adicionó 5 ng/ml de EGF, para evaluar su efecto sobre la expresión de PECAM-1.

Células endoteliales (HUVEC)

Células endoteliales derivadas de venas de cordón umbilical humano fueron aisladas y cultivadas como fuera descripto por Jaffe y colaboradores[117]. Las

células endoteliales se aislaron a partir de la vena del cordón umbilical por tratamiento con colagenasa (0,5 mg/ml, 20 minutos a 37°C) (*Worthington Biochemical Corporation*, New Jersey, USA) fueron crecidas sobre gelatina (*Difco*, MO, USA) en medio completo, compuesto por RPMI 1640, 2 mM L-glutamina, 2-mercaptoetanol (50 μ M), piruvato de sodio (45 μ g/ml), 25 μ g/ml suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGF), 22,5 μ g/ml heparina y 20 % SBF de complementado. Para los repiques de estas células se utilizó 0,025 % tripsina/0,01% EDTA. Todos los reactivos fueron adquiridos en *Sigma Chemical Co.*

Purificación de monocitos y neutrófilos humanos de donantes normales

Monocitos y PMNLs humanos fueron purificados como se describió previamente a partir de sangre anticoagulada con ACD-heparina de donantes normales[118]. Los eritrocitos fueron separados por sedimentación con dextrán 6% en solución salina (*Kabi Pharmacia Uppsala*, Suecia) durante 1 hora. El sobrenadante rico en leucocitos fue centrifugado a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* fue resuspendido en buffer TI sin calcio ni magnesio (Ti^{2+}) pero con 10 % de plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente las células fueron colocadas sobre un gradiente discontinuo de Percoll de 62 % y 77 %. El gradiente fue centrifugado a 200 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose dos halos de células correspondientes a células mononucleares (por encima de 62 %) y PMNLs (entre 62 % y 77 %). Las suspensiones celulares fueron lavadas varias veces y finalmente el *pellet* fue resuspendido en RPMI 1640, 0,5 % albumina sérica humana (HSA) (Instituto Grifols, España). Posteriormente, se procedió al recuento de células utilizando el colorante violeta de cristal y azul trypan.

Generación de células dendríticas (DC)

Las DC se generaron a partir de monocitos de sangre periférica (moDC) empleando la metodología descrita por Romani y colaboradores[119]. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque ($\delta = 1,077 \text{ g/cm}^3$, 2000 r.p.m. durante 20 minutos). Estas células ($3\text{-}5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivadas durante dos horas a 37°C en RPMI 1640 (*Gibco BRL*, NY, USA) con 10 % SBF (*Gibco BRL*, NY, USA) en placas de Petri (*Falcon*, New Jersey, USA). Luego, las células no adheridas (linfocitos) se descartaron a través de varios lavados y las células adheridas (monocitos) se incubaron en RPMI 1640 suplementado con 10 % SBF, 800 U/ml GM-CSF (*Sigma*

Chemical Co., MO, USA), 500 U/ml IL-4 (*Sigma Chemical Co.*, MO, USA), 2 mM L-glutamina, 20 µg/ml gentamicina y 50 µM 2-mercaptoetanol. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera con 5 % CO₂ durante 3–7 días.

DETERMINACIÓN DE LAS MOLÉCULAS POR INMUNOMARCACIÓN

La fluorescencia fue cuantificada por citometría de flujo mediante los citómetros FACStar^{plus} (*Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA*) o CYTORON (*Ortho Diagnosis, NJ, USA*). Las células necróticas fueron excluidas por la incorporación de yoduro de propidio. El análisis de las muestras se llevó a cabo empleando el programa de computación "WinMDI versión 2.8". En algunos casos las muestras fueron analizadas por microscopía confocal empleando el microscopio Zeiss LSM 510 (*Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania*).

Inmunofluorescencia simple indirecta

Las células fueron despegadas de la placa de Petri utilizando EDTA (0,04%). Posteriormente y previo a la adición de anticuerpos, se procedió a bloquear los sitios de unión inespecíficos con suero normal de cabra (10 %) por 20 minutos a 4°C. Luego, alícuotas de 2–3 x 10⁵ células fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos o los controles isotípicos a concentraciones saturantes en PBS/1 % BSA/0,1 % azida sódica por 45 minutos a 4°C. Al finalizar el período de incubación, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con ficoeritrina (RPE) (*DAKO, Dinamarca*) por 45 minutos a 4°C. Finalmente las células fueron lavadas con PBS–azida y resuspendidas en PBS.

Inmunofluorescencia intracitoplasmática

Para medir la expresión total de CD31 (intracelular + membrana=CD31t), las células fueron fijadas con 1 % de paraformaldehído frío y permeabilizadas con 0,5 % saponina (*Sigma*) en PBS–BSA (albúmina sérica bovina). Luego se procedió a utilizar el mismo protocolo descrito en la sección anterior.

Inmunofluorescencia doble

Luego de bloquear los sitios de unión inespecíficos con suero normal de cabra (20 minutos a 4°C), se procedió a la marcación celular colocando los anticuerpos de la siguiente manera: 1) primer anticuerpo ratón anti humano, 45 minutos a 4°C; 2) segundo anticuerpo (porción F(ab')₂) cabra anti ratón conjugado a RPE (DAKO, Dinamarca), 45 minutos a 4°C; 3) bloqueo de los sitios inespecíficos de unión con suero normal de ratón (1/10), 45 minutos a 4°C; 4) tercer anticuerpo ratón anti humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), 45 minutos a 4°C. Luego de cada incubación se realizaron lavados con PBS, 0,02 % azida, 0,5 % BSA.

Ensayos de internalización

Se realizó el protocolo de internalización que fuera descripto previamente por Céfaï y colaboradores, con algunas modificaciones[112]. Las células fueron incubadas con 10 % de suero normal de cabra por 20 minutos. Luego, para evaluar la internalización de PECAM-1/CD31, las células fueron incubadas con el anticuerpo 5H2 durante 15 a 120 minutos a 4°C o a 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con la solución A del *kit Fix and Perm* (Caltag, CA, USA). Alícuotas de estas células fueron permeabilizadas con la solución B del mismo kit. Luego ambos grupos de células, fijadas y fijadas/permeabilizadas fueron inmunomarcadas por 30 minutos a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con FITC (DAKO, Dinamarca). La inmunofluorescencia de las células fue analizada por microscopía confocal y citometría de flujo. La fluorescencia se calculó con la siguiente fórmula[109]: número de células con intensidad de fluorescencia mayor al Ac control (*background*) x la IFM de las células marcadas con Ac para CD31. Este protocolo nos permite analizar las moléculas de CD31 presentes en la superficie celular más las moléculas internalizadas (CD31i), cuando se examina la expresión sobre las células que fueron fijadas y posteriormente permeabilizadas. En cambio en el grupo de células que fueron fijadas pero no fueron permeabilizadas, se observan solamente las moléculas presentes en la superficie celular (CD31m).

Para analizar los mecanismos de endo y exocitosis, las células fueron tratadas durante 1 hora a 37°C con las siguientes drogas: brefeldina A (BFA 1 µg/ml), monensina (25 µM), citocalasina B (5 µg/ml) o cloroquina (50 µM). Todas estas

drogas fueron adquiridas en *Sigma Chemical Co.* Luego se procedió a realizar la inmunofluorescencia indirecta como se describió más arriba.

Microscopía Confocal

Las imágenes de color y de luz fueron adquiridas utilizando un microscopio Zeiss LSM 510 *microscope* (*Carl Zeiss Microscopy*, Jena, Alemania), con un objetivo C-apochromat 63x/1,2 W corr. El tamaño de la imagen fue de 1024 pixeles con una profundidad de 8 bits pixel. El tamaño del *pinhole* fue de 36 μm .

Cell Sorting

Se realizó el enriquecimiento de linfocitos CD31⁺ y de células de melanoma CD31⁺ utilizando un *cell sorter* FACStar^{plus} (*Becton Dickinson*, Mountain View, CA, USA). Para el primer caso, se obtuvieron células mononucleares humanas de sangre periférica aisladas por gradiente de Ficoll-Hypaque tal como fuera descripto en secciones previas. Posteriormente, se procedió a realizar la inmunomarcación doble con anti-CD3 FITC y anti-CD31 RPE. De esta manera fue posible separar dos poblaciones de linfocitos T: CD3⁺ CD31⁺ y CD3⁺ CD31⁻. A diferencia de los linfocitos, las células de melanoma CD31⁺, se enriquecieron realizando una inmunomarcación simple para CD31.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ADHESIÓN

Adhesión a proteínas de matriz extracelular

En microplacas de fondo plano se colocaron durante 18 horas a 4°C las siguientes matrices extracelulares: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FN purificada a partir de plasma humano (*Gibco*, NY, USA), Col tipo IV (*Gibco*, NY, USA), VN (*Gibco*, NY, USA), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LM (*Gibco*, NY, USA), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col tipo I (*Gibco*, NY, USA) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Matrigel (*BD Biosciences*, MA, USA). Transcurrido este período, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando las microplacas con 5 mg/ml de HSA (UNC Lab. de Hemoderivados, Córdoba, Argentina). Posteriormente, sobre las microplacas cubiertas con las proteínas de la matriz extracelular, se agregaron 30.000 células, resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml), y se incubó durante 30 minutos a 37°C en 5 % CO₂. Luego se retiraron las células no adheridas realizando cuatro lavados con RPMI 1640; mientras que las células adheridas a las proteínas de

matriz extracelular se despegaron utilizando una solución de 0,25 % tripsina (*Gibco BRL*, NY, USA) – 0,02% EDTA (*Farmitalia*, Milán, Italia). Una vez despegadas las células, la tripsina fue neutralizada utilizando medio 10 % SBF. La cuantificación de las células adheridas y no adheridas se realizó utilizando el citómetro de flujo “CYTORON” (*Ortho Diagnosis*, NJ, USA) y el programa de computación “Absoluto”. Este permite establecer regiones en base al tamaño (*forward scatter: FW-SC*) y a la granularidad (*side scatter: SSC* o *right angle scatter: RT-SC*) de las células.

Ensayos de adhesión a células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

Las células tumorales, mononucleares y PMNLs fueron marcadas con 25 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{51}Cr (Na_2CrO_4) (*Amersham Corp., Life Science*, USA) e incubadas a 37°C por 30 minutos. El ^{51}Cr libre fue eliminado mediante lavados y las células (50.000/pozo) fueron incubadas sobre monocapas de células endoteliales (30 minutos a 37°C en 5 % CO_2). Las células no adheridas fueron removidas y la monocapa fue lavada tres veces con RPMI 1640. Las células adheridas fueron lisadas. Finalmente, el número de células tumorales adheridas y no adheridas fue analizado a través de la medición de la radioactividad existente en cada alícuota en un contador gamma (*LKB Wallac 1272 Clinigamma, Pharmacia*, Inglaterra)

Bloqueo de la adhesión

Para caracterizar las moléculas involucradas en el mecanismo de adhesión de IIB-MEL-LES a matriz extracelular y a HUVEC, se emplearon anticuerpos bloqueantes para distintas moléculas de adhesión.

Las células tumorales, resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml), fueron previamente incubadas con concentraciones saturantes de los diferentes anticuerpos (20 $\mu\text{g/ml}$, 20 minutos a temperatura ambiente) y se colocaron en microplacas de cultivo cubiertas con las proteínas de MEC o con HUVEC respectivamente.

GENERACIÓN DE TRANSFECTANTES

Las células tumorales fueron transfectadas por el método de LipofectAMINE (LipofectAMINE PLUS Reagent, *Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA*). Las células fueron lavadas con medio libre de suero y luego incubadas con medio Opti-MEM (*Gibco*) conteniendo Lipofectina y los oligonucleótidos (20 μ M) por 4 horas a 37°C. Luego, el medio fue removido y reemplazado por el medio de crecimiento apropiado conteniendo la concentración de oligonucleótidos indicada previamente.

Oligonucleótidos

Una secuencia de 21-mer correspondiente a la secuencia antisentido que rodea al sitio de iniciación de la traducción del ARNm de PECAM-1 fue diseñada como fuera descrito previamente[64]. La secuencia de los oligonucleótidos fosforotioato fue la siguiente, con el codón de iniciación ATG subrayado:

antisentido PECAM-1: 5'-CCACCTCGGCTGCATCCTGAG-3' y

random oligo: 5'-ACCCCAGCTCAGCTCAGCTC-3'.

WESTERN BLOT

Las células fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con buffer de extracción conteniendo TBS 1x, inhibidor de proteasas 1x, CHAPS 1 % (*Sigma*). Luego de centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue removido y las proteínas cuantificadas por el método de Bradford con el kit de Micro BCA™ *Protein Assay Reagent Kit* (*Pierce, Rockford, IL, USA*). Las muestras fueron hervidas en buffer con dodecilsulfato de sodio (SDS) que contiene ditioneitol (DTT) (0,2 M) (*Sigma*) y analizadas por electroforesis en un gel de 6 % poliacrilamida en presencia de SDS. Luego de la electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa que fue incubada con un anticuerpo policlonal contra PECAM-1 (C-20, *Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*) y un segundo anticuerpo de conejo anti cabra conjugado a peroxidasa (*Jackson Immuno Research Inc., West Grove, PA, USA*). Finalmente fue revelado por quimioluminiscencia (*Amersham Corp., Arlington Heights, IL*).

ENSAYO DE CO-LIGACIÓN

Placas de cultivo celular de 96 fosas (*Nunc, Rochester, NY, USA*) fueron cubiertas con los anticuerpos 5H2, 7E4, β 1 integrina o Bi24 (20 μ g/ml) durante 12 horas a 4°C. Luego se eliminó el exceso de anticuerpo, lavando dos veces con PBS. Posteriormente, los pozos con los anticuerpos fueron incubados con HSA (5 mg/ml) a 37°C por 2 horas para bloquear los sitios inespecíficos. Finalmente, las células de melanoma o de adenocarcinoma fueron colocadas sobre cada fosa e incubadas durante 24 horas. Finalizado este período, se adicionó 1 μ Ci/pozo de 3 H-timidina (actividad específica 5 mCi/mMol, *Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA*), determinándose la proliferación celular mediante la cuantificación de la incorporación de 3 H-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo; utilizando un contador de centelleo líquido (1214 BETARACK, *Pharmacia, Inglaterra*).

ENSAYO DE APOPTOSIS

Para determinar la presencia de apoptosis de células de melanoma, se realizó una marcación con Annexina V conjugada a FITC e yoduro de propidio (*Oncogen Research Products, MA, USA*) según el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, luego de lavar las células con PBS, se incubaron con Annexina V-FITC (0,5 μ g/ml, 15 minutos a temperatura ambiente). A continuación se agregó yoduro de propidio e inmediatamente se analizó la fluorescencia en el citómetro de flujo CYTORON (*Ortho Diagnosis, NJ, USA*).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Porcentaje de células adheridas

⇒ Para la adhesión a proteínas de MEC:

$$\% \text{ de cel adheridas} = \frac{\text{nº cel adheridas a MEC}}{\text{nº cel colocadas}} \times 100$$

⇒ Para la adhesión a HUVEC:

$$\% \text{ de cel adheridas} = \frac{\text{cpm adheridas a HUVEC}}{\text{cpm colocadas}} \times 100$$

Porcentaje de inhibición de la adhesión

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{cel adheridas} - \text{cel adheridas tratadas})}{\text{cel adheridas}} \times 100$$

Índice de proliferación

$$\text{índice} = \frac{\text{cpm tratamiento}}{\text{cpm control}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA y para la comparación entre medias se utilizaron los test *post hoc Student Newman Kules*, Dunnett o Bonferroni según se indica en la leyenda de las figuras. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$ (*) y como altamente significativo los valores de $p < 0,01$ (**).

ANTICUERPOS MONOCLONALES

En la tabla II se enumeran los anticuerpos (Ac) utilizados en este trabajo de tesis y sus características.

Nombre	Especificidad	Isotipo	Especie	Procedencia
W6/32	MHC clase I	IgG2a	ratón	ATCC
SK7	CD3	IgG1	ratón	BD Biosciences
84H10	CD54 (ICAM-1)	IgG1	ratón	Immunotech
2G7	CD106 (VCAM-1)	IgG1	ratón	(1)
UJ13A	CD56 (NCAM)	IgG2a	ratón	DAKO
HP2B6-1-2	CD49a ($\alpha 1$ integrina)	IgG1	ratón	(1)
Gi9	CD49b ($\alpha 2$ integrina)	IgG1	ratón	Beckman Coulter
ASC-2	CD49b ($\alpha 2$ integrina)	IgG2a	ratón	(1)
ASC-5	CD49c ($\alpha 3$ integrina)	IgG1	ratón	(1)
HP2/1	CD49d ($\alpha 4$ integrina)	IgG1	ratón	Immunotech
VC5	CD49e ($\alpha 5$ integrina)	IgG1k	ratón	(1)
SAM1	CD49e ($\alpha 5$ integrina)	IgG2b	ratón	Immunotech
4F10	CD49f ($\alpha 6$ integrina)	IgG2b	ratón	AMS Biotechnol
23C6	CD49v (αv integrina)	IgG1	ratón	DAKO
Lia _	CD29 ($\beta 1$ integrina)	IgG1	ratón	Immunotech
TS1/18	CD18 ($\beta 2$ integrina)	IgG1	ratón	ATCC
PM6/13	CD61 ($\beta 3$ integrina)	IgG1	ratón	AMS Biotechnol
158-2B3	CD31 (PECAM-1) Dom1	IgG1	ratón	(2)
PECAM1.3	CD31 (PECAM-1) Dom1	IgG1	ratón	(4)
Hec7	CD31 (PECAM-1) Dom2	IgG2a	ratón	(1)
5H2	CD31 (PECAM-1) Dom3	IgG2a	ratón	(6)
7E4	CD31 (PECAM-1) Dom3	IgG2a	ratón	(3)
1B5	CD31 (PECAM-1) Dom4-5	IgG1	ratón	(3)
PECAM1.1	CD31 (PECAM-1) Dom5	IgG2a	ratón	(4)
PECAM1.2	CD31 (PECAM-1) Dom6	IgG1	ratón	(4)
4G6	CD31 (PECAM-1) Dom6	IgG1	ratón	(1)
Moon-1	CD31 (PECAM-1)	IgG1	ratón	(1)
RB10	CD31 (PECAM-1)	IgG	ratón	(1)
V21	CD31 (PECAM-1)	IgG2a	ratón	(1)
Sc-1505	CD31 (PECAM-1)	Policlonal	cabra	Santa Cruz
X0931		IgG1	ratón	DAKO
X0943		IgG2a	ratón	DAKO
X0927		IgG1-FITC	ratón	DAKO
X0944		IgG2b	ratón	DAKO
Bi24	Lumazina Synthasa	IgG2a	ratón	(5)
R0480	RPE		cabra	DAKO
R0479	FITC		cabra	DAKO

Tabla II: Anticuerpos utilizados

(1) VIth *International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigen* (Tokio, 1996)

(2) Provisto por el Dr. Ramón Vilella, Servei de Immunologia, Barcelona, España.

(3) Provisto por el Dr. Walter Knapp, Instituto de Inmunología, Universidad de Viena, Austria.

(4) Provisto por el Dr. Peter Newman, *Blood Center of Southeastern Wisconsin*, Milwaukee, USA.

(5) Provisto por el Dr. Carlos Fossati, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina.

(6) El híbrido 5H2 fue generado por fusión de células esplénicas de ratones BALB/c inmunizados con PMNLs humanos purificados con el mieloma P3U1[120]. El anticuerpo monoclonal 5H2 (IgG2a) fue utilizado como ascitis o como sobrenadante de cultivo. La caracterización del mismo se realizó con células transfectadas con distintos dominios para CD31 en el laboratorio del Dr. Muller (*Weill Medical College of Cornell University*, New York, USA).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE PECAM-1/CD31

La capacidad metastásica de las células tumorales está determinada en parte por las moléculas de adhesión presentes sobre la superficie de las mismas. Entre ellas PECAM-1/CD31 es una molécula de adhesión inflamatoria presente en células provenientes del linaje hematopoyético[121]. Su expresión en células tumorales no ha sido exhaustivamente analizada, por ello, se decidió examinar y comparar la expresión de CD31 sobre la superficie de distintos tipos de células tumorales y normales. En la figura 9 se observa, a través de la inmunofluorescencia indirecta, la expresión de CD31 sobre las líneas de células de melanoma (IIB-MEL-LES y IIB-MEL-J), de adenocarcinoma HCT-116, de HUVEC, de PMNLs y de DC. A diferencia de lo ya descrito para las células endoteliales, la expresión de PECAM-1/CD31 sobre IIB-MEL-LES (figura 9 A), IIB-MEL-J (figura 9 C) y HCT-116 (figura 9 B) fue muy baja. Esta baja expresión contrasta con la expresión observada sobre las HUVEC (figura 9 D), los PMNLs (figura 9 E) y las DC (figura 9 F).

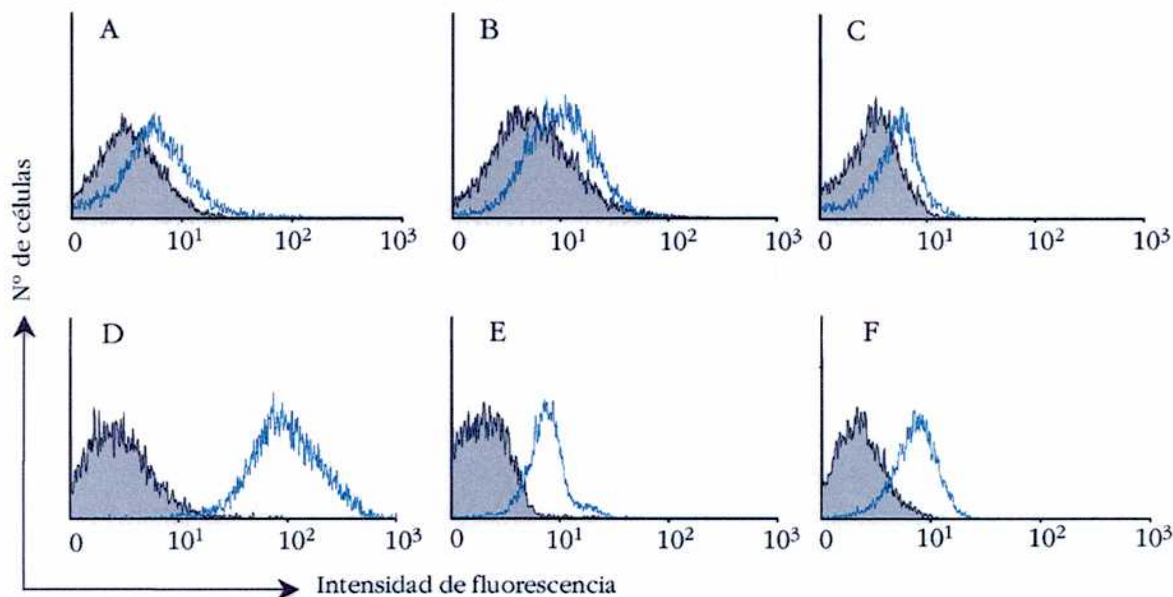


Figura 9: Expresión de CD31 en IIB-MEL-LES (A), HCT-116 (B), IIB-MEL-J (C), HUVEC (D), PMNLs (E) y DC (F)

Se realizó inmunofluorescencia indirecta para CD31 y se analizó por citometría de flujo como se describe en materiales y métodos.

En cada gráfico se representa la intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de siete para CD31 (histograma azul) superpuestas con el control negativo correspondiente (histograma gris). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio.

Para corroborar la presencia de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales se procedió a estudiar la expresión total de la proteína realizando un *Western blot* para las líneas tumorales IIB-MEL-LES y HCT-116, y para HUVEC. En la figura 10 se observa que todas las células examinadas presentan una banda de 130 kDa compatible con CD31. Sin embargo, la expresión de PECAM-1/CD31 en las células tumorales fue mucho menor en comparación con la banda presente en la calle correspondiente a las HUVEC. Entre las líneas celulares tumorales, la expresión total de PECAM-1/CD31 sobre las HCT-116 fue de menor intensidad que la de IIB-MEL-LES.

Es importante señalar la presencia de una banda de menor peso molecular en las calles de HUVEC y IIB-MEL-LES sembradas con mayor cantidad de proteína (50 μ g). Estas bandas, de bajo peso molecular, fueron descriptas previamente y han sido atribuidas a productos de la degradación proteica[60].

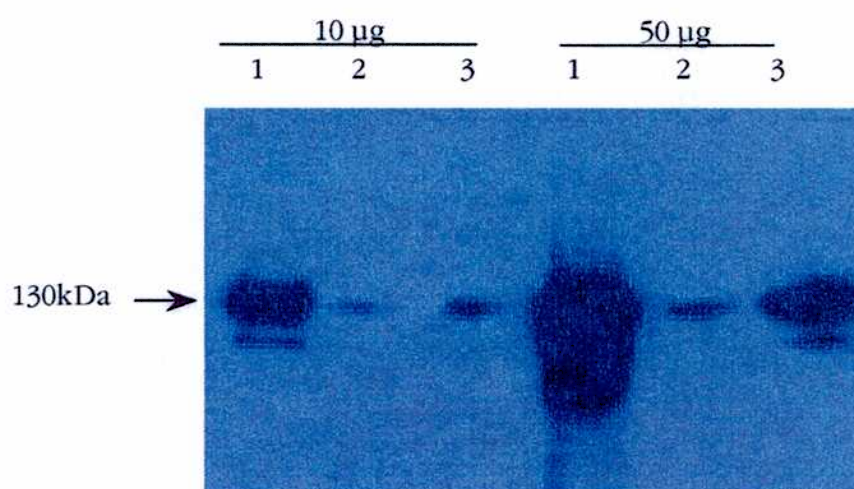


Figura 10: Western Blot para PECAM-1

Identificación de CD31 por *Western Blot* en HUVEC (calle 1), HCT-116 (calle 2) y IIB-MEL-LES (calle 3). Lisados celulares con cantidades equivalentes de proteína (10 y 50 μ g/calle) fueron separados en un gel 6 % SDS-PAGE y revelados por quimioluminiscencia. La banda de 130 kDa correspondiente a CD31 se indica con una flecha. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Como fue mencionado en la introducción, PECAM-1/CD31 presenta seis dominios extracelulares, algunos de los cuales se encuentran altamente glicosilados. Estos dominios extracelulares pueden ser detectados utilizando Ac monoclonales dirigidos contra epitopes localizados en cada uno de los seis dominios de PECAM-1/CD31. Con la intención de determinar la capacidad de estos anticuerpos de reconocer a cada uno de los dominios de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales, se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos monoclonales 2B3, hec7, 7E4, 1B5, 4G6 que reconocen a los dominios 1, 2, 3, 4-5 y 6 respectivamente. En la figura 11 se observa que los Ac dirigidos contra los dominios 1, 3, 4 y 5 son capaces de reconocer PECAM-1/CD31 en la superficie de las células tumorales, en las HUVEC y en los leucocitos. Sin embargo, los Ac contra los dominios 2 (hec7) y 6 (4G6) no fueron capaces de unirse a los mismos en las células de melanoma, a pesar de reconocer a los dominios de PECAM-1/CD31 presentes sobre HUVEC, linfocitos y PMNLs.

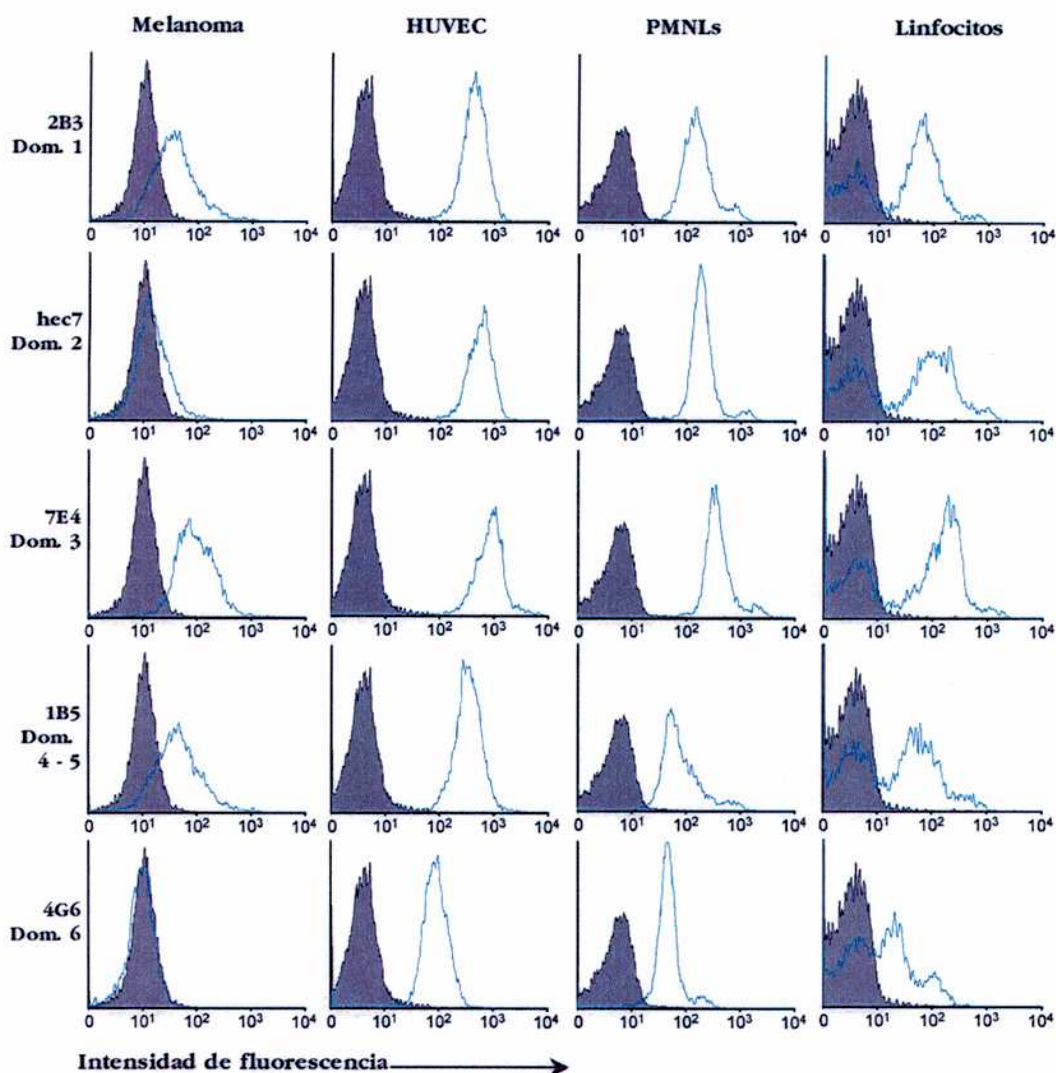


Figura 11: Reactividad de los Ac monoclonales dirigidos contra los diferentes dominios de PECAM-1 sobre IIB-MEL-LES, HUVEC, PMNLs y linfocitos

Se realizó inmunofluorescencia indirecta con los Ac monoclonales 158-2B3 (dominio 1), hec7 (dominio 2), 7E4 (dominio 3), 1B5 (dominio 4-5), 4G6 (dominio 6) y se analizó la intensidad de fluorescencia media por citometría de flujo. Los histogramas sombreados representan el control isotípico. Resultados similares se obtuvieron en otros dos experimentos.

La interacción entre la célula tumoral y el endotelio es clave en el proceso de crecimiento tumoral, invasión local y metástasis. La formación de un foco metastásico depende, en parte, de la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular. Dada la expresión de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales y en virtud del rol de PECAM-1/CD31 en la migración de leucocitos (en particular el dominio 1 y 2)[66], se examinó la participación de PECAM-1/CD31 en la interacción de las células tumorales y leucocitarias con el endotelio. Utilizando Ac

monoclonales bloqueantes se realizaron ensayos de adhesión de estas células a HUVEC. En la figura 12 se observa que el porcentaje de células tumorales adheridas a HUVEC es mayor que el de leucocitos y que Ac dirigidos contra los dominios 1 (2B3), 3 (5H2 o 7E4) y 4-5 (1B5) bloquean parcialmente la adhesión de IIB-MEL-LES a endotelio. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos bloqueó la adhesión de PMNLs al endotelio. En cambio, la adhesión de monocitos a HUVEC fue parcialmente bloqueada utilizando un anticuerpo dirigido contra el dominio 6.

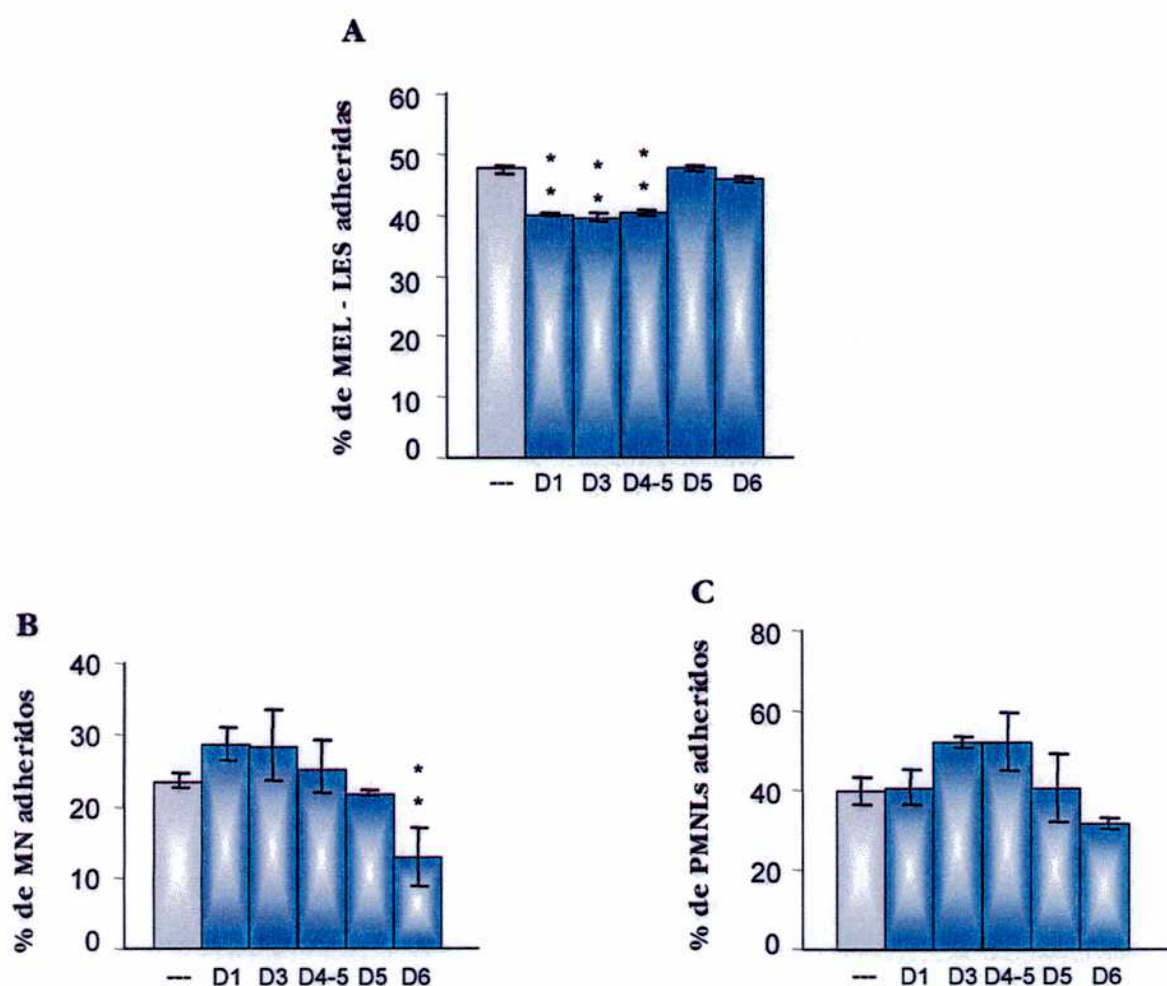


Figura 12: Adhesión de IIB-MEL-LES (A), monocitos (B) y PMNLs (C) a HUVEC

Las células marcadas con ^{51}Cr e incubadas con anticuerpos bloqueantes dirigidos contra los diferentes dominios de PECAM-1, se colocaron (5×10^4) sobre monocapas de HUVEC. Luego de 40 minutos a 37°C se recuperaron las células adheridas y no adheridas. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas con respecto a las colocadas inicialmente. Cada barra del gráfico representa la media $\pm$ ES de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ con respecto al control, el análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Dunnett.

El rol de PECAM-1/CD31 en la interacción entre las células tumorales y las HUVEC fue corroborado disminuyendo los niveles de PECAM-1/CD31 a través de la transfección transiente de la línea IIB-MEL-LES con un oligonucleótido antisentido para CD31. En la figura 13 se observa que las células de melanoma y HUVEC transfectadas con dicho oligonucleótido presentan una menor expresión de PECAM-1/CD31 en la superficie celular. Esta disminución de la expresión fue específica para PECAM-1/CD31 ya que otra molécula de adhesión (ICAM-1/CD54) no se vio afectada por el tratamiento con el oligonucleótido antisentido.

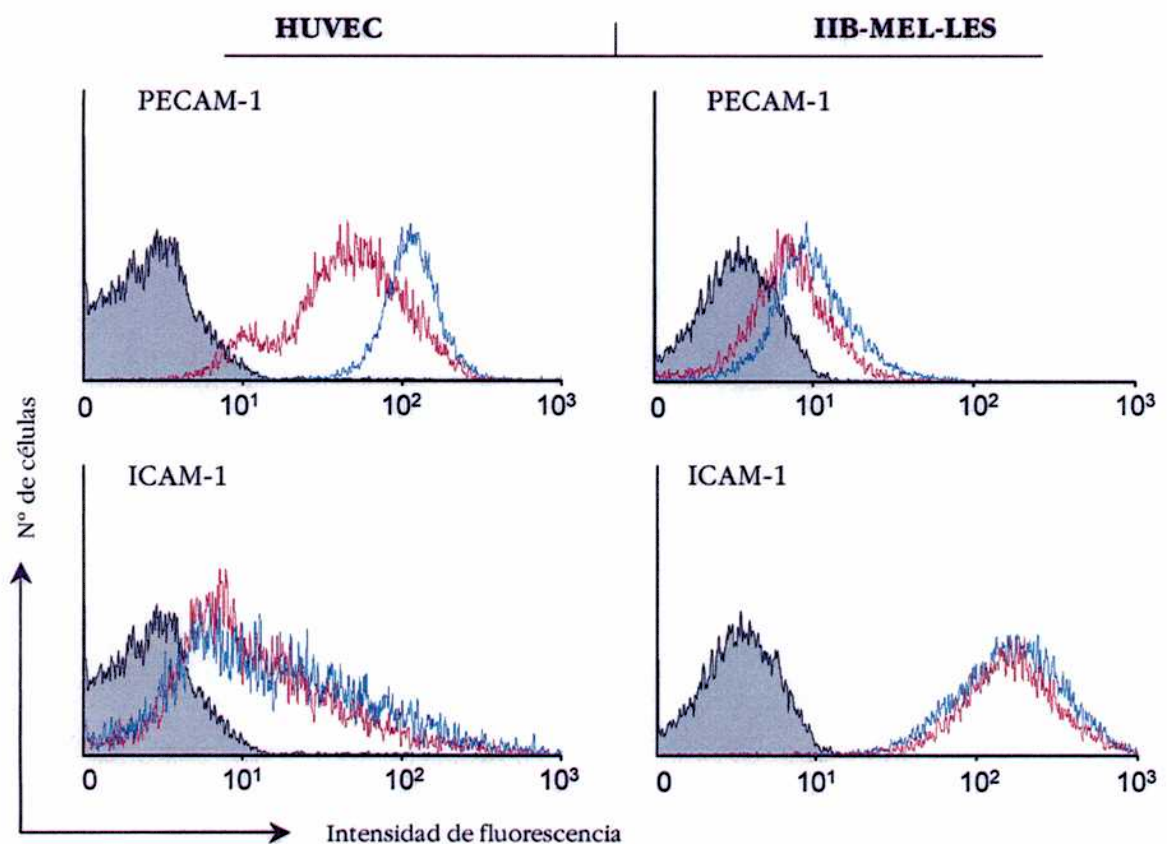


Figura 13: Efecto de la transfección sobre la expresión de PECAM-1

Expresión de las moléculas de adhesión (PECAM-1 e ICAM-1) en la línea celular IIB-MEL-LES y HUVEC transfectadas con un oligonucleótido antisentido para PECAM-1.

En cada gráfico se representa la intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de dos en células transfectadas con el oligonucleótido antisentido para PECAM-1 (rojo) y con el oligonucleótido control (azul) superpuestas con el control negativo correspondiente (gris). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio.

Cabe mencionar que el mismo grado de inhibición se obtuvo al transfectar a células endoteliales. Sin embargo, a diferencia de las células tumorales las células endoteliales transfectadas perdieron su capacidad de formar una monocapa. De esta manera fue imposible evaluar la participación de PECAM-1/CD31 endotelial en la adhesión de las células tumorales a HUVEC. Por lo tanto sólo se evaluó la adhesión de la célula tumoral transfectada con el oligonucleótido antisentido sobre las células endoteliales no transfectadas. En la figura 14 se observa que la adhesión al endotelio de las células IIB-MEL-LES transfectadas con el oligonucleótido antisentido fue menor comparada con las células tumorales transfectadas con un oligonucleótido control.

Como se observó en la figura 9, los niveles de expresión de PECAM-1/CD31 en distintas líneas celulares de melanoma es diferente. Por ejemplo, la línea de melanoma IIB-MEL-J presenta niveles de CD31 similares a las IIB-MEL-LES transfectadas con el oligonucleótido antisentido. En la figura 15 se observa que la adhesión al endotelio de la línea IIB-MEL-J fue menor a la adhesión de las IIB-MEL-LES.

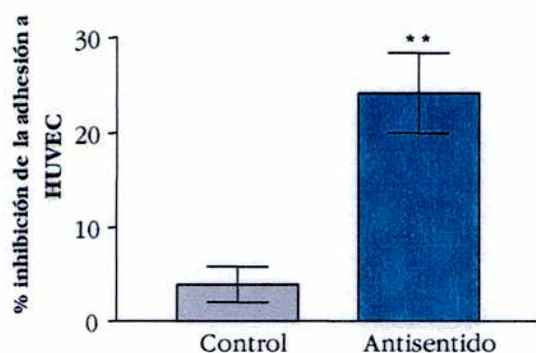


Figura 14: Adhesión de las células de melanoma IIB-MEL-LES transfectadas con el oligonucleótido antisentido o con el control a HUVEC

Se colocaron 5×10^4 células sobre monocapa de HUVEC y posteriormente se recuperaron las células adheridas y no adheridas. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de la adhesión a HUVEC. El gráfico representa la media $\pm$ ES de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ comparado con células control, análisis Student Newman Kules.

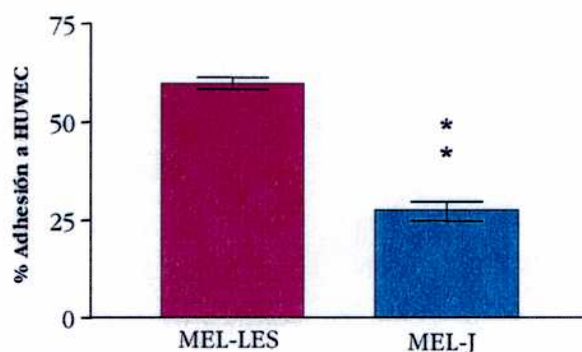


Figura 15: Adhesión de las líneas tumorales IIB-MEL-LES y IIB-MEL-J a HUVEC

Se colocaron 5×10^4 células sobre monocapas de HUVEC. Luego de 30 minutos a 37°C se recuperaron las células adheridas y las no adheridas. Se graficó el porcentaje de adhesión a HUVEC. Cada barra del gráfico representa la media $\pm$ ES de un experimento representativo de dos. ** $p < 0.01$ empleando el test de Bonferroni.

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

Como se mencionó en la introducción, la expresión de PECAM-1/CD31 sobre el endotelio y los leucocitos es constitutiva y no se modifica mayormente por la acción de diferentes factores. Sin embargo, el comportamiento de PECAM-1/CD31 en las células tumorales podría ser modulado por diversos factores, como ser el contacto célula-célula, el cambio de pH, la presencia de factores de crecimiento y de citoquinas, entre otros.

En primer lugar se examinó el efecto de los cambios de pH extracelular sobre la expresión de PECAM-1/CD31 en las células de melanoma. Una de las maneras de cambiar el pH en los cultivos celulares es modificando la concentración de CO₂ de los mismos. En la figura 16, se observa que las células tumorales incubadas en una atmósfera con 15% de CO₂ (pH 5,5) presentan una leve disminución en la expresión de PECAM-1/CD31 con respecto a las células cultivadas en una atmósfera con 5% de CO₂ (pH 7,2).

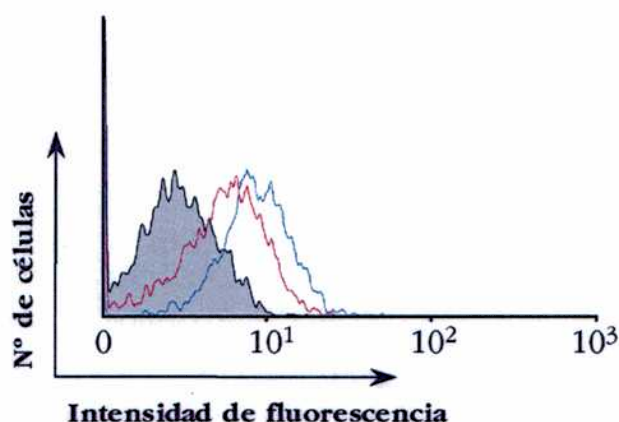


Figura 16: Efecto del pH sobre la expresión de PECAM-1 en IIB-MEL-LES

Se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta para PECAM-1 en células IIB-MEL-LES cultivadas en una atmósfera con 15% (histograma rojo) 0,5 % (histograma azul) de CO₂. El control negativo para ambos grupos se representa con un histograma gris. La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio. Se muestra un experimento representativo de tres.

Los factores de crecimiento regulan una variedad de genes asociados con estados patológicos incluidos la invasión tumoral y la metástasis. Entre ellos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), cuyo receptor se encuentra sobre las células de melanoma. Para evaluar la capacidad del EGF para modular la expresión de PECAM-1/CD31 sobre las IIB-MEL-LES, estas células fueron crecidas en presencia o ausencia de este factor de crecimiento. La expresión de PECAM-1/CD31 en las células tumorales fue mayor en presencia de EGF comparadas con las células cultivadas en ausencia de EGF (figura 17 A). Un efecto similar se observó en las células endoteliales (figura 17 B).

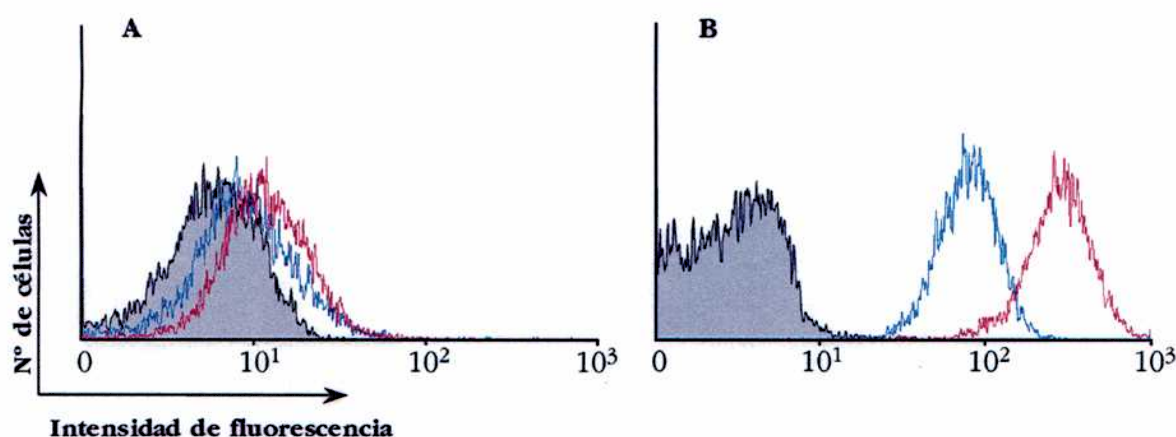


Figura 17: Efecto del EGF sobre la expresión de PECAM-1 en IIB-MEL-LES (A) y en HUVEC (B)

Se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta según se describe en materiales y métodos. En el gráfico se representa la expresión para PECAM-1 en células crecidas en presencia (histograma rojo) o ausencia (histograma azul) de EGF y el control negativo para ambos grupos (histograma gris). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio. El mismo resultado se obtuvo en otros dos experimentos independientes.

El contacto célula-célula puede modificar la expresión de las moléculas de superficie. Para estudiar específicamente el efecto del contacto célula-célula sobre la expresión de PECAM-1/CD31, el siguiente paso fue analizar la expresión de la molécula en los cultivos de células de melanoma IIB-MEL-LES en condiciones de confluencia o sub-confluencia. En la figura 18 (A), se observa que las IIB-MEL-LES provenientes de los cultivos confluentes presentan una menor expresión de PECAM-1/CD31 comparada con las células provenientes de los cultivos subconfluentes. Este efecto del contacto célula-célula sobre la expresión de PECAM-1/CD31 fue corroborado al examinar la expresión de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales desprendidas espontáneamente de una monocapa

confluente (aproximadamente un 10 % del total de las células cultivadas se desprenden espontáneamente en el período de 24 horas). En estas células se observó una mayor expresión de PECAM-1/CD31 comparadas con las células adheridas a la monocapa celular (figura 18 B).

El efecto del contacto célula-célula sobre la expresión de PECAM-1/CD31 fue específico para las células de melanoma, ya que no se observó en las HUVEC (figura 18 C).

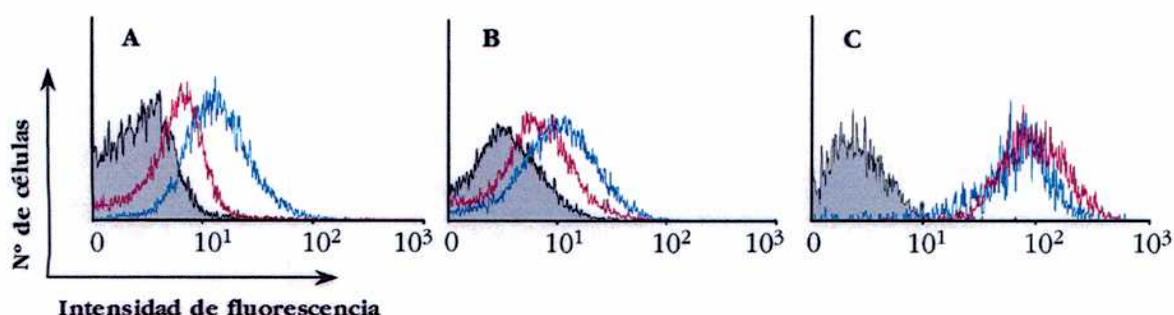


Figura 18: Efectos del contacto célula-célula en la expresión de PECAM-1

(A) IIB-MEL-LES proveniente de cultivos confluentes (línea roja) o subconfluentes (línea azul) fueron inmunomarcadas con el Ac 5H2 dirigido contra el dominio 3.

(B) IIB-MEL-LES desprendidas espontáneamente (línea azul) de una monocapa confluyente (línea roja) fueron inmunomarcadas con el Ac 5H2. La intensidad de fluorescencia media fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas por incorporación de yoduro de propidio.

(C) HUVEC proveniente de cultivos confluentes (línea roja) o subconfluentes (línea azul) fueron inmunomarcadas con el Ac 5H2 dirigido contra el dominio 3. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes

Las diferencias en la expresión de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales derivadas de monocapas confluentes y subconfluentes podrían también manifestarse en la capacidad de adhesión de estas sobre las células endoteliales. En la figura 19, se observa que las células tumorales provenientes de los cultivos subconfluentes (con mayor expresión de PECAM-1/CD31) presentan una mayor adhesión a las monocapas de células endoteliales comparadas con la adhesión de las células tumorales derivadas de monocapas confluentes (con menor expresión de PECAM-1/CD31).

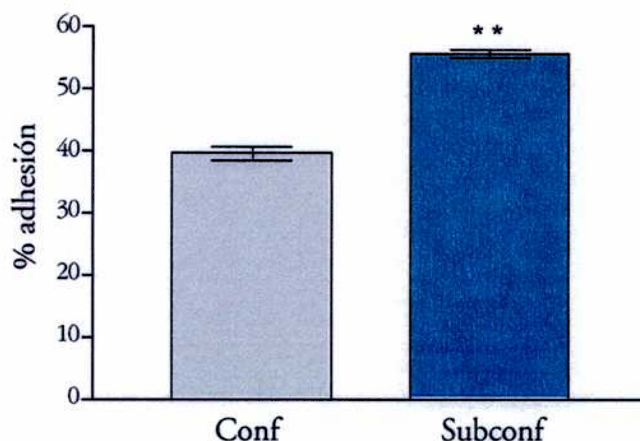


Figura 19: Adhesión de la línea tumoral IIB-MEL-LES a HUVEC

Las células tumorales derivadas de cultivos confluentes y sub-confluentes fueron marcadas con ^{51}Cr e incubadas sobre monocapas de HUVEC. Luego de 40 minutos a 37°C se recuperaron las células adheridas y no adheridas. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas con respecto a las colocadas inicialmente. Los datos representan la media $\pm$ ES de tres experimentos. $**p < 0.01$, análisis *Student Newman Kules*.

EXPRESIÓN DE CD31 CITOPASMÁTICO

Es bien conocido que muchas de las moléculas de adhesión, entre ellas PECAM-1/CD31, son clivadas por acción de la tripsina. Por ello, en los experimentos descriptos hasta ahora, las células adherentes eran despegadas con EDTA (0,04 %). La utilización de tripsina en lugar de EDTA, provocó la desaparición de la expresión superficial de PECAM-1/CD31 tumoral (Figura 20 A). Cuando se analizó la expresión de las proteínas totales de PECAM-1/CD31 a través de la realización de un ensayo de *Western blot*, también se pudo comprobar una banda de menor intensidad en la calle 2 correspondiente a las células levantadas con tripsina comparada con la calle 3 de células levantadas con EDTA (figura 20 B).

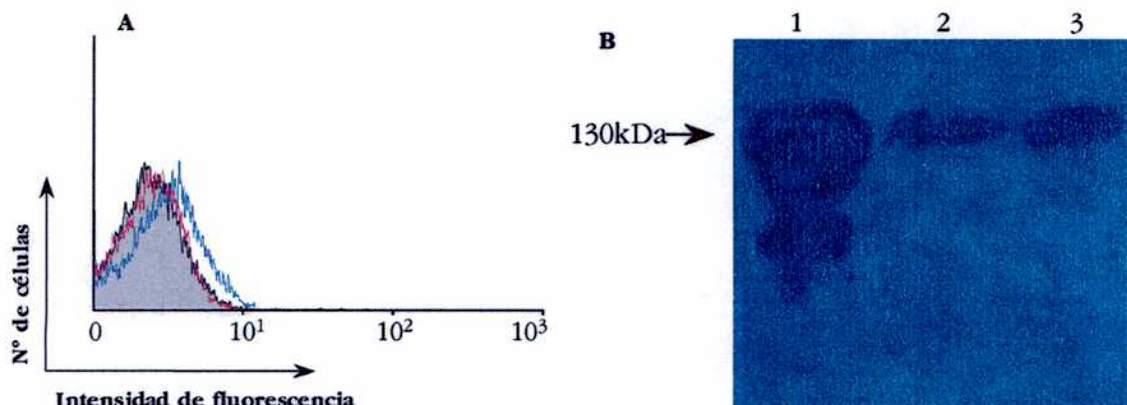


Figura 20: Expresión de PECAM-1 en células IIB-MEL-LES tratadas con tripsina o con EDTA

A) Se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta para PECAM-1. En el gráfico se representa la expresión para PECAM-1 en células levantadas con tripsina (histograma rojo) o con EDTA (histograma azul) y el control negativo para ambos grupos (gris). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio.

B) Western blot para PECAM-1 en células levantadas con tripsina y con EDTA.

Lisados celulares de células levantadas con tripsina (calle 2) y con EDTA (calle 3), con cantidades equivalentes de proteína fueron separados en 6 % SDS-PAGE y revelados por quimioluminiscencia. Se utilizaron células endoteliales como control positivo (calle 1). La banda de 130 kDa correspondiente a CD31 se indica con una flecha. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La presencia de la banda de PECAM-1/CD31 en la calle 2, sugería la existencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31. Para corroborar la presencia de estos reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta simple sobre las células de melanoma fijadas y fijadas/permeabilizadas. En la figura 21 A, se observa que solo la fijación de las células de melanoma con 1 % de para-formaldehído, provocó un aumento en la expresión de PECAM-1/CD31. Además cuando las células fueron permeabilizadas, la expresión de PECAM-1/CD31, pero no la expresión de α_4 integrina (figura 22), fue aún mayor que en las células fijadas (figura 21 B). En conjunto estos resultados sugerirían la presencia de un reservorio intracelular de PECAM-1/CD31. Es importante señalar que estos cambios en la expresión de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales fijadas y fijadas/permeabilizadas no se observaron sobre las células endoteliales (no mostrado) y tampoco se observaron reservorios intracelulares en fibroblastos humanos (figura 23).

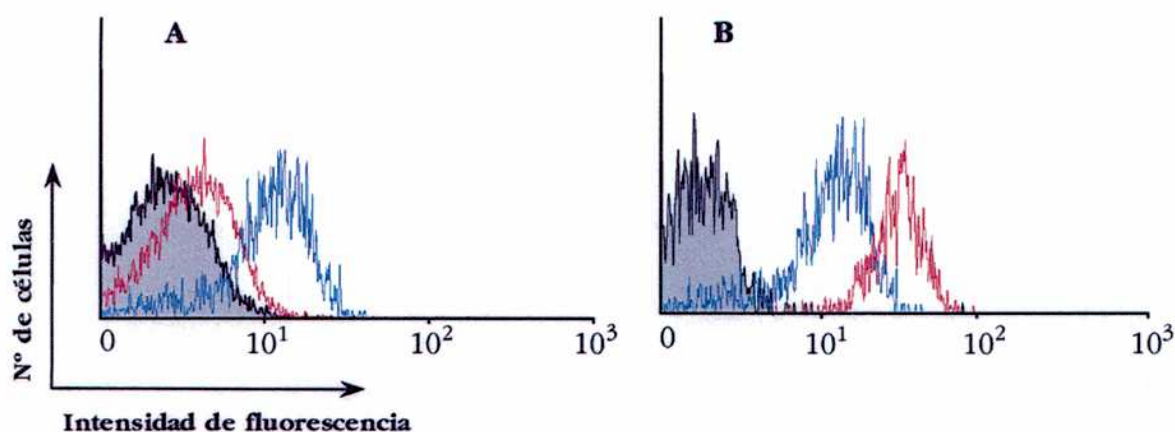


Figura 21: Expresión de PECAM-1 en superficie y total en células IIB-MEL-LES

(A) Expresión de CD31 en la superficie de células de melanoma fijadas (línea azul) o sin fijar (línea roja) y el control negativo para ambos grupos (gris). Se realizó una inmunofluorescencia indirecta con el Ac 5H2 sobre células sin fijar o fijadas con 1% paraformaldehído.

(B) Expresión total de PECAM-1 en células de melanoma. Las células fueron fijadas (línea azul) o fijadas y permeabilizadas (línea roja) con 0,5% saponina y marcadas con Ac 5H2 como se describe en materiales y métodos. El control negativo para ambos grupos (gris). La intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de tres se analizó por citometría de flujo.

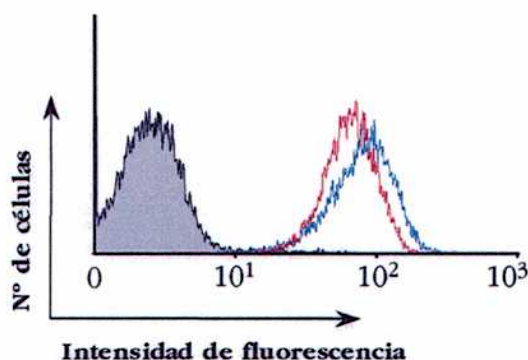


Figura 22: Expresión total de α_4 integrina en células de melanoma

Las células fueron fijadas (línea azul) o fijadas y permeabilizadas (línea roja) con 0,5 % saponina y marcadas como se describe en materiales y métodos. El control negativo para ambos grupos se encuentra representado en el histograma gris. La intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de dos se analizó por citometría de flujo.

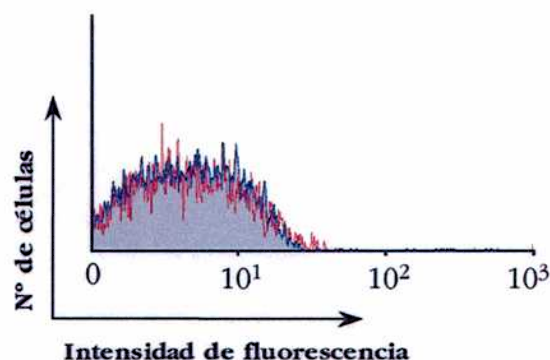


Figura 23: Ausencia de expresión de PECAM-1 en fibroblastos

Las células fueron fijadas (línea azul) o fijadas y permeabilizadas (línea roja) con 0,5 % saponina y marcadas con Ac 5H2 como se describe en materiales y métodos. El control negativo para ambos grupos se encuentra representado en el histograma gris. La intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de dos se analizó por citometría de flujo.

La presencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en las células tumorales fue confirmada mediante el análisis por microscopía confocal. Las

células tumorales fijadas presentaron una distribución heterogénea de la molécula sobre la superficie de las células (figura 24 A). Mientras que en las células fijadas y permeabilizadas se observó la presencia de depósitos intracelulares de PECAM-1/CD31 (figura 24 B-F).

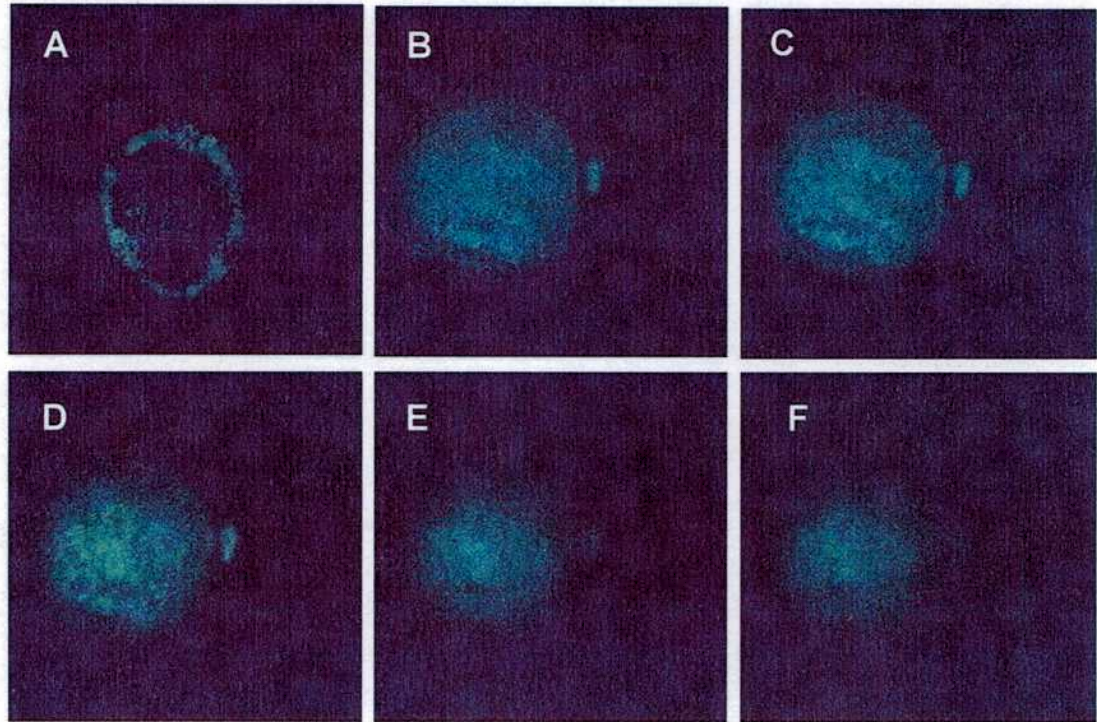


Figura 24: Imágenes de la expresión de CD31 en células de melanoma fijadas y fijadas/permeabilizadas

(A) Expresión en superficie de CD31 en las células fijadas y marcadas con el Ac 5H2.

(B-F) Expresión total de CD31 en las células de melanoma fijadas y permeabilizadas y posteriormente marcadas con 5H2 como se describe en materiales y métodos. Las marcación fue examinada por microscopía confocal. Las imágenes representan diferentes planos de las células marcadas.

Los niveles de expresión de PECAM-1/CD31 podrían ser modulados por mecanismos de internalización y exocitosis. Para determinar la presencia de mecanismos de endocitosis para PECAM-1/CD31, se realizó un protocolo previamente descrito por otros autores[112]. Este protocolo consiste en incubar a las células con el Ac, en este caso para PECAM-1/CD31 (5H2) a dos temperaturas distintas (37°C y 4°C) durante un lapso de tiempo variable (15-120 minutos). Luego se procede a fijar y fijar/permeabilizar a las células, quedando de esta manera constituidos dos grupos de células (para cada tiempo y para cada temperatura): fijadas y fijadas/permeabilizadas. Posteriormente, ambos grupos son incubados con

un segundo anticuerpo capaz de reaccionar contra el anticuerpo para CD31, conjugado con el fluorocromo. De esta manera, la fluorescencia en las células fijadas representa el complejo CD31–anticuerpo que queda en la superficie luego del período de incubación (CD31m), mientras que la fluorescencia en las células fijadas/permeabilizadas refleja el CD31 que se encuentra en la membrana más el complejo CD31–anticuerpo internalizado (CD31i).

En la tabla III se observa que, bajo estas condiciones, la expresión de CD31m en IIB-MEL-LES y HCT-116 y linfocitos, pero no en HUVEC, fue mayor a 4°C que a 37°C, sugiriendo la presencia de endocitosis en células de melanoma, adenocarcinoma y linfocitos pero no en HUVEC. El análisis de la expresión de CD31i (células fijadas/permeabilizadas) no mostró diferencias significativas para HUVEC, linfocitos ni HCT-116 a las diferentes temperaturas examinadas. Sin embargo, imprevistamente, la expresión de CD31i para las células de melanoma fue mayor a 4°C comparado con las incubadas a 37°C. Este resultado pondría en duda la existencia de un mecanismo de reciclaje, pero también podría ser consecuencia de la cinética de reciclaje de la molécula.

	Células ^a	Temperatura de Incubación		P	N
		37°C	4°C		
CD31m	MEL-LES	239 ± 73 ^b	406 ± 108	0.0305*	5
	HCT-116	363 ± 167	592 ± 178	0.0480*	5
	HUVEC	1819 ± 235	2080 ± 134	0.0577	4
	LINFOCITOS	653±61	720±57	0.0372*	2
CD31i	MEL-LES	246 ± 62	425 ± 116	0.0323*	5
	HCT-116	461 ± 167	492 ± 165	0.6160	5
	HUVEC	1475 ± 428	1937 ± 213	0.2521	4
	LINFOCITOS	659±186	386±12	0.4010	2

Tabla III: Expresión de CD31 a 4°C y 37°C

A) Las células indicadas fueron incubadas con Ac 5H2 durante 60 minutos a la temperatura indicada previo a la fijación (CD31m) o fijación + permeabilización (CD31i); posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo conjugado con FITC B) Los valores representan la intensidad de fluorescencia media ± DS de los experimentos indicados (N). *p < 0,05.

Para establecer fehacientemente o descartar la existencia de reciclaje para PECAM-1/CD31 en las células de melanoma, se procedió a realizar un estudio cinético de la internalización del anticuerpo. En la figura 25, se observa que la expresión de CD31m en IIB-MEL-LES a 4°C, fue mayor para cada tiempo analizado comparado con la expresión a 37°C. Sin embargo, la expresión de CD31i a 37°C fue mayor a los 15 y 120 minutos. Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis por microscopía confocal de las células (figura 25 C) y sugieren la presencia de un mecanismo de reciclaje para la molécula PECAM-1/CD31 en las células IIB-MEL-LES.

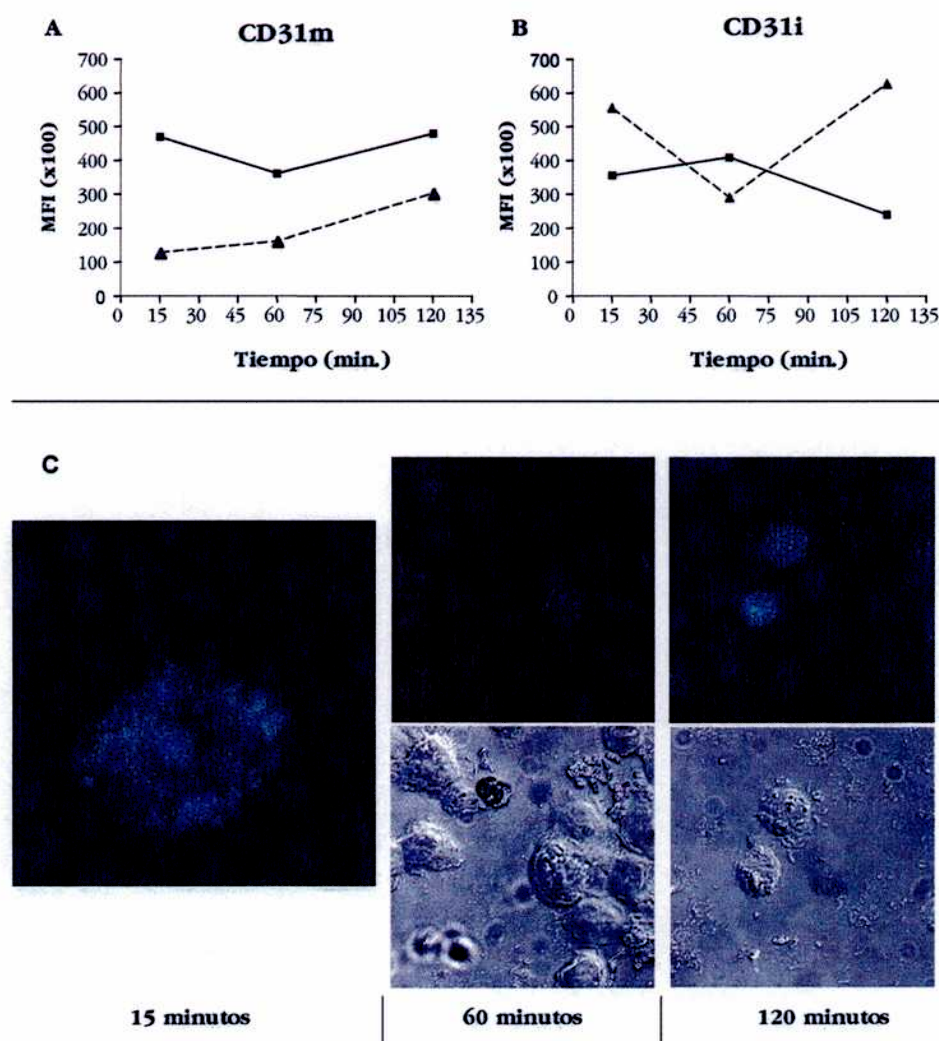


Figura 25: Internalización de PECAM-1 inducida por la unión del anticuerpo 5H2

Los complejos PECAM-1/Ac sufren un proceso de internalización tiempo-dependiente.

IIB-MEL-LES fueron incubadas a 37°C (línea punteada) o a 4°C (línea llena) en presencia del Ac 5H2.

Luego de los tiempos indicados, se tomaron alícuotas que fueron fijadas (A) o fijadas/permeabilizadas (B). Posteriormente, las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con FITC y analizadas por citometría de flujo. Bajo estas condiciones, la fluorescencia presente en las células fijadas refleja la expresión en superficie de PECAM-1(CD31m), mientras que la fluorescencia en células fijadas y permeabilizadas representa al PECAM-1 que permanece en superficie más el que fue internalizado (CD31i). Resultados similares se obtuvieron en cuatro experimentos adicionales.

(C) Imágenes de las células incubadas con el Ac 5H2 durante 15, 60 y 120 minutos a 37°C. En los paneles inferiores se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal, en contraste de fase y fluorescencia.

Los resultados de reciclaje hasta aquí presentados, marcan claramente un comportamiento diferente de la molécula de PECAM-1/CD31 entre las células de melanoma y las células endoteliales. No así entre las células de melanoma y los linfocitos, ya que en estos últimos existiría un mecanismo de reciclaje similar. Sin embargo, no existe en la literatura la descripción de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en las poblaciones linfocitarias. Para establecer la existencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en los linfocitos, se procedió a estudiar la expresión de PECAM-1/CD31 sobre la población de LT. En primer lugar se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta para PECAM-1/CD31 sobre la membrana de la población total de linfocitos. Estos experimentos demostraron la existencia de dos poblaciones linfocitarias CD31⁺ y CD31⁻ (figura 26 A), confirmando los datos de la literatura ya existentes. Sin embargo, cuando la misma inmunofluorescencia se realiza sobre la población total de linfocitos fijados y permeabilizados, sólo fue posible distinguir una única población CD31⁺ (figura 26 B). Estos resultados sugerían la presencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en la población de linfocitos CD31⁻. Para verificar esta hipótesis, se separaron por *cell sorting* a las poblaciones de linfocitos T CD3⁺CD31⁺ y CD3⁺CD31⁻ (figura 27). Como resultado de la separación, se obtuvo una población de CD31⁻ con un 97% de pureza. Posteriormente, se determinó la presencia de PECAM-1/CD31 intracelular sobre la población CD3⁺CD31⁻ realizando un *Western Blot*. En la figura 28, se observa que ambas poblaciones CD31⁺ (calle 1) y CD31⁻ (calle 2), presentan una banda de 130 kDa compatible con PECAM-1/CD31, siendo mayor para las CD31⁺. Además, la presencia de CD31 en la calle correspondiente a la población CD31⁻ no se debe a la contaminación con células CD31⁺, ya que no se observa la banda cuando se siembra un 5% de linfocitos CD31⁺ (figura 28, calle 3). Estos resultados demuestran que los LT CD31⁻ presentan reservorios intracelulares de la molécula.

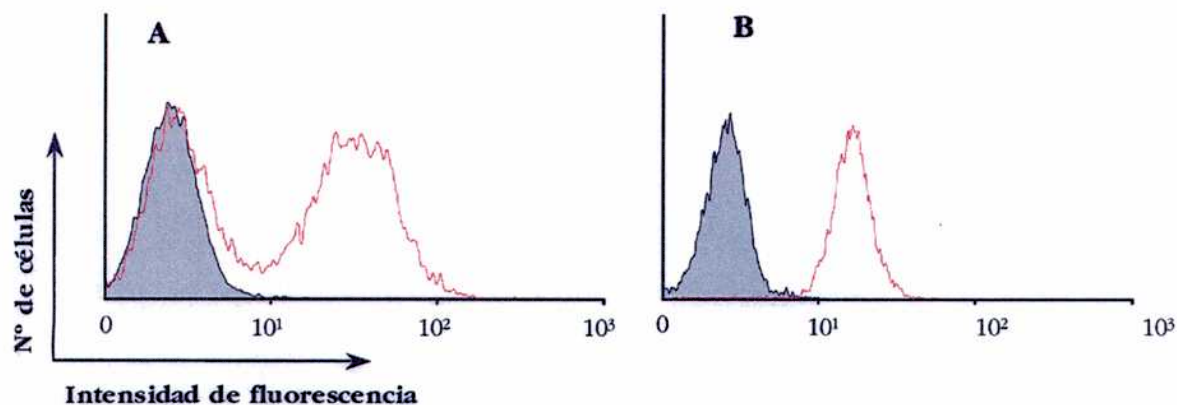


Figura 26: Expresión en membrana y total de CD31 en linfocitos T de sangre periférica

A) Expresión de CD31 en la superficie de LT (histograma rojo) con respecto al control negativo (histograma gris).

B) Expresión total de PECAM-1 en LT (histograma rojo) con respecto al control negativo (histograma gris).

Las células fueron fijadas y permeabilizadas (línea punteada) con 0,5% saponina y marcadas con Ac 5H2 como se describe en materiales y métodos. La intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo de cuatro se analizó por citometría de flujo.

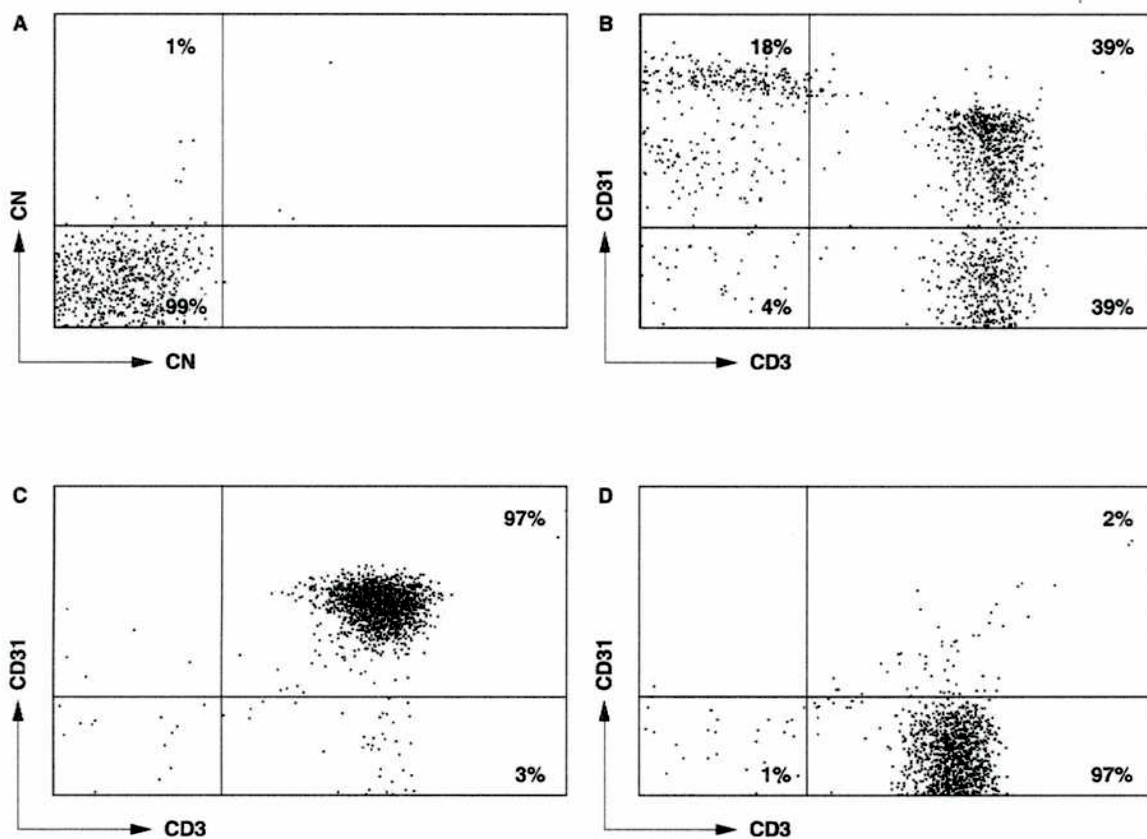


Figura 27: Cell Sorting de células mononucleares obtenidos de sangre periférica

(A) control doble negativo; **(B)** marcación de células mononucleares de sangre periférica con CD3-FITC y CD31-RPE. **(C)-(D)** corresponden a las poblaciones CD31⁺ y CD31⁻ de linfocitos T CD3⁺ luego de realizar el cell sorting.

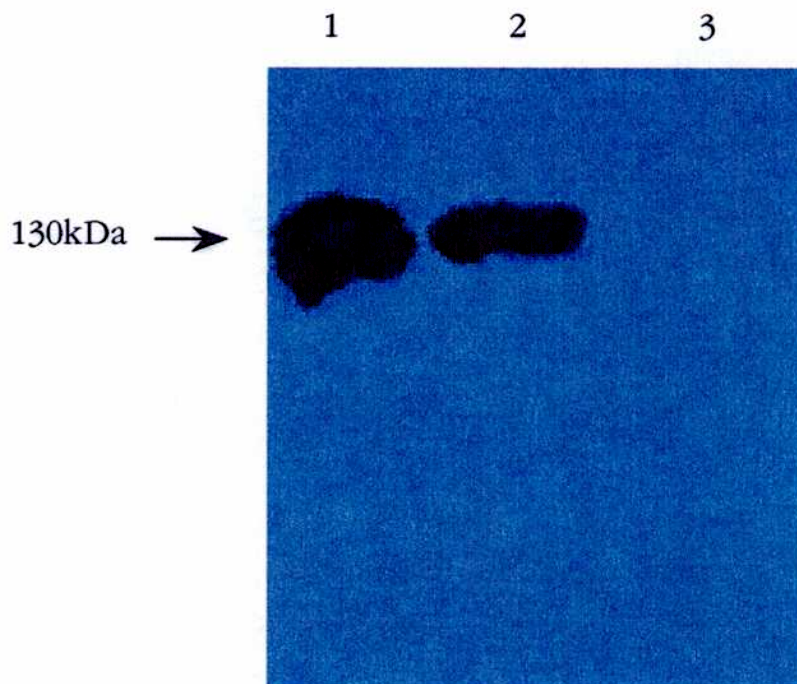


Figura 28: Western Blot de CD31 en las poblaciones de LT CD31⁺ y CD31⁻ separadas por *cell sorting*

Se observa una banda de 130 kDa tanto para las poblaciones CD31⁺ (calle 1) como en la CD31⁻ (calle 2) obtenidas por *cell sorting*. En la calle 3 se observa la ausencia de expresión de la proteína al sembrar un 5% de LT CD31⁺.

Existen distintas vías de transporte intracelular de las moléculas. Estas vías de endocitosis y exocitosis pueden ser estudiadas utilizando drogas que bloqueen los diferentes pasos de las vías de reciclaje de las moléculas. Por ejemplo, la brefeldina A bloquea el transporte desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el Golgi sin afectar al transporte de regreso del Golgi hacia RE; es decir, bloquea la secreción de proteínas mediante la disrupción del aparato de Golgi. Por su parte, la monensina bloquea la glicosilación y el transporte intracelular, incluido el movimiento de proteínas de membrana recién sintetizadas hacia la superficie celular y de las vesículas endocíticas hacia lisosomas, es decir que interfiere con la endocitosis y la exocitosis. En cambio, la cloroquina es una base débil que se acumula en los lisosomas e inhibe la degradación proteica al aumentar el pH intralisosomal y de esta manera inactiva a las proteasas. La citocalasina B interfiere con el funcionamiento de microtúbulos, los filamentos de actina y el citoesqueleto celular. El mecanismo de exo-endocitosis de PECAM-1/CD31 en las células de

melanoma IIB-MEL-LES fue examinado mediante el análisis de los efectos de estas drogas. En la figura 29, se observa que la citocalasina B aumenta la expresión de PECAM-1/CD31, pero no de CD71 (figura 30 A). En cambio la brefeldina A y la monensina disminuyen la expresión de la molécula; en tanto que la cloroquina carece de efecto sobre el tráfico de PECAM-1/CD31 (figura 29), a pesar de disminuir la expresión de otra molécula como CD71 (figura 30 B).

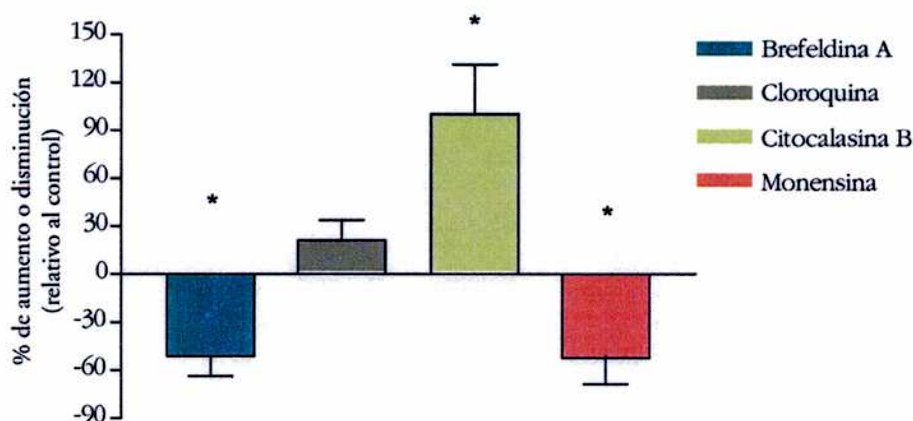


Figura 29: Efectos de agentes farmacológicos sobre la expresión de PECAM-1 en IIB-MEL-LES

Las células fueron preincubadas durante 1 hora con 1 μ g/ml BFA, 50 μ M cloroquina, 25 μ M monensina 0,5 μ g/ml citocalasina B. Luego fueron incubadas por otra hora con el Ac 5H2 a 37°C. Posteriormente se realizó una marcación como se describe en materiales y métodos.

El gráfico representa el porcentaje de aumento o disminución en la expresión de PECAM-1 comparado con las células sin tratar. Los valores representan la media $\pm$ ES de cuatro experimentos. * $p < 0,05$.

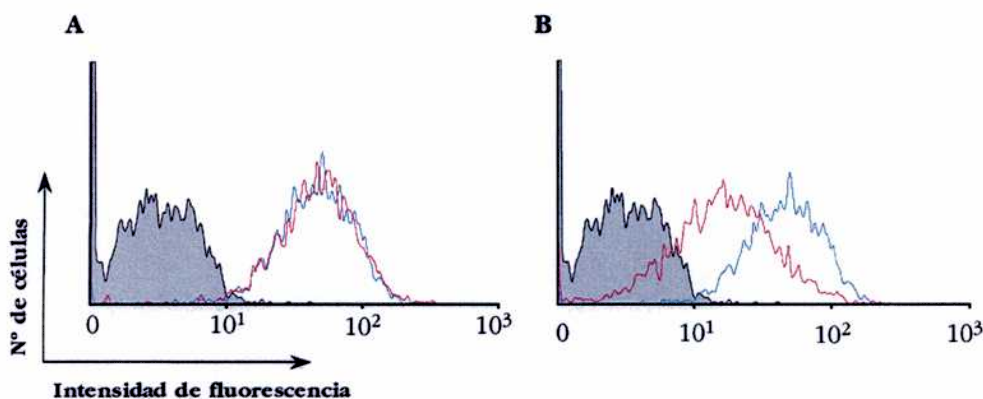


Figura 30: Expresión de CD71 en células tratadas con citocalasina y cloroquina

a) En el gráfico se representa la expresión para CD71 en células tratadas con citocalasina (histograma rojo) o sin tratar. (histograma azul) y el control negativo para ambos grupos (histograma gris).

b) En el gráfico se representa la expresión para CD71 en células tratadas con cloroquina (histograma rojo) o sin tratar. (histograma azul) y el control negativo para ambos grupos (histograma gris). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio.

INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Una vez que las células tumorales se adhieren y migran a través del endotelio vascular, entran en contacto con las proteínas que integran la matriz extracelular. Esta interacción célula-matriz extracelular, se realiza a través de receptores presentes sobre la superficie de las células tumorales, algunos de los cuales han sido relacionados con la capacidad invasiva del tumor[122]. El siguiente paso fue estudiar la expresión de estos receptores sobre las células tumorales y su interacción con las proteínas de matriz extracelular.

En la figura 31, se observa que las células IIB-MEL-LES son capaces de adherirse a las matrices extracelulares Col tipo IV y tipo I, LM, FN, VN, matrigel y entactina. Sin embargo, el porcentaje de adhesión a entactina y Col tipo I fue menor comparado con el resto de las matrices extracelulares

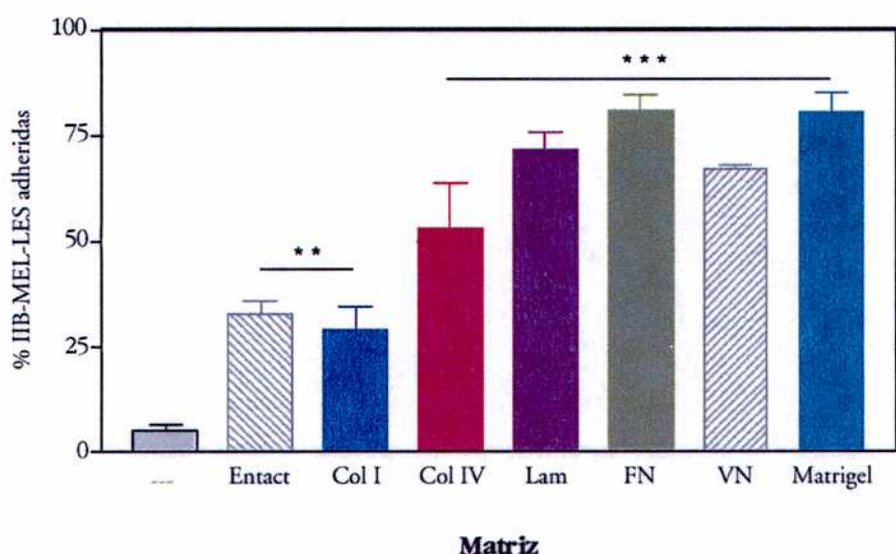


Figura 31: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a proteínas de MEC

Se colocaron 3×10^4 células sobre Matrigel, FN, LM, VN, entactina o Col tipo I y IV. Luego de 30 minutos a 37°C se recuperaron las células adheridas y no adheridas. Los datos se expresan como el porcentaje medio de adhesión $\pm$ ES de cuatro experimentos, comparado con la adhesión en ausencia de proteína de MEC. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test *Student Newman Kules*. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

La mayoría de los receptores descritos, involucrados en esta adhesión a los diferentes componentes de la matriz extracelular, son integrinas. El análisis de la expresión de las integrinas sobre las células IIB-MEL-LES demostró altos niveles de expresión de las integrinas α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , β_1 y β_3 y bajos niveles de α_1 y α_v en IIB-MEL-LES (figura 32).

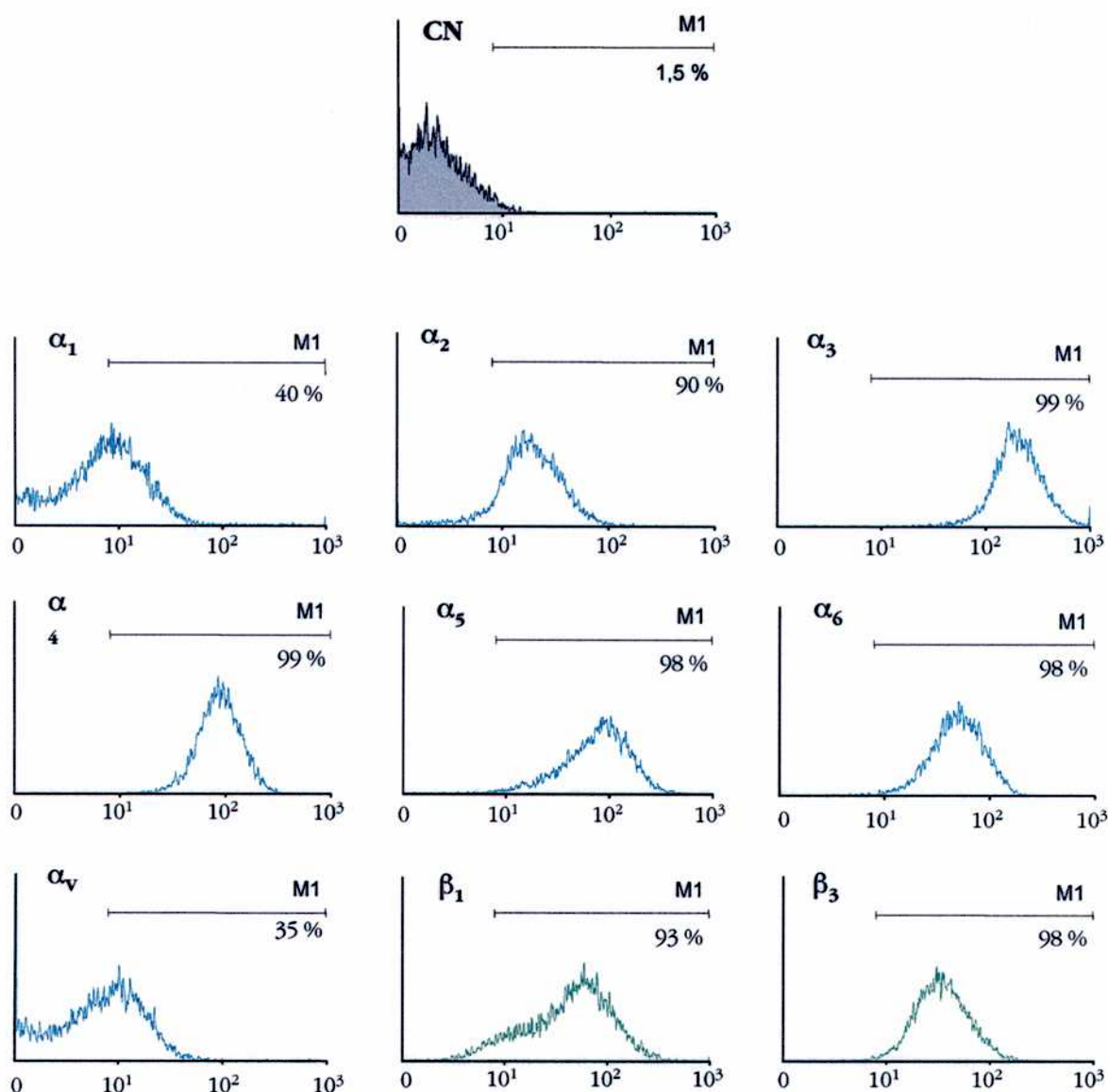


Figura 32: Expresión de integrinas involucradas en la adhesión a matrices extracelulares

Se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta para las diferentes moléculas según se describe en materiales y métodos.

En los histogramas se representa en el eje "x" el logaritmo de la intensidad de fluorescencia y en el "y" el número de células. El primer gráfico corresponde al control negativo (CN). Cada gráfico muestra el marcador analizado (línea coloreada) por citometría de flujo, excluyendo a las células necróticas con yoduro de propidio.

La mera presencia de integrinas no implica un rol funcional. Para determinar el rol funcional de estas integrinas en su interacción con las diferentes matrices extracelulares, se realizaron ensayos de bloqueo de la adhesión. En la figura 33, se observa que anticuerpos monoclonales bloqueantes para las integrinas α_3 y α_6 , pero no α_2 , α_5 y α_v , bloquearon parcialmente la adhesión de las células de melanoma a matrigel. Sin embargo, el bloqueo de la adhesión es mucho mayor cuando se utilizan simultáneamente los anticuerpos monoclonales contra las integrinas α_3 y α_6 o cuando se utiliza un anticuerpo contra la cadena β_1 de las integrinas. Es importante considerar que matrigel es una matriz derivada de sarcoma de ratón, compuesta mayoritariamente por LM, Col IV y entactina.

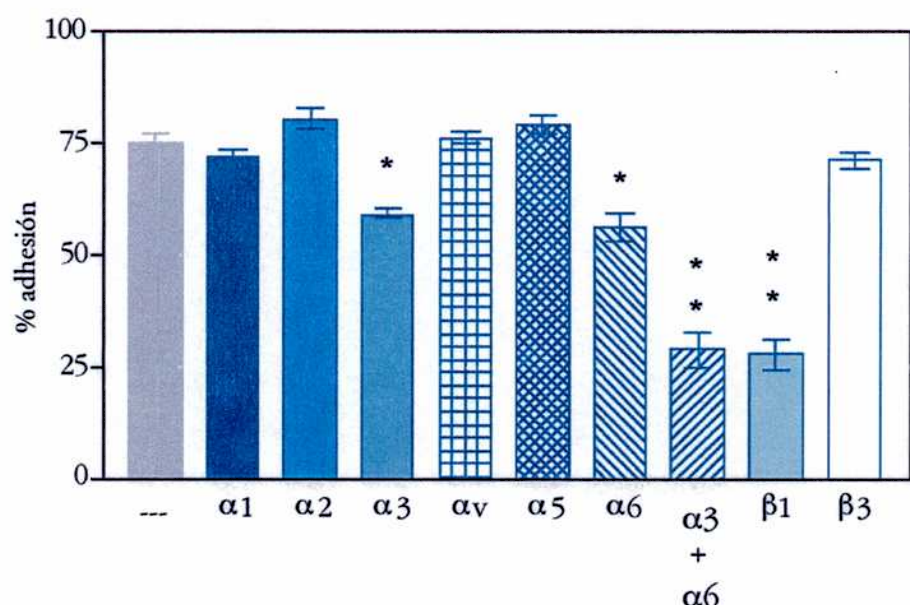


Figura 33: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a Matrigel

Las células fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con Ac bloqueantes para β_1 , β_3 , α_1 , α_2 , α_3 , α_v , α_5 y α_6 integrinas. Luego se colocaron 3×10^4 células en placas cubiertas con Matrigel. Como control se utilizó un anticuerpo irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas respecto a las células colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión $\pm$ DS, de un gráfico representativo de tres experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de *Student Newman Kules*, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Posteriormente se estudiaron las moléculas involucradas en la adhesión a cada uno de los componentes de la matriz matrigel. En la figura 34, se observa que la adhesión de IIB-MEL-LES a LM puede ser bloqueada con anticuerpos para α_3 , pero no α_6 integrina. Por otra parte, la adhesión a Col tipo IV pudo ser bloqueada con Ac contra α_3 y β_1 , pero no con α_4 ni β_3 integrina (figura 35). De los resultados de la combinación de anticuerpos también se desprende un rol para α_1 integrina ya que, a pesar de no evidenciar un efecto *per se*, la adición de este Ac junto con α_3 produjo un efecto mayor que sólo con el Ac para α_3 integrina. Por otro lado, la adhesión a Col tipo I pudo ser bloqueada con Ac contra α_3 y β_1 , pero no con α_1 ni β_3 integrina (figura 36).

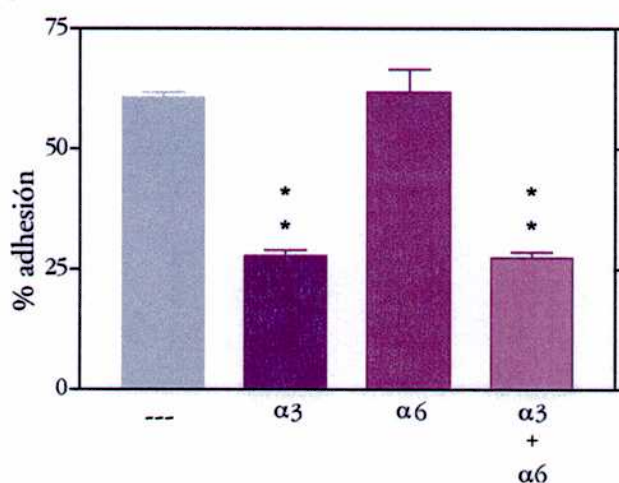


Figura 34: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a laminina

Las células fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos bloqueantes para α_3 y α_6 integrina. Luego se colocaron 3×10^4 células en placas cubiertas con LM. Como control se utilizó un Ac irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas respecto a las células colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión $\pm$ DS, de un gráfico representativo de dos experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Dunnett, ** $p < 0,01$.

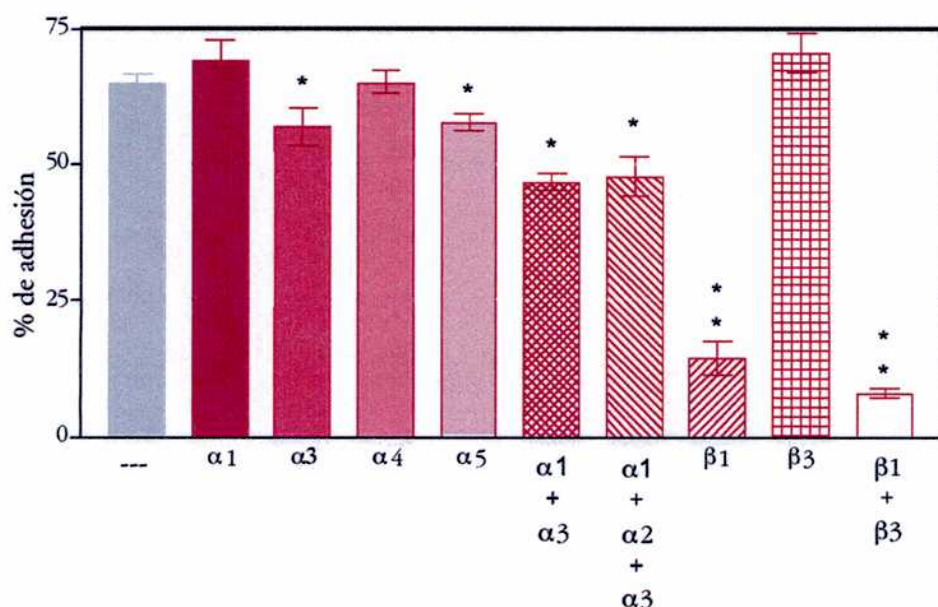


Figura 35: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a Colágeno tipo IV

Las células fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos bloqueantes para $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ integrinas. Luego se colocaron 3×10^4 células en placas cubiertas con Col IV. Como control se utilizó un Ac irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas respecto a las células colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión $\pm$ DS, de un gráfico representativo de dos experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

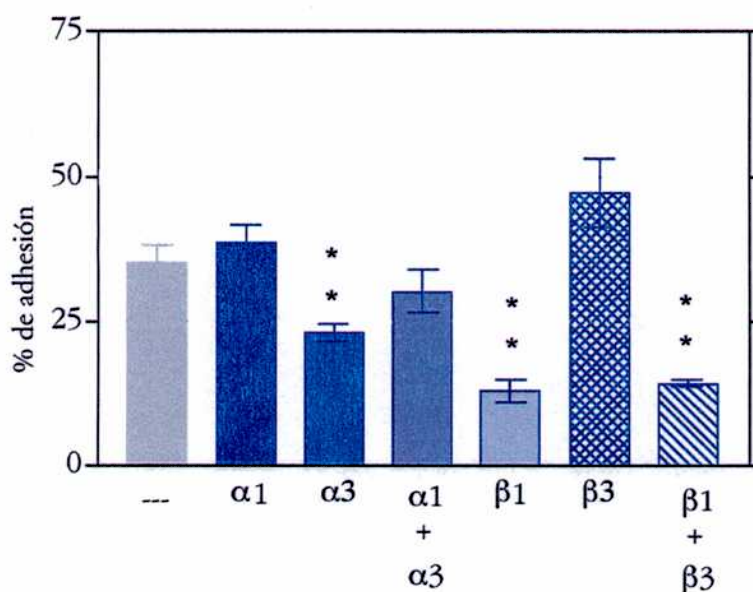


Figura 36: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a Colágeno tipo I

Las células fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos bloqueantes para $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$ y $\alpha 3$ integrinas. Luego se colocaron 3×10^4 células en placas cubiertas con Col I. Como control se utilizó un Ac irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas respecto a las células colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión $\pm$ DS, de un gráfico representativo de dos experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Dunett, ** $p < 0.01$.

Otra de las matrices extracelulares examinadas, fue la FN, ya que estas células tumorales presentan receptores para esta matriz y además es el componente mayoritario de la matriz de células endoteliales. En la figura 37, se observa que la adhesión a esta matriz extracelular, fue bloqueada con el agregado simultáneo de anticuerpos contra α_4 y α_5 integrina. Los niveles de bloqueo fueron similares a los obtenidos con el Ac contra β_1 integrina. En este caso también parece tener un rol secundario la integrina α_v , ya que la adición de un anticuerpo α_v junto con las integrinas α_4 y α_5 aumentó el bloqueo. En cambio, otras integrinas como α_3 y β_3 no tuvieron efecto sobre la adhesión.

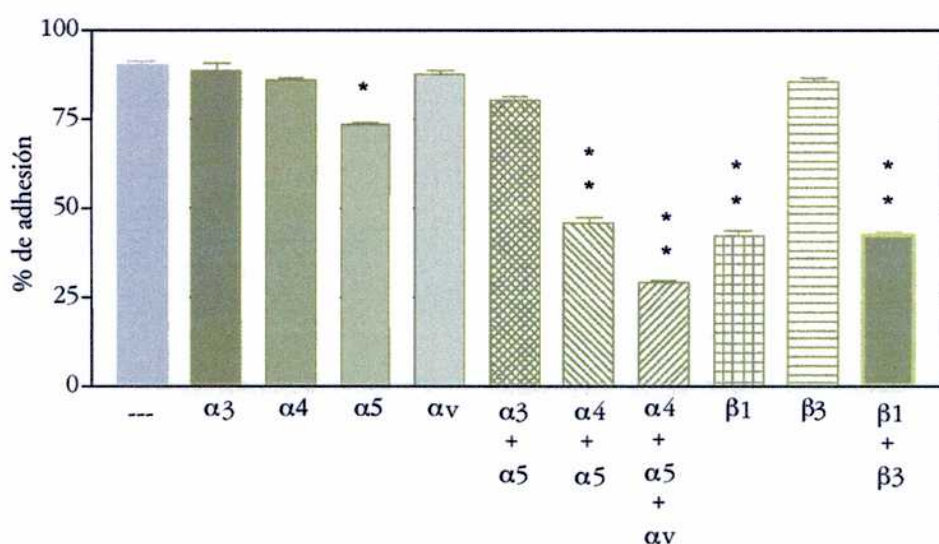


Figura 37: Adhesión de la línea celular IIB-MEL-LES a Fibronectina

Las células fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos bloqueantes para β_1 , β_3 , α_3 , α_4 , α_v y α_5 integrinas. Luego se colocaron 3×10^4 células en placas cubiertas con FN. Como control se utilizó un Ac irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas respecto a las células colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión $\pm$ DS, de un gráfico representativo de dos experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Dunnett, ** $p < 0,01$, * $p < 0,5$.

SEÑALES INTRACELULARES MEDIADAS POR MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La interacción de células tumorales con las proteínas de matriz extracelular y con las células endoteliales puede iniciar una cascada de señalización intracelular que lleve en última instancia a aumentar o disminuir la tasa de proliferación celular. De todas las moléculas estudiadas se eligió a la integrina β_1 y a la molécula PECAM-1/CD31 para evaluar su capacidad de enviar señales intracelulares que modifiquen la proliferación celular de las células tumorales. Para ello, se realizaron

ensayos de coligación con anticuerpos para CD31 o para la integrina $\beta 1$ sobre células IB-MEL-LES y HCT-116 y posteriormente se evaluó la proliferación. En la figura 38, se observa que la coligación de CD31 con los anticuerpos 5H2 y 7E4 produjo una leve disminución en la proliferación de las células de melanoma. Lo mismo se pudo observar en el caso de la línea de adenocarcinoma, HCT-116.

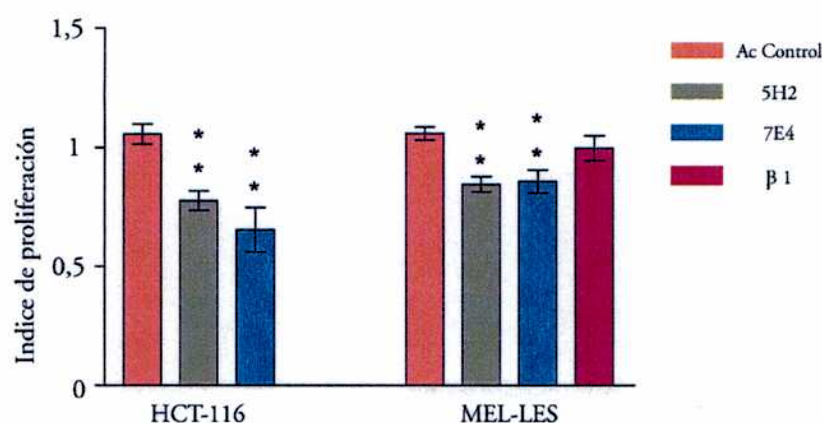


Figura 38: Efecto de los Ac 5H2 y 7E4 (Dom 3) sobre la proliferación tumoral

Se determinó el índice de proliferación de IIB-MEL-LES y HCT-116 luego de ser cultivadas sobre placas recubiertas con el Ac. La proliferación se cuantificó por incorporación de ^3H timidina, como se indica en materiales y métodos y se expresa como un índice relativo a las células cultivadas con Ac control. Los datos representan la media $\pm$ ES de seis experimentos, test de Dunnett ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

La leve disminución en la proliferación producida por la coligación pudo ser consecuencia de la baja expresión constitutiva de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales. Para determinar la relevancia de este mecanismo de inhibición, se realizó un enriquecimiento de la población de células IIB-MEL-LES CD31⁺ por *cell sorting* (figura 39). Luego de la separación celular, se obtuvo un tubo con células CD31⁻ (figura 39 A) y otro con una mezcla de células CD31⁺ (44 %) y CD31⁻ (55 %) (figura 39 B). Cuando se evaluó la capacidad de proliferación de estas dos poblaciones celulares CD31⁻ y la mezcla CD31⁺/CD31⁻, se observó que la población de células CD31⁻ proliferaron. En cambio, en la mezcla, la proliferación fue significativamente menor (figura 40).

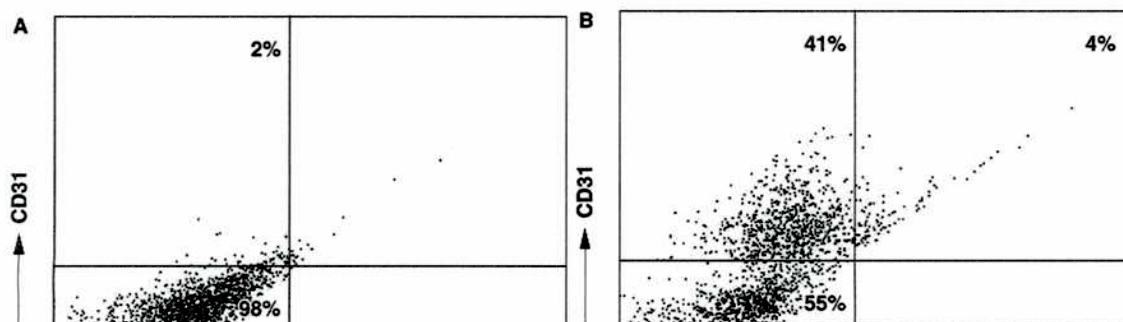


Figura 39: Cell Sorting de células IIB-MEL-LES

(A) Población CD31⁻ y (B) población CD31⁺/CD31⁻ obtenidas luego de realizar el cell sorting.

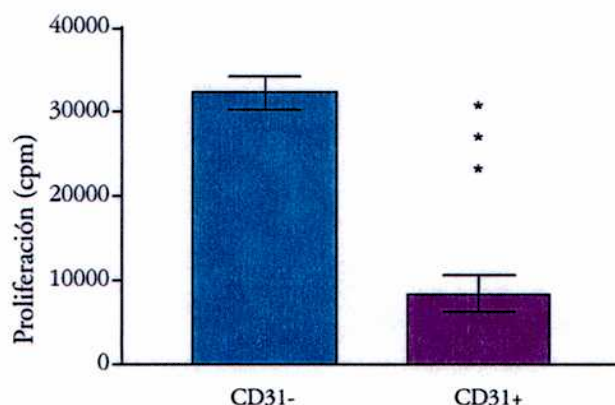


Figura 40: Proliferación de células de melanoma CD31⁻ y CD31⁺/CD31⁻ separadas por cell sorting

Proliferación de células de melanoma que corresponden a las células de la figura 39 A (CD31⁻) y de la figura 39 B (CD31⁺/CD31⁻). La proliferación se cuantificó por incorporación de ³H timidina, como se indica en materiales y métodos. Los datos representan la media ± ES de dos experimentos, test de Student. *** $p < 0,001$.

Dado que las células CD31⁺ enriquecidas por *cell sorting* presentaban una disminución en su capacidad de proliferación, se decidió estudiar la presencia de mecanismos de apoptosis gatillados por los anticuerpos 5H2 o 7E4. En la figura 41 A y B, se observa que la población total de células de melanoma es viable ya que no se marcaron con Annexina ni yoduro de propidio. Sin embargo, en un porcentaje pequeño de la población sorteada CD31⁺ (figura 41 E y F) pero no CD31⁻ (figura 41 C y D), se manifestó la presencia de apoptosis, la que se evidenció por la marcación con Annexina e yoduro de propidio.

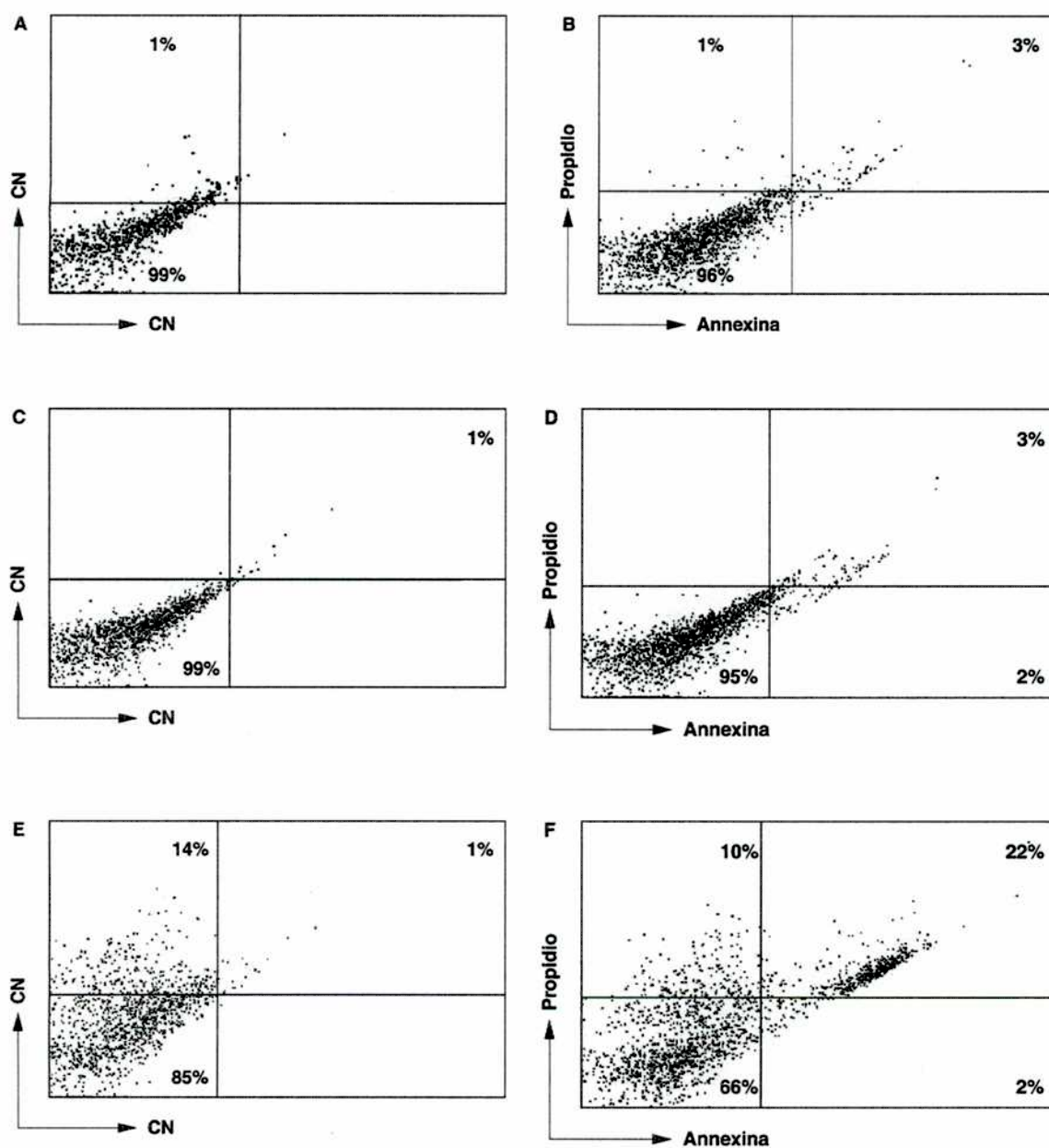


Figura 41: Ensayo de apoptosis en IIB-MEL-LES separadas por cell sorting

Se analizó la viabilidad de células de melanoma totales (A y B) y de las poblaciones CD31⁻ (C y D) y CD31⁺ (E y F) separadas por *cell sorting*. En la figura se observa el porcentaje de células marcadas con Annexina V-FITC e yoduro de propidio para los distintos grupos, analizadas por citometría de flujo.

DISCUSSION

El cáncer está asociado con una serie de alteraciones genéticas que producen modificaciones en moléculas implicadas en los diferentes pasos del desarrollo y la progresión tumoral. Entre ellas, se encuentran las moléculas de adhesión que tienen un rol importante no sólo en el cáncer, sino también en los procesos fisiológicos a través de su participación en las interacciones célula-célula y en los mecanismos de transducción de señales.

La interacción entre la célula tumoral y el endotelio vascular es clave en el proceso de crecimiento tumoral, invasión local y metástasis. La formación de un foco metastásico depende, en parte, de la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular, para su posterior extravasación al tejido circundante. Varios estudios han demostrado que la adhesión entre las células de melanoma y el endotelio se debe a la interacción entre las moléculas de VCAM-1 presentes sobre las células endoteliales con $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) presentes sobre las células de melanoma[44][123, 124]. Sin embargo, no se ha reportado la participación de PECAM-1/CD31 en esta adhesión.

PECAM-1/CD31 es una molécula de adhesión perteneciente a la Superfamilia de Ig, cuyo rol en la progresión tumoral no había sido exhaustivamente examinado. En este trabajo se demostró que CD31 está presente no sólo sobre las células endoteliales y de origen hematopoyético, sino también en células tumorales como las células de melanoma y de adenocarcinoma. Esta expresión se sustenta en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta y en los experimentos de *Western blot*, en donde una proteína compatible con CD31 de 130 kDa presente en el lisado de células tumorales, migra igual que la expresada por las células endoteliales. Sin embargo, PECAM-1/CD31 presente sobre las células tumorales, parece diferir en algunos aspectos con la molécula presente sobre las células normales. Por ejemplo, la expresión de PECAM-1/CD31 en la superficie de las líneas de células de melanoma y de adenocarcinoma es mucho menor comparada con las células endoteliales, los PMNLs y los linfocitos. Es más, la expresión en los distintos tipos de células tumorales analizados parece variar, lo que podría representar diferencias en la capacidad invasiva de estas células. Es importante destacar que en los ensayos de *Western blot*, se observa más de una banda tanto para las células endoteliales como para las células de melanoma. Estas bandas podrían ser producto de degradación, o bien, distintas isoformas de la proteína. Estas isoformas podrían originarse a partir de la glicosilación diferencial de la

proteína o del *splicing* alternativo del ARN, como se ha descrito en otros trabajos[53, 125].

Otra diferencia observada entre las células tumorales y las células endoteliales es la capacidad de unión de los Ac dirigidos contra diferentes epitopes sobre la molécula de CD31. Aparentemente, Ac dirigidos contra los dominios 2 y 6 son incapaces de reaccionar con la molécula de PECAM-1/CD31 presente en las células de melanoma. Dado que, la molécula CD31 se encuentra altamente glicosilada, es probable que la diferencia en la reactividad de los Ac se deba al reconocimiento de epitopes glicosilados. De hecho otro Ac dirigido contra el dominio 6 (PECAM 1.2) fue capaz de reconocer a la molécula en la superficie de la célula tumoral. De todas maneras no podemos excluir la posibilidad de diferencias en la conformación de PECAM-1/CD31 tumoral debida a mutaciones que pueden producir pérdida del sitio de reconocimiento del Ac. Considerando que la mayoría de los epitopes de las proteínas nativas son no lineares, es decir que dependen de la conformación estructural más que de la secuencia linear de aminoácidos[126, 127], la pérdida de un epítopo puede no requerir mutación ni delección. Además, es posible que los Ac dirigidos contra los dominios 2 y 6 sean capaces de reaccionar con PECAM-1/CD31 de la célula tumoral bajo diferentes condiciones de cultivo.

Otra posible explicación para el diferente reconocimiento por anticuerpos, pueden ser diferencias en los dominios extracelulares de PECAM-1/CD31 debidas a *splicing* alternativo del ARNm. Sin embargo esto es poco probable dado que el peso molecular de PECAM-1/CD31 en las células tumorales, es el mismo que en HUVEC. La existencia de múltiples isoformas de PECAM-1/CD31 generadas por *splicing* alternativo ha sido reportada para la cola citoplasmática[53], pero no para los dominios extracelulares. Se ha sugerido que la unión a ligandos está controlada por la cola citoplasmática[73, 74]. Sin embargo recientemente se ha demostrado que es el dominio extracelular y no el citoplasmático el que regula la actividad de unión, al menos para dirigir a la molécula al sitio de unión intercelular[128]. La modulación de la región extracelular por alteraciones en la región citoplasmática provee de un mecanismo potencial para regular la actividad de PECAM-1/CD31 en diversos procesos biológicos.

Otra observación que refuerza la idea de diferencias en los epítopes de las células normales y de las células tumorales reconocidos por los distintos anticuerpos, es la

mayor expresión de PECAM-1/CD31 en la membrana de células de melanoma fijadas con paraformaldehído comparadas con las células sin fijar. En este último caso, es importante señalar que la marcación se realiza con células que se encuentran a 4°C y en presencia de azida sódica con el fin de inhibir el metabolismo celular. Aún así las diferencias se ponen de manifiesto y podrían deberse a varias razones: i) una estabilización del epítopo conformacional al cual se une el anticuerpo; ii) una inhibición de la secreción de la proteína al medio extracelular, proceso que normalmente lleva a la producción de PECAM-1/CD31 soluble, como resultado de la eliminación del dominio transmembrana por *splicing* alternativo o clivaje de la proteína[50]; iii) una inhibición del proceso de internalización de la proteína, que solo ocurriría por la fijación celular, pero no evidenciable a 4°C y en presencia de azida sódica. El aumento de la expresión observado luego de la fijación celular aparentemente es específico para las células de melanoma, ya que no se observa luego de la fijación de células endoteliales (dato no mostrado).

Estos resultados se complementan con los obtenidos en los ensayos de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células de melanoma permeabilizadas. En estos experimentos, se demuestra que la expresión de CD31 total (membrana más citoplasma) es mayor cuando se la compara con la expresión hallada en la membrana de las células. Es importante remarcar, que se descarta la posibilidad de una unión inespecífica del Ac a estructuras intracelulares, por la ausencia de fluorescencia en células CD31⁻ fijadas y permeabilizadas como los fibroblastos.

En última instancia, estos experimentos están demostrando la existencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en células tumorales, similar a los descritos en las plaquetas[129], pero cuya función aún se desconoce. En este trabajo de tesis se profundizó en el estudio de estos reservorios intracelulares en las células tumorales y los resultados obtenidos avalan sobre un posible rol de PECAM-1/CD31 en la progresión tumoral.

La expresión de PECAM-1/CD31 en las células endoteliales es constitutiva[130]. Sin embargo se han descripto factores que modulan su expresión como la trombospondina-1 [131], la irradiación[132] y las condiciones de hipoxia[133]. Las citoquinas también pueden modular la expresión de PECAM-1/CD31 en U937[64]. En cambio, en las células endoteliales, el TNF- α y el INF- γ inducen una

redistribución y desaparición de la molécula de la membrana celular[134]. Este efecto ha sido relacionado con la internalización y degradación de PECAM-1/CD31 preexistente e inhibición de su síntesis[63].

En las células tumorales también podrían existir factores capaces de modular la expresión de la molécula, modificando el tráfico intracelular. Entre los factores capaces de modular la expresión podrían hallarse el contacto célula-célula y el pH intratumoral. En este sentido, se conoce que diferencias en el estado de confluencia celular pueden afectar la estructura de las uniones adherentes, modificando la fosforilación de las moléculas de adhesión[135]. En nuestros estudios, también observamos diferencias en la expresión de PECAM-1/CD31 dependiendo del estado de confluencia de las monocapas celulares, siendo mayor en células derivadas de monocapas subconfluentes comparado con las células derivadas de monocapas confluentes. Esto podría deberse a cambios en el estado de fosforilación del dominio citoplasmático de PECAM-1/CD31, el cual depende del balance entre la actividad de quinasas y de fosfatasas. En última instancia la fosforilación podría estar modificando el tráfico intracelular de la proteína[136]. Nuevamente en este punto, encontramos otra diferencia entre las células tumorales y las células normales, ya que la expresión de PECAM-1/CD31 en las células endoteliales no se modifica según el estado de confluencia celular.

Otro de los factores examinados fue el pH extracelular. Se conoce que el pH presente en el tumor es más bajo que el de un tejido normal. Esta característica del tumor es causada por alteraciones en la salida de H^+ y en la eliminación del medio ácido extracelular[137]. En nuestro modelo, la disminución del pH extracelular de las células de melanoma provoca una disminución en la ya baja expresión de PECAM-1/CD31 en la membrana celular. Es importante remarcar que esta expresión de PECAM-1/CD31 fue determinada sobre las células viables, aunque no podemos excluir la posibilidad de que las células tumorales hayan comenzado un proceso de apoptosis. Actualmente, no sabemos si la inducción del proceso apoptótico está relacionado con la expresión de PECAM-1/CD31. Sin embargo, su expresión previene la apoptosis al menos en células endoteliales[138].

La expresión y/o tráfico intracelular de la molécula podría ser modulada por otros factores. Entre ellos, los factores de crecimiento son capaces de regular una variedad de genes asociados con estados patológicos, incluidos la invasión tumoral

y la metástasis. Por ejemplo, el EGF y su receptor han sido asociados con la progresión tumoral[139, 140]. En nuestro modelo, la presencia de EGF en el medio de cultivo de las células tumorales produce un aumento en la expresión de PECAM-1/CD31. Resultados similares se han informado para otras moléculas de adhesión, entre ellas, CD44 y E-cadherina [141] [142].

La expresión de PECAM-1/CD31 en las células tumorales fue demostrada por las técnicas de *Western blot* e IFI. Los niveles de la proteína son menores a los observados en células endoteliales y a los reportados previamente para otras células normales. Los ensayos de *Western blot* revelaron que las células de melanoma presentan mayores niveles de PECAM-1/CD31 comparado con las células de adenocarcinoma. Sin embargo, las células de melanoma presentan una menor expresión en la superficie celular respecto a las células de adenocarcinoma. Estos resultados, en conjunto, sugieren que en las células de melanoma la proteína se encontraría mayoritariamente en el citoplasma celular.

Los mecanismos de endocitosis y reciclaje pueden modular los niveles de expresión de varias moléculas[143]. Para algunos receptores el proceso parece ser constitutivo, mientras que para otros es inducible por el ligando. Dentro de las moléculas de adhesión, la expresión de E-cadherina parece estar regulada por endocitosis[144]. Otro ejemplo de proteína internalizada es CTLA-4, cuya localización intracelular es regulada por un motivo de 11 Aa que contienen tirosina en la cola citoplasmática y que conduce a la molécula al Golgi o a un compartimento post-Golgi[145]. La información disponible, indica que las señales basadas en leucina actúan en el TGN, mientras que las basadas en tirosina actúan en la membrana plasmática.

En las células tumorales, la internalización de PECAM-1/CD31 es otro mecanismo modulador de su expresión. Esto se ve apoyado por los experimentos que muestran una disminución de la expresión en la superficie celular cuando las células son preincubadas con el anticuerpo a 37°C comparado con las incubadas a 4°C. Sin embargo, sólo se observa claramente esta disminución en dos de los tres tiempos analizados (15 y 120 minutos). La ausencia aparente de cambio a los 60 minutos podría explicarse en función de la cinética de reciclaje de la molécula. Otra posible explicación para este resultado es el destino endocítico del complejo CD31-anticuerpo una vez que ha sido internalizado.

Los mecanismos implicados en el proceso de endocitosis/exocitosis son diversos, complejos y aún no del todo esclarecidos. Las proteínas internalizadas en vesículas endocíticas se pueden dirigir hacia los endosomas tempranos, desde donde pueden: i) ser rescatadas y volver al mismo lugar en la superficie celular (reciclaje); ii) dirigirse hacia otro punto de la membrana (transcitosis); o iii) ser degradadas en los lisosomas[114, 136]. Es importante remarcar que el camino endocítico se cruza con el camino secretorio permitiendo el transporte de glicoproteínas recién sintetizadas hacia los endosomas tardíos/lisosomas[136, 146].

Actualmente se conoce que la ruta hacia los endosomas está determinada por una variedad de motivos presentes en la cola citoplasmática de las proteínas que contienen tirosinas y leucinas[136, 147, 148]. Se han identificado cuatro tipos de motivos: i) YXXZ/NXXY, donde Z representa un aminoácido hidrofóbico: L, I, V, C o A; ii) señales que contienen dileucinas LL; iii) un dominio rico en serinas fosforiladas en el extremo C-terminal de muchos *GTP-binding protein coupled receptor* (GPCRs) y iv) motivos que involucran la fosforilación en residuos serina inducible por el ligando y la maquinaria de ubiquitinación[136, 149]. En general, la mayoría de las moléculas de superficie son internalizadas en vesículas revestidas por clatrina requiriendo la presencia de las proteínas adaptadoras (APs) para el ensamblado de las mismas[111]. Estas proteínas adaptadoras reconocen determinadas secuencias aminoacídicas en los dominios citoplasmáticos de las moléculas de superficie. La proteína adaptadora 2 (AP₂), reconoce las secuencias de tipo YXXZ, permitiendo el ensamblado de las vesículas de clatrina y la endocitosis de las moléculas de superficie. Las secuencias de tipo LZ, en cambio, son reconocidas por la proteína adaptadora 1 (AP₁), que permite el pasaje de las moléculas desde el TGN al compartimento endosomal[136]. La presencia de un mecanismo de exo/endocitosis para PECAM-1/CD31 está avalado por nuestros estudios realizados a 4°C y a 37°C, sumado a la presencia de varias secuencias de reciclaje en el dominio citoplasmático de la proteína (figura 42).

```

541 egkpfyqmts natqafwtkq kaskeqegey yctafnranh assvprskil tvrvilapwk
601 kgliavviig viialliiaa kcyflrkaka kqmpvemsrp avpllnsnne kmsdpnmean
661 shyghnddvr nhamkpindn keplnsdvqy tevqvssaes hkdldgkkdte tvysevrkav
721 pdavesrysr tegsldgt

```

Figura 42: Secuencias de reciclaje en el dominio citoplasmático de PECAM-1/CD31
Dominio citoplasmático de PECAM-1/CD31 con algunas secuencias de reciclaje marcadas en rojo.

Los niveles de expresión de PECAM-1/CD31 también podrían ser modificados por la presencia de un mecanismo de clivaje. Existen algunas evidencias a favor de esta hipótesis. Johnson y colaboradores[150] observaron un mecanismo de secreción, endocitosis y autodegradación en el compartimento lisosomal de macromoléculas en células de melanoma humano. Experimentos llevados a cabo con la finalidad de detectar la presencia de PECAM-1/CD31 soluble en los medios de cultivo de células de melanoma resultaron infructuosos. A pesar de haber puesto a punto una técnica de detección de PECAM-1/CD31 soluble por ELISA, nunca se pudo detectar PECAM-1/CD31 soluble por encima del límite de detección del ensayo.

La utilización de agentes farmacológicos que interfieren en las distintas vías de endo/exocitosis de las moléculas nos permitió descifrar los mecanismos de reciclaje de PECAM-1/CD31[109, 143]. El resultado de los experimentos realizados para determinar el camino involucrado en la exo y endocitosis de CD31 indican que: a) CD31 no es afectado por el tratamiento con cloroquina. Esto sugiere que el reciclaje involucra estructuras diferentes a las que se encuentran involucradas en la degradación; b) monensina y brefeldina A, agentes que afectan la estructura y función del aparato de Golgi, producen una disminución en la expresión de CD31; c) citocalasina B aumenta la expresión de CD31 probablemente al inhibir la polimerización de actina. Este último resultado indica un rol importante de los filamentos de actina. Esto concuerda con el trabajo realizado por Ilan y colaboradores[151], donde se observó una interacción de PECAM-1/CD31 con γ -catenina y como consecuencia una asociación con los filamentos de actina y filamentos intermedios. Este puede ser un efecto particular de las células de melanoma, dado que se ha reportado que en las células U937, la citocalasina B no afecta la localización de CD31[64]. Probablemente, sea necesario realizar otros estudios que permitan definir con mayor exactitud el camino intracelular específico involucrado en la exo y endocitosis de CD31.

Es interesante señalar la presencia de mecanismos de reciclaje y la presencia de reservorios intracelulares tanto en las células tumorales como en los LT, pero no en las células endoteliales. Desde el punto de vista funcional, esta observación parecería lógica si se piensa que la migración de las células metastásicas se asemejan más a la migración de linfocitos que a la migración de las células endoteliales. En lo que respecta a la relevancia de los reservorios intracelulares de

PECAM-1/CD31 en la población total de linfocitos aún no está del todo clara. Sin embargo, en este contexto, se conoce que los LT pierden la expresión de PECAM-1/CD31 al pasar del estado *naïve* a células de memoria[56]. Sería interesante saber si los linfocitos de memoria CD31⁻, que tienen CD31 intracelular, son capaces de re-exponer la molécula de PECAM-1/CD31 sobre la superficie celular y cuáles son los estímulos capaces de inducirlo.

En este trabajo se muestra por primera vez un proceso de reciclaje de PECAM-1/CD31 en las células tumorales. De acuerdo a los resultados obtenidos, en la figura 43 se esquematiza un modelo hipotético de las posibles vías de exo/endocitosis de PECAM-1/CD31. En la misma se observa la internalización por vía endosomal junto con la participación del citoesqueleto, involucrando probablemente depresiones y vesículas revestidas de clatrina. A su vez, estaría externalizándose por vía directa pasando desde el TGN a la membrana plasmática, Una vez en la superficie celular, cabe la posibilidad de que PECAM-1/CD31 sea clivada y liberada al medio extracelular, aunque esto último no haya sido comprobado.

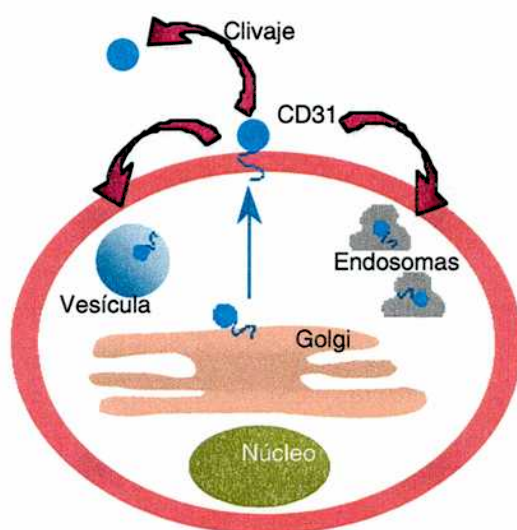


Figura 43: Esquema del posible mecanismo de endo/exocitosis de PECAM-1/CD31 en células tumorales

Como he mencionado en la introducción, PECAM-1/CD31 pertenece a la superfamilia de receptores Ig-ITIM, la que se caracteriza por la presencia de ITIM intracitoplasmático que recluta y activa fosfatasa de tirosina[97]. Estos motivos ITIM alojan los motivos endocíticos descritos más arriba. La relevancia de PECAM-1/CD31 y sus motivos inhibitorios en células tumorales se refleja en los experimentos de coligación, en los que se pone en evidencia un efecto inhibitorio de la proliferación celular. Recientemente se ha demostrado que la transfección estable con una construcción de PECAM-1/CD31 truncada en células de carcinoma de colon produce una disminución en la proliferación celular. Los experimentos presentados en esta tesis, refuerzan este hallazgo y el concepto de que PECAM-1/CD31 está involucrado en las cascadas regulatorias de señalización intracelular[152]. Efectos moduladores a través de señales enviadas por PECAM-1/CD31 también han sido descritos para linfocitos[97, 107, 153], monocitos, neutrófilos[79], NK[80] y células endoteliales[154]. Resulta interesante señalar que en el caso de las células tumorales, la inhibición de la proliferación estaría ligada a la inducción de apoptosis; ya que un porcentaje de células CD31⁺, pero no las CD31⁻, se marcan con Annexina e yoduro de propidio. Desde el punto de vista terapéutico, sería muy importante determinar si las células endoteliales presentes en la masa tumoral y que expresan CD31, son capaces de responder al anticuerpo, iniciando un proceso de apoptosis.

Los cambios en los niveles de expresión de PECAM-1/CD31 en la superficie de las células tumorales permitirán a la célula cambiar sus propiedades adhesivas y quizás su capacidad invasiva. Por ejemplo, la disminución de la molécula puede también facilitar el desprendimiento de las células de un tumor primario, como se demuestra en el modelo hipotético de la figura 44. Este modelo estaría avalado por los experimentos que demuestran la presencia de una mayor expresión superficial de PECAM-1/CD31 en las células espontáneamente desprendidas de las monocapas confluentes de células tumorales. Estas células CD31⁺ podrán ser más eficientes en adherirse al endotelio, permitiendo la colonización en un nuevo sitio tisular. Es importante mencionar que del total de células desprendidas espontáneamente, un 50–70% de estas células se mantienen viables a las 24 horas y que la expresión de PECAM-1/CD31 se realizó sobre las células viables, ya que las células necróticas fueron excluidas del análisis utilizando yoduro de propidio. Además, las células desprendidas espontáneamente son capaces de adherirse y crecer en las placas de cultivo cuando se las vuelve a cultivar, corroborando la

viabilidad de las mismas. A pesar de desconocer el rol y la presencia de PECAM-1/CD31 en tumores reales, hay algunos trabajos que muestran una marca citoplasmática débil en ciertos tumores[155, 156]. Quizás el mecanismo de internalización descrito más arriba pueda explicar las dificultades encontradas para detectar la expresión de PECAM-1/CD31 en la membrana de biopsias tumorales[155].

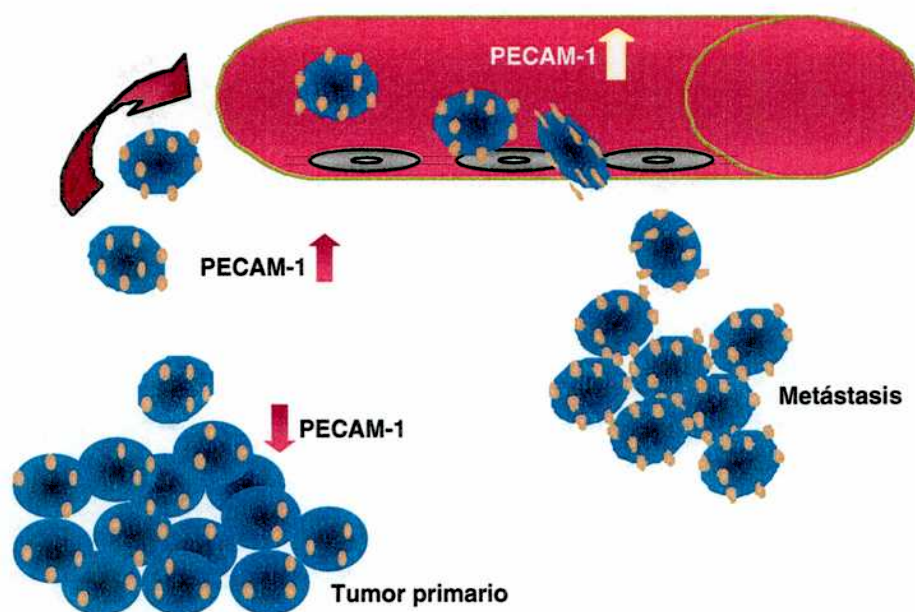


Figura 44: Modelo de la participación de PECAM-1/CD31 durante la progresión tumoral

La presencia de PECAM-1/CD31 sobre las células tumorales le permitiría a la célula disponer de otra molécula para adherirse al endotelio vascular. Esto se ve reflejado por la inhibición parcial de la adhesión de las células de melanoma a HUVEC utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los dominios 1, 3, 4-5 de CD31 o por transfección con el oligonucleótido antisentido. Es importante señalar que a pesar de la disminución en la adhesión con los anticuerpos o con el oligonucleótido antisentido, existe un 30% de adhesión de IIB-MEL-LES a endotelio que no es posible inhibir. Esto puede deberse a la eficiencia de la transfección (menor al 100%) y/o a la participación de alguna otra molécula en la interacción entre estas células.

El rol de PECAM-1/CD31 en la adhesión de células de melanoma y de adenocarcinoma (no mostrado) a células endoteliales es diferente al observado para leucocitos. En primer lugar porque los anticuerpos dirigidos contra CD31 no son capaces de inhibir la adhesión de PMNLs a células endoteliales; y en segundo lugar, porque solamente los dominios 1 y 2 de CD31 están involucrados en la migración transendotelial de leucocitos. Por lo tanto la interacción de PECAM-1/CD31 de las células tumorales con HUVEC puede ser más compleja que para la migración de leucocitos. Es interesante observar que los anticuerpos dirigidos contra los dominios 1, 3 y 4-5 no tiene un efecto aditivo en la inhibición de la adhesión de melanoma a HUVEC (no mostrado). Esto sugiere que es posible bloquear selectivamente un dominio involucrado en la adhesión de células tumorales, sin afectar la migración de leucocitos. Estos hallazgos permiten suponer una posible terapia antimetastásica que afecte la adhesión y la proliferación de células tumorales sin inhibir el patrullaje del sistema inmune ni la respuesta inflamatoria.

La malignidad del tumor se asocia con su habilidad para llevar adelante el proceso metastásico, el que está relacionado no sólo en su interacción con las células endoteliales sino también con las proteínas de matriz extracelular. En este sentido, las células de melanoma utilizadas en este trabajo fueron capaces de adherirse en particular a las matrices extracelulares como Col tipo IV, LM, FN, VN y matrigel. En cambio su capacidad de adhesión a Col tipo I y entactina fue menor (figura 31). Esto podría sugerir cierta especificidad en el mecanismo de adhesión o podría ser consecuencia de la menor expresión y/o del estado de activación de los receptores para estas matrices extracelulares examinadas. Muchas de las matrices examinadas estarían utilizando los mismos receptores, ya que la adhesión a LM, Col tipo IV y matrigel es bloqueada con Ac dirigidos contra la integrina α_3 .

Las adhesiones son esenciales para que las células puedan sobrevivir, proliferar y diferenciarse. Modificaciones en la expresión de los receptores para matrices, ya sean cuantitativas o cualitativas (estado de activación), podrían favorecer o impedir la progresión tumoral. En la línea celular de melanoma utilizada en este trabajo existe una alta expresión de las integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_3$. Ambas integrinas son capaces de enviar señales anti-apoptóticas favoreciendo la progresión tumoral[21, 22] y además se ha observado una asociación entre la integrina $\alpha_4\beta_3$ y las propiedades invasivas del melanoma maligno[21, 22].

En el presente trabajo, se demuestra la expresión de PECAM-1/CD31 en la membrana y citoplasma de dos líneas tumorales humanas. Hasta el presente, esta es la primera evidencia de la existencia de reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31 en células tumorales. Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de expresión de la proteína en la superficie de células tumorales podrían estar modificándose por un proceso de endocitosis y exocitosis. De esta manera la existencia de distintos niveles de PECAM-1/CD31 en la membrana modificarían la capacidad de adhesión de estas células a células endoteliales. Estos resultados, sumados a la disminución de la adhesión entre células endoteliales y células tumorales transfectadas con un oligonucleótido antisentido para PECAM-1/CD31, sugieren un rol de la proteína en la progresión tumoral y metástasis. Por último, la inhibición de la proliferación y de la adhesión utilizando anticuerpos monoclonales contra ciertos dominios de PECAM-1/CD31 abre una nueva posibilidad para idear estrategias tendientes a limitar las metástasis.

CONCLUSIONES

- Las líneas celulares de melanoma IIB-MEL-LES y MEL-J y de adenocarcinoma HCT-116 presentan menor expresión de PECAM-1/CD31 comparado con las células endoteliales y leucocitarias.
- La adhesión de las células de melanoma a endotelio es parcialmente mediada por PECAM-1/CD31 a través de los dominios 1, 3 y 4-5.
- La expresión de PECAM-1/CD31 en células tumorales es modulada en más y en menos por la presencia del factor de crecimiento epidérmico y por cambios en el pH extracelular respectivamente.
- La disminución de la expresión de PECAM-1/CD31 en las células de melanoma, por la transfección con un oligonucleótido antisentido para la molécula o por ausencia en los contactos célula-célula, se traduce en células tumorales con menor capacidad adhesiva a células endoteliales.
- Las células de melanoma y los linfocitos presentan reservorios intracelulares de PECAM-1/CD31.
- Existe un mecanismo de internalización de PECAM-1/CD31 en células de melanoma, adenocarcinoma, linfocitos, pero no en células endoteliales. Estos mecanismos no involucran a los lisosomas y dependen de los filamentos de actina, al menos para las células de melanoma.
- Las células de melanoma se adhieren a las matrices extracelulares (Col tipo IV y tipo I, LM, FN, VN, matrigel y entactina) y expresan altos niveles de las integrinas α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , β_1 y β_3 .
- La señalización a través del dominio 3 de PECAM-1/CD31 pero no de la integrina β_1 , induce la apoptosis e inhibe la proliferación de las células de melanoma CD31⁺ pero no CD31⁻.




**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

1. Glinsky G. (1993) *Cell adhesion and metastasis: is the site specificity of cancer metastasis determined by leukocyte-endothelial cell recognition and adhesion?* Critical Reviews in Oncology /Hematology, 14, 229-278.
2. Liotta L. (1992) *Cancer cell invasion and metastasis*. Scientific American, 54-63.
3. Nestle F, Burg G, Dummer R. (1999) *New perspectives on immunology and immunotherapy of melanoma*. Immunology Today, 20, 5-7.
4. Gailit J, Clark R. (1994) *Wound repair in the context of extracellular matrix*. Current Opinion in Cell Biology, 6, 717-725.
5. Voura E, Sandig M, Siu C. (1998) *Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells*. Microsc Res Tech, 43, 265-275.
6. Humphries M, Olden K, Yamada K. (1986) *A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells*. Science, 233, 467-470.
7. Iwamoto Y, Robey F, Graf J, Sasaki M, Kleinman H, Yamada Y, Martin G. (1987) *YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide inhibits experimental metastasis formation*. Science, 238, 1132-1134.
8. Wewer U, Liotta L, Jaye M, Ricca G, Drohan W, Claysmith A, Rao C, Wirth P, Coligan J, Albrechtsen R, Mudryj M, Sobel M. (1986) *Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin*. Proc Natl Acad Sci USA, 83, 7137-7141.
9. Pauli B, Augustin-Voss H, el-Sabban M, Johnson R, Hammer D. (1990) *Organ preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules*. Cancer Metastasis Rev, 9, 175-189.
10. Bevilacqua M. (1993) *Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules*. Annu.Rev.Immunol., 11, 767-804.
11. Makgoba M, Bernard A, Sanders M. (1992) *Cell adhesion/signalling: biology and clinical applications*. European Journal of Clinical Investigation, 22, 443-453.
12. Hynes R. (1992) *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 69, 11-25.
13. Albelda S, Buck C. (1990) *Integrins and other cell adhesion molecules*. FASEB, 4, 2868-2880.
14. Tuckwell D, Humphries M. (1993) *Molecular and cellular biology of integrins*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 15, 149-171.

15. Wright S, Licht M, Craigmyl L, Silverstein S. (1984) *Communication between receptors for different ligands on a single cell: ligation of fibronectin receptors induces a reversible alteration in the function of complement receptors on cultured human monocytes*. J. Cell Biol., 99, 336-339.
16. Wright S, Silverstein S. (1982) *Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3bi receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes*. J. Exp. Med, 156, 1149-1164.
17. Giancotti F, Ruoslahti E. (1999) *Integrin Signaling*. Science, 285, 1028-1033.
18. Frisch S, Ruoslahti E. (1997) *Integrins and anoikis*. Current Opinion in Cell Biology, 9, 701-706.
19. Montgomery A, Reisfeld R, Cheresch D. (1994) *Integrin $\alpha\beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen*. Proceedings National Academy of Science. USA, 91, 8856-8860.
20. Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano R. (1991) *Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient chinese hamster ovary cells variants*. Cancer Research.
21. Felding-Habermann B, Mueller B, Romerdahl C, Cheresch D. (1992) *Involvement of integrin αv gene expression in human melanoma tumorigenicity*. J. Clin. Invest., 89, 2018-2022.
22. Gehlsen K, Davis G, Sriramaraio P. (1992) *Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties*. Clin. Exp. Metastasis, 10, 111-120.
23. Juliano R, Varner J. (1993) *Adhesion molecules in cancer: the role of integrins*. Current Opinion in Cell Biology, 5, 812-818.
24. Humphries M, Yamada K, Olden K. (1988) *Investigation of the biological effects of anti-cell adhesive synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells*. J. Clin. Invest, 81, 782-790.
25. Grunwald G. (1993) *The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules*. Curr Opin Cell Biol, 5, 797-805.
26. Kemler R. (1993) *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion*. Trends Genet, 9, 317-321.
27. Takeichi M. (1993) *Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis*. Current Opinion in Cell Biology, 5, 806-811.
28. Frixen U, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. (1991) *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells*. J.Cell. Biol, 113, 173-185.

29. Schipper J, Frixen U, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. (1991) *E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis*. Cancer Research, 51, 6328-6337.
30. Lasky L. (1992) *Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. Science, 258, 964-969.
31. Whelan J. (1996) *Selectin synthesis and inflammation*. TIBS, 21, 65-69.
32. Araki M, Araki K, Blancone L, Stamenkovic I, Izui S, Yamamura K, Vassalli P. (1997) *The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo*. Leukemia, 3, 209-212.
33. Rosen S, Bertozzi C. (1994) *The selectins and their ligands*. Curr. Opin. Cell Biol., 6, 663-673.
34. Nooijen P, Westphal J, Eggermont A, Schalkwijk C, Max R, Waal Rd, Ruiter D. (1998) *Endothelial P-selectin expression is reduced in advanced primary melanoma and melanoma metastasis*. Am. J. Pathol., 152, 679-682.
35. Carlos T, Harlan J. (1994) *Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules*. Blood, 84, 2068-2101.
36. Komatsu M, Tatum L, Altman N, Carraway C, Carraway K. (2000) *Potential of metastasis by cell surface sialomucin complex, (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein*. Int. J. Cancer, 187, 480-486.
37. Komatsu M, Yee L, Carraway K. (1999) *Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells*. Cancer Research, 59, 2229-2236.
38. Williams A, Barclay A. (1988) *The immunoglobulin superfamily domains for the cell surface recognition*. Annu. Rev. Immunol, 6, 381-405.
39. Johnson J. (1991) *Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease*. Cancer and Metastasis Reviews, 10, 11-22.
40. Johnson J, Stade B, Holzmann B, Schwable W, Riethmuller G. (1989) *De novo expression of intercellular-adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86.
41. Anastassiou G, Schilling H, Stang A, Djakovic S, Heiligenhaus A, Bornfeld N. (2000) *Expression of the cell adhesion molecule ICAM-1, VCAM-1 and NCAM in uveal melanoma: a clinicopathological study*. Oncology, 58, 83-88.
42. Becker J, Dummer R, Hartmann A, Burg G, Schmidt R. (1991) *Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and*

- tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity.* Journal of Immunology, 147, 4398-4401.
43. Gearing A, Newman W. (1993) *Circulating adhesion molecules in disease.* Immunology Today, 14, 506-512.
 44. Taichman D, Cybulsky M, Djaffar I, Longmeyer M, Teixido J, Rice S, Aruffo A, Bevilacqua M. (1991) *Tumor cell surface $\alpha 4 \beta 1$ integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1.* Cell Regul, 2, 347-355.
 45. Montgomery A, Becker J, Siu C, Lemmon V, Cheresch D, Pancook J, Zhao X, Reisfeld R. (1996) *Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin $\alpha v \beta 3$.* J. Cell. Biol., 132, 475-485.
 46. Mooy C, Luyten G, Jong Pd, Jensen O, Luidert T, Ham Fvd, Bosman F. (1995) *Neural cell adhesion molecule distribution in primary and metastatic uveal melanoma.* Hum. Pathol., 26, 1185-1190.
 47. Newman P, Gorsky J. (1987) *Molecular cloning of a 130kDa membrane glycoprotein expressed on human platelets, umbilical vein endothelial cells and human erythroleukemia(HEL) cells.* J. Cell. Biol., 105, 53-59.
 48. Newman P, Berndt M, Gorski J, White G, Lyman S, Paddock C, Muller W. (1990) *PECAM-1(CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily.* Science, 247, 1219-1222.
 49. Newman P. (1994) *The role of PECAM-1 in vascular cell biology.* Annals New York Academy of Sciences, 714, 165-174.
 50. Goldberger A, Middleton K, Oliver J, Paddock C, Yan HC, DeLisser H, Albelda S, Newman P. (1994) *Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form.* The Journal of Biological Chemistry, 269, 17183-17191.
 51. Stockinger H, Gadd S, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerck W, Strass B, Schnabl E, Knapp W. (1990) *Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31.* Journal of Immunology, 145, 3889-3897.
 52. Gumina R, Kirschbaum N, Rao P, vanTuinen P, Newman P. (1996) *The human PECAM1 gene maps to 17q23.* Genomics, 34, 229-232.
 53. Kirschbaum N, Gumina R, Newman P. (1994) *Organization of the gene for human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 shows alternatively*

- spliced isoforms and a functionally complex cytoplasmic domain.* Blood, 84, 4028-4037.
54. DeLisser H, Newman P, Albelda S. (1994) *Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.* Immunology Today, 15, 490-495.
 55. Baldwin H, Shen H, Yan H, DeLisser H, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum N, Newman P, Albelda S, Buck C. (1994) *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development.* Development, 120, 2539-2553.
 56. Stockinger H, Schreiber W, Majdic O, Holter W, Maurer D, Knapp W. (1992) *Phenotype of human T cells expressing CD31, a molecule of the immunoglobulin supergene family.* Immunology, 75, 53-58.
 57. Ashman L, Aylett G, Cambareri A, Cole S. (1991) *Expression of CD31 epitopes on human lymphocytes: CD31 monoclonal antibodies differentiate between naive (CD45RA+) and memory (CD45RA-) CD4 positive T cells.* Tissue Antigens, 38, 199-207.
 58. Jackson D, Gully L, Henshall T, Mardell C, Macardle P. (2000) *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is associated with a naive B-cell phenotype in human tonsils.* Tissue Antigens, 56, 105-116.
 59. Watt S, Williamson J, Genevier H, Fawcett J, Simmons D, Hatzfeld A, Nesbitt S, Coombe D. (1993) *The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes.* Blood, 82, 2649-2663.
 60. Tang D, Chen Y, Newman P, Shi L, Gao X, Diglio C, Honn K. (1993) *Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium.* Journal of Biological Chemistry, 268, 22883-22894.
 61. Luscinskas F, Cybulsky M, Kiely J, Peckins C, Davis V, Gimbrone M. (1991) *Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1.* Journal of Immunology, 146, 1617-1625.
 62. Shaw S, Perkins B, Lim Y, Liu Y, Nusrat A, Schnell F, Parkos C, Luscinskas F. (2001) *Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor- α plus interferon- γ*

- does not reduce leukocyte transmigration under flow.* American Journal of Pathology, 159, 2281-2291.
63. Rival Y, Maschio AD, Rabiet M, Dejana E, Duperray A. (1996) *Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in endothelial cells by the combined action of TNF- α and IFN- γ .* Journal of Immunology, 157, 1233-1241.
 64. Lastres P, Almendro N, Bellón T, López-Guerrero J, Eritja R, Bernabéu C. (1994) *Functional Regulation of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 by TGF- β 1 in Promonocytic U-937 Cells.* The Journal of Immunology, 153, 4206-4218.
 65. Zehnder J, Shatsky M, Leung L, Butcher E, McGregor J, Levitt L. (1995) *Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide.* Blood, 85, 1282-1288.
 66. Muller W, Weigl S, Deng X, Phillips D. (1993) *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.* Journal of Exp Medicine, 178.
 67. Sun Q, DeLisser H, Zukowski M, Paddock C, Albelda S, Newman P. (1996) *Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity.* The Journal of Biological Chemistry, 271, 11090-11098.
 68. Sun J, Williams J, Yan H, Amin K, Albelda S, DeLisser H. (1996) *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression.* The Journal of Biological Chemistry, 271, 18561-18570.
 69. Yan H, Baldwin H, Sun J, Buck C, Albelda S, DeLisser H. (1995) *Alternative splicing of a specific cytoplasmic exon alters the binding characteristics of murine Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1).* The Journal of Biological Chemistry, 270, 23672-23680.
 70. Muller W, Berman M, Newman P, DeLisser H, Albelda S. (1992) *A heterophilic adhesion mechanism for Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule1 (CD31).* J. Exp. Med, 175, 1401-1404.
 71. DeLisser H, Yan H, Newman P, Muller W, Buck C, Albelda S. (1993) *Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans.* The Journal of Biological Chemistry, 268, 16037-16046.

72. Albelda S, Muller W, Buck C, Newman P. (1991) *Molecular and cellular properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule*. The Journal of Cell Biology, 114, 1059-1068.
73. DeLisser H, Chilkotowsky J, Yan H, Daise M, Buck C, Albelda S. (1994) *Deletions in the cytoplasmatic domain of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1, CD31) result in changes in ligand binding properties*. The Journal of Cell Biology, 124, 195-203.
74. Famiglietti J, Sun J, Lisser HD, Albelda S. (1997) *Tyrosine residue in exon 14 of the cytoplasmic domain of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/ CD31) regulates ligand binding specificity*. Journal o Cell Biology, 138, 1425-1435.
75. Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisler R, Dunon D, Imhof B. (1995) *CD 31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha V\beta 3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium*. The Journal of Cell Biology, 130, 451-460.
76. Buckley C, Doyonas R, Newton J, Blystone S, Brown D, Watt S, Simmons D. (1996) *Identification of $\alpha v\beta 3$ as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1*. J.Cell.Sci., 109, 437-445.
77. Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello C, Prager E, Garbarino G, Dianzani U, Stockinger H, Malavasi F. (1998) *Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member*. Journal of Immunology, 160, 395-402.
78. Tanaka Y, Albelda S, Horgan K, Seventer Gv, Shimizu Y, Newman W, Hallam J, Newman P, Buck C, Shaw S. (1992) *CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of $\beta 1$ integrin-mediated adhesion*. Journal of Experimental Medicine, 176, 245-253.
79. Berman M, Muller W. (1995) *Ligation of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18)*. Journal of Immunology, 154, 299-307.
80. Berman M, Xie Y, Muller W. (1996) *Roles of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1(PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and $\beta 2$ integrin activation*. Journal of Immunology, 156, 1515-1524.
81. Chen W, Knapp W, Majdic O, Stockinger H, Böhmig G, Zlabinger G. (1994) *Co-ligation of CD31 and Fc γ RII induces cytokine production in human monocytes*. Journal of Immunology, 152, 3991-3997.

82. Chiba R, Nakagawa N, Kurasawa K, Tanaka Y, Saito Y, Iwamoto I. (1999) *Ligation of CD31(PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin and enhances $\beta 1$ integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells*. Blood, 94, 1319-1329.
83. Lu T, Yan L, Madri J. (1996) *Integrin engagement mediates tyrosine dephosphorylation on platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*. Pro.Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11808-11813.
84. Jackson D, Ward C, Wang R, Newman P. (1997) *The Protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation*. The Journal of Biological Chemistry, 272, 6986-6993.
85. Vivier E, Daëron M. (1997) *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. Immunology Today, 18, 286-291.
86. Unkeless J, Jin J. (1997) *Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases*. Curr Opin Immunol, 9, 338-343.
87. Isakov N. (1997) *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades*. J. Leukoc. Biol, 61, 6-16.
88. Isakov N. (1997) *ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery*. Immunol Res, 16, 85-100.
89. Phumphet N, Taylor V, Freeman S, Douglas M, Bradfield P, Young S, Lord J, Wakelam M, Bird I, Salmon M, Buckley C. (1999) *Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C- $\gamma 1$ with PECAM-1/CD31*. FEBS Letters, 450, 77-83.
90. Varon D, Jackson D, Shenkman B, Dardik R, Tamarin I, Savion N, Newman P. (1998) *Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets*. Blood, 91, 500-507.
91. Sagawa K, Swaim W, Zhang J, Unsworth E, Siraganian R. (1997) *Aggregation of the high affinity IgE receptor results in the tyrosine phosphorylation of the surface adhesion protein PECAM-1(CD31)*. Journal of Biological Chemistry, 272, 13412-13418.
92. Osawa M, Masuda M, Harada N, Lopes R, Fujiwara K. (1997) *Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells*. Eur.J.Cell Biol., 72, 229-237.

93. Sagawa K, Kimura T, Swieter M, Siraganian R. (1997) *The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 associates with tyrosine-phosphorylated adhesion molecule PECAM-1 (CD31)*. Journal of Biological Chemistry, 272, 31086-31091.
94. Wang R, Paddock C, Augustine J, Newman P. (1998) *Oxidative stress triggers PECAM-1 mediated signaling pathway*. Blood, 92, 548-555.
95. Hua C, Gamble J, Vadas M, Jackson D. (1998) *Recruitment and activation of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase by human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)*. Journal of Biological Chemistry, 273, 28332-28340.
96. Torimoto Y, Rothstein D, Dang N, Schlossman S, Morimoto C. (1992) *CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation*. Journal of Immunology, 148, 388-396.
97. Newman P. (1999) *Switched at birth: a new family for PECAM-1*. The Journal of Clinical Investigation., 103, 5-9.
98. Masuda M, Osawa M, Shigematsu H, Harada N, Fujiwara K. (1997) *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a major SH-PTP2 binding protein in vascular endothelial cells*. FEBS Letter, 408, 331-336.
99. Jackson D, Kupcho K, Newman P. (1997) *Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, SHP-2*. Journal of Biological chemistry, 272, 24868-24875.
100. Liao F, Huynh H, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller W. (1995) *Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1*. Journal of Exp Medicine, 182.
101. Vaporciyan A, DeLisser H, Yan H, Mendiguren I, Thom S, Jones M, Ward P, Albelda S. (1993) *Involvement of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo*. Science, 262, 1580-1582.
102. Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller W. (1994) *Monoclonal antibody to murine PECAM-1(CD31) blocks acute inflammation in vivo*. Journal of Experimental Medicine, 179, 1059-1064.
103. Christofidou-Solomidou M, Nakada M, Williams J, Muller W, DeLisser H. (1997) *Neutrophil Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 participates*

- in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation.* The Journal of Immunology, 158, 4872-4878.
104. Duncan G, Andrew D, Takimoto H, Kaufman S, Yoshida H, Spellberg J, Pompa Jd, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller W, Senaldi G, Zukowski M, Mak T. (1999) *Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1): CD 31- deficient mice reveal PECAM-1- dependent and PECAM-1-independent functions.* Journal of Immunology, 162, 3022-3030.
 105. Berger R, Albelda S, Berd D, Ioffreda M, Whitaker D, Murphy G. (1993) *Expression of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) during melanoma-induced angiogenesis in vivo.* J. Cutan. Pathol., 20, 399-406.
 106. Fawcett J, Buckley C, Holness C, Bird I, Spragg J, Saunders J, Harris A, Simmons D. (1995) *Mapping the homotypic binding sites in CD31 and the role of CD31 adhesion in the formation of interendothelial cell contacts.* Journal of Cell Biology, 128, 1229-1241.
 107. Newton-Nash D, Newman P. (1999) *A new role for Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1(CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction.* Journal of immunology, 163, 682-688.
 108. Chen Y, Schlegel P, Tran N, Thompson D, Zehnder J, Chao N. (1997) *Administration of a CD31-derived peptide delays the onset and significantly increases survival from lethal graft-versus-host disease.* Blood, 89, 1452-1459.
 109. Koch N, Moldenhauer G, Hofmann W, Möller P. (1991) *Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II-associated invariant chain (CD74).* Journal of Immunology, 147, 2643-2651.
 110. Humphrey J, Peters P, Yuan L, Bonifacino J. (1993) *Localization of TGN38 to the trans-Golgi network: involvement of a cytoplasmic tyrosine-containing sequence.* Journal of Cell Biology, 120, 1123-1135.
 111. Marsh M, McMahon H. (1999) *The structural era of endocytosis.* Science, 285, 215-220.
 112. Céfaï D, Schneider H, Matangkasombut O, Kang H, Brody J, Rudd C. (1998) *CD28 receptor endocytosis is targeted by mutations that disrupt phosphatidylinositol 3-kinase binding and costimulation.* Journal of Immunology, 160, 2223-2230.
 113. Geuze H. (1998) *The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning.* Immunology Today, 19, 282-287.

114. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York.
115. Kairiyama C, Slavutsky I, Larripa I, Morvillo V, Bravo A, Bover L, podhajcer O, Mordoh J. (1995) *Biologic, Immunocytochemical and cytogenetic characterization of two new human melanoma cells lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN*. *Pigment Cell Research*, 8, 121-131.
116. Guerra L, Mordoh J, Slavutsky I, Larripa I, Medrano E. (1989) *Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line*. *Pigment Cell Res*, 2, 504-509.
117. Jaffe E, Nachman R, Becker C, Minick C. (1973) *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria*. *J. Clin. Invest.*, 52, 2745-2752.
118. Chuluyan H, Issekutz A. (1993) *VLA-4 Integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes*. *J. Clinical Investigation*, 92, 2768-2777.
119. Romani N. (1996) *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. *J. Immunol. Methods*, 196, 137.
120. Zhang K, Chuluyan H, Hardie D, Shen D, Larsen R, Issekutz A. (1998) *Novel monoclonal antibodies to putative selectin carbohydrate ligands that inhibit selectin binding to myeloid cells*. *Hybridoma*, 17, 445-456.
121. Newman P. (1997) *The biology of PECAM-1*. *J. Clinical Investigation*, 99, 3-8.
122. Danen E, Muijen Gv, Ruiter D. (1995) *Role of integrin as signal transduction cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma*. *Cancer Surv.*, 24, 43-65.
123. Rice G, Bevilacqua M. (1989) *An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion*. *Science*, 246, 1303-1306.
124. Garofalo A, Chirivi R, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, Martin-Padura I, Anichini A, Gearing A, Sanchez-Madrid F, Dejana E, Giavazzi R. (1995) *Involvement of the very late antigen4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases*. *Cancer Research*, 55, 414-419.
125. Sheibani N, Sorenson C, Fraizer W. (1999) *Tissue specific expression of alternative spliced murine PECAM-1 isoforms*. *DevDyn*, 214, 44-54.
126. Greenspan N, Cera ED. (1999) *Defining epitopes: It `s not as easy as it seems*. *Nat Biotechnol.*, 17, 936-937.

127. Laver W, Air G, Webster R, Smith-Gill S. (1990) *Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities*. Cell, 61, 553-556.
128. Wong C, Wiedle G, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Etteldorf S, Bruckner M, Engelhardt B, Gisler R, Imhof B. (2000) *PECAM-1/CD31 trans-homophilic binding at the intercellular junctions is independent of its cytoplasmic domain; evidence for heterophilic interaction with integrin α v β 3 in cis*. Molecular Biology of the Cell, 11, 3109-3121.
129. Cramer E, Berger G, Berndt M. (1994) *Platelet α -granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1*. Blood, 84, 1722-1730.
130. Albelda S, Oliver P, Romer L, Buck C. (1990) *EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule*. The Journal of Cell Biology, 110, 1227-1237.
131. Sheibani N, Newman P, Frazier W. (1997) *Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, regulates platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 expression and endothelial cell morphogenesis..* Molecular Biology of the Cell, 8, 1329-1341.
132. Quarmby S, Kumar P, Wang J, Macro J, Hutchinson J, Hunter R, Kumar S. (1999) *Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 19, 588-597.
133. Kalra V, Shen Y, Sultana C, Rattan V. (1996) *Hypoxia induces PECAM-1 phosphorylation and transendothelial migration of monocytes*. Am. J. Physiol., 271, H2025-2034.
134. Romer L, McLean N, Yan H, Daise M, Sun J, DeLisser H. (1995) *IFN- γ and TNF- α induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells*. Journal of Immunology, 154, 6582-6592.
135. Lampugnani M, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. (1997) *Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells*. J. Cell Sci., 110, 2065-2077.
136. Sandoval I, Bakke O. (1994) *Targeting of membrane proteins to endosome and lysosomes*. Trends in Cell Biology, 4, 292-297.
137. Stubbs M, McSheehy P, Griffiths J, Bashford C. (2000) *Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment*. Mol. Med. Today, 6, 15-19.
138. Bird I, Taylor V, Newton J, Spragg J, Simmons D, Salmon M, Buckley C. (1999) *Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell*

- apoptosis but do not support cell spreading or migration*. Journal of Cell Science, 112, 1989-1997.
139. Solic N, Davies D. (1997) *Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration of colon carcinoma cells*. Exp Cell Res, 234, 465-476.
 140. Alper O, Santis MD, Stromberg K, Hacker N, Cho-Chung Y, Salomon D. (2000) *Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells*. Int. J. Cancer, 88, 566-574.
 141. Monaghan M, Mulligan K, Gillespie H, Trimble A, Winter P, Johnston P, McCormick D. (2000) *Epidermal growth factor up-regulates CD44-dependent astrocytoma invasion in vitro*. J Pathol, 192, 519-525.
 142. Sorscher S, Green M, Feramisco J. (1995) *Enhanced E-cadherin expression in epidermal growth factor receptor expressing cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 206, 518-524.
 143. Gordon C, Lloyd K. (1994) *Endocytosis and recycling of gangliosides in a human melanoma cell line: inhibitory effect of brefeldin A and monensin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315, 339-344.
 144. Le T, Yap A, Stow J. (1999) *Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics*. J. Cell Biol., 146, 219-232.
 145. Linsley P, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett K, Mitler R. (1996) *Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement*. Immunity, 4, 535-543.
 146. Gagescu R, Gruenberg J, Smythe E. (2000) *Membrane dynamics in endocytosis: structure-function relationship*. Traffic, 1.
 147. Ohno H, Stewart J, Fournier M, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino J. (1995) *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clatrin-associated proteins*. Science, 269, 1872-1875.
 148. Marks M, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino J. (1996) *Protein targeting by tyrosine and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components*. J. Cell Biol., 35, 341-354.
 149. Kirchhausen T, Bonifacino J, Riezman H. (1997) *Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 9, 488-495.

150. Johnston D, Bystryn J. (1984) *Mechanism of autodegradation of cell-surface macromolecules shed by human melanoma cells*. Experimental Cell Research, 152, 179-187.
151. Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri J. (2000) *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry., 275, 21435-21443.
152. Ilan N, Mohsenin A, Cheung L, Madri J. (2001) *PECAM.-1 shedding during apoptosis generates a membrane- anchored truncated molecule with unique signaling characteristics*. FASEB Journal, 15, 362-372.
153. Elias C, Spellberg J, Karan-Tamir B, Lin C, Wang Y, Kenna P, Muller W, Zukowski M, Andrew D. (1998) *Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils*. Eur.J. Immunol., 28, 1948-1958.
154. Nelissen I, Ronsse I, Damme JV, Opdenakker G. (2002) *Regulation of gelatinase B in human monocytic and endothelial cells by PECAM-1 ligation and its modulation by interferon-beta*. Journal of leukocyte biology, 71, 89-98.
155. Young BD, Frierson H, Ly M, Smith D, Swanson P. (1998) *CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas*. Am. J. Clin. Pathol., 110, 374-377.
156. Miettinen M, Lindenmayer A, Chaubal A. (1994) *Endothelial cell markers CD31, CD34 and BNH9 antibody to H- and Y- antigens- evaluation of their specificity and sensivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor*. Mod. Pathol., 7, 82-90.

ABREVIATURAS



Ac: Anticuerpo.
ANOVA: Análisis de varianza.
ATCC: American Type Culture Collection.
BSA: Albúmina sérica bovina.
BFA: Brefeldina A.
CD: Cluster de diferenciación.
CAM: Moléculas de adhesión celular.
Col: Colágeno.
DC: Células dendríticas.
EDTA: Etilendiaminotetracetato disódico.
ELISA: Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay.
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting.
FTTC: Isotiocianato de fluoresceína.
FN: Fibronectina.
HSA: Albúmina sérica humana.
HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.
ICAM-1: Intercellular Cell Adhesion Molecule-1.
IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
IFM: Intensidad de fluorescencia media.
IFN γ : interferón γ .
Ig: inmunoglobulina.
IL: interleuquina.
ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs.
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs.
KO: Knock out.
LM: Laminina.
LPS: Lipopolisacárido.
LB: Linfocito B.
LT: Linfocito T.
MEC: Matriz extracelular.
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule.
NK: Natural killer.
PBS: Buffer fosfato.
PECAM-1: Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule-1.
PECAM-1 i: PECAM-1 internalizada + membrana.
PECAM-1 m: PECAM-1 en membrana.
PECAM-1 t: PECAM-1 total (membrana + citoplasma).
PMNL: Leucocitos polimorfonucleares.
RPE: Ficoeritrina.
SBF: suero bovino fetal.
TGN: Trans- Golgi.
TNF α : factor de necrosis tumoral α .
Y: Tirosina.
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule.
WS on HLDA: Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens.