

## Tesis de Posgrado

# Rol de la molécula de adhesión NCAM en patologías neurodegenerativas y neuroproliferativas humanas y experimentales

Todaro, Laura Beatriz

2003

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Todaro, Laura Beatriz. (2003). Rol de la molécula de adhesión NCAM en patologías neurodegenerativas y neuroproliferativas humanas y experimentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3685\\_Todaro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3685_Todaro.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Todaro, Laura Beatriz. "Rol de la molécula de adhesión NCAM en patologías neurodegenerativas y neuroproliferativas humanas y experimentales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3685\\_Todaro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3685_Todaro.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Tesis para optar por el título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires**

**“Rol de la molécula de adhesión NCAM en patologías  
neurodegenerativas y neuroproliferativas humanas y  
experimentales”**

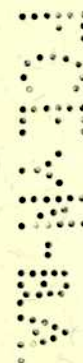
**Autora:**

**Laura Beatriz Todaro**

**Directora:**

**Dra. Lydia Inés Puricelli**

**Departamento de Biología Celular  
Área de Investigación del Instituto de Oncología Angel H. Roffo  
Universidad de Buenos Aires**



2003

№3685

**“Detrás de cada línea de llegada, hay una partida.  
Detrás de cada logro, hay otro desafío...”**

**Madre Teresa de Calcuta**

**A Ariel**

**A Alexis**

<b>Resumen en castellano</b>	5
<b>Resumen en inglés</b>	9
<b>Capítulo 1- Moléculas de adhesión</b>	12
Clasificación	12
Funciones	16
Molécula de adhesión NCAM	17
<b>Capítulo 2- Mecanismos de la progresión tumoral</b>	23
Conceptos generales	23
Etapas de la cascada metastásica	25
Rol de las moléculas de adhesión en el proceso invasivo	29
<b>Capítulo 3- Tumores del Sistema Nervioso Central</b>	31
Clasificación	31
Biología molecular de los gliomas	35
Desregulación de la proliferación celular en los gliomas	35
Formación del GBM secundario vía astrocitoma de bajo grado	37
Formación de GBM secundario vía oligodendroglioma/ oligoastrocitoma	38
Formación de GBM de novo	39
Mecanismos moleculares involucrados en la invasión local	41
Características invasivas de los tumores cerebrales	41
Degradación de la matriz extracelular asociada al fenotipo invasivo de los gliomas	44

## Indice

---

Interacciones célula - célula	46
Angiogénesis	47
<b>Capítulo 4- Marcadores tumorales</b>	<b>49</b>
Generalidades. Definición y clasificación	49
Marcadores Tumorales y su utilidad en la clínica	51
Nuevas tecnologías para el estudio de marcadores tumorales	53
Marcadores para predecir susceptibilidad tumoral	55
Marcadores de diagnóstico	56
Marcadores de estadificación	60
Marcadores de pronóstico	60
Marcadores para monitorear la enfermedad en curso	62
Marcadores predictivos o para monitorear la terapia	62
Marcadores tumorales circulantes	63
Parámetros más usados	66
Problemas asociados con el análisis de los marcadores tumorales	67
Puntos a considerar al introducir un nuevo marcador tumoral	67
Moléculas de adhesión como marcadoras oncológicas	68
NCAM como marcador tumoral	69

## Indice

---

<b>Capítulo 5- Enfermedades neurodegenerativas</b>	70
Demencia Tipo Alzheimer. Conceptos generales	70
Moléculas de adhesión en procesos neurodegenerativos	72
<b>Capítulo 6- Objetivos</b>	74
<b>Capítulo 7- Materiales y Métodos</b>	75
A) Estudios de NCAM en el modelo experimental murino de adenocarcinoma de pulmón LP07	75
Estudios <i>in vivo</i>	75
Estudios <i>in vitro</i>	78
B) Estudios del rol de NCAM sérico en patologías humanas	82
<b>Capítulo 8- NCAM en relación a la patología oncológica</b>	87
Resultados. Rol de NCAM en la progresión tumoral de la línea de adenocarcinoma de pulmón LP07	87
Estudios <i>in vivo</i>	87
Estudios <i>in vitro</i>	91
Discusión NCAM en el modelo experimental murino	97
Resultados. Valoración de NCAM sérica como molécula marcadora de tumores cerebrales humanos	104
Discusión NCAM como marcadora soluble de patologías neuroproliferativas	113

## Indice

---

<b>Capítulo 9- NCAM en relación a la patología neurodegenerativa</b>	<b>122</b>
Resultados. NCAM en relación a la patología neurodegenerativa	122
Discusión del capítulo	127
<b>Capítulo 10- Conclusiones finales</b>	<b>134</b>
<b>Capítulo 11- Bibliografía</b>	<b>136</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>149</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>150</b>

## Resumen



La NCAM pertenece a la familia de las inmunoglobulinas siendo su función más conocida la promoción de la adhesión homofilica entre células vecinas, como neuronas, astrocitos y células musculares, y de la adhesión heterofilicas entre estas células y proteínas de las matrices extracelulares. Tiene tres isoformas principales: 120, 140 y 180 kDa. Sólo la NCAM de 120 kDa carece de los dominios citoplasmático y transmembrana y se encuentra unida por anclaje fosfatidilinositol.

Una característica de la NCAM es presentar cadenas homo poliméricas de ácido siálico (PSA) unidas covalentemente. La expresión de PSA NCAM es muy abundante en el sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas postnatales pero en el adulto su expresión disminuye. La presencia de PSA en la NCAM adulta impide la adhesión celular y estimula la remodelación y plasticidad tisular.

Además la NCAM puede encontrarse en forma soluble, puesto que se ha descrito su presencia en diferentes fluidos biológicos, proponiéndola como marcador soluble para algunas patologías tumorales como el cáncer de pulmón a células pequeñas y en patologías neurodegenerativas como la esquizofrenia.

**Nuestro objetivo fue estudiar la relación de la molécula NCAM con procesos tumorales y neurodegenerativos humanos y experimentales.**

A) *Para ello estudiamos la participación de NCAM en el comportamiento biológico de la línea celular LP07, derivada de un tumor de pulmón murino de origen epitelial glandular con componente neuroendocrino. La expresión*

se evaluó en homogenatos y cultivos primarios tumorales, detectándose distintas isoformas de NCAM, cuya expresión varía a lo largo del crecimiento tumoral. Por otro lado, la disminución de metástasis experimentales con anti NCAM sugiere que esta molécula favorecería la colonización del órgano blanco.

El tratamiento de NCAM *in vitro* con anticuerpos específicos disminuyó la adhesividad, la migración y la proliferación celular al mismo tiempo que induce la reorganización del citoesqueleto de actina compatible con una reversión epitelio mesenquimática, característica de la célula tumoral.

B) Hemos estudiado el rol de NCAM sérica como marcadora tumoral en pacientes con patología cerebral benigna y maligna. Para ello en una primera etapa estudiamos por western blot y densitometría los niveles de todas las isoformas de NCAM sérica en individuos sanos apareados por edad y sexo, observando que las isoformas de bajo PM difieren con la edad de los individuos. Determinamos los niveles de las distintas isoformas de NCAM presentes en el suero de pacientes con tumores primarios del SNC: gliomas (n=34), metástasis única (n=27), tumores benignos (n=22). Las muestras de suero de cada paciente se analizaron por western blot y densitometría. La concentración de NCAM se asoció a los parámetros clínico-patológicos indicadores de pronóstico, así como con la evolución clínica de cada paciente. Se detectaron bandas específicas de alto ( $\geq 130$ kDa) y bajo PM ( $< 130$ kDa). Se encontró que el cociente  $\geq 130$ kDa /  $< 130$ kDa está aumentado en los pacientes con tumores cerebrales vs controles sanos (diferencias independientes de edad y sexo). No se encontró diferencia entre pacientes

con tumores benignos o malignos NCAM sérico mostró una especificidad del 80% y una sensibilidad del 60%, con un VP+ del 60% y VP- del 80% para identificar pacientes con tumores cerebrales. En una segunda muestra post cirugía fue posible encontrar una disminución de los valores séricos de NCAM en 9 de 12 pacientes analizados.

C) *Hemos medido los niveles de NCAM sérico en pacientes con déficit cognitivo como la Demencia tipo Alzheimer (DTA).* Las patologías neurodegenerativas presentan niveles séricos elevados de todas las isoformas de NCAM. Además se observó un aumento específico de la NCAM <130kDa asociada al grado de deterioro cognitivo de los pacientes DTA por lo tanto podría ser útil como marcador de seguimiento del paciente, lo cual facilitaría el diagnóstico y el tratamiento en etapas tempranas.

NCAM is an adhesion molecule which belongs to the immunoglobulin superfamily and mediates both homophilic binding between neighbour cells like neurons, astrocytes and muscular cells; and heterophilic binding between these cells and proteins from the extracellular matrix. NCAM presents three major isoforms: 120, 140 and 180 kDa. Only NCAM 120 kDa is linked to the membrane via a glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) anchor and lacks cytoplasmic and transmembrane domains.

NCAM has sialic acid (PSA) homo polymeric chains covalently bond. PSA NCAM expression is highly expressed in central nervous system during embryonic development and post natal early stages but the PSA expression is down regulated in adult tissues. The presence of PSA NCAM in adults prevents cellular adhesion and stimulates tissular remodelling and plasticity. In addition NCAM exist in a soluble form, since its presence has been described in several biological fluids. Some authors proposed soluble NCAM as a diagnostic marker for tumoral pathologies like small cells lung cancer (SCLC) and neurodegenerative pathologies including schizophrenia.

**Our objective was to study the relationship between NCAM molecule and experimental and human tumoral and neurodegenerative processes.**

A) We study the role of NCAM in biological behaviour of the cellular line LP07, derived from a murine lung tumor with neuroendocrine component. The NCAM expression was evaluated in homogenates and tumoral primary

cultures. Several NCAM isoforms were detected whose expression varies through tumoral growth. On the other hand, decrease of experimental metastasis with anti NCAM suggests that this molecule is implicated in target organ colonization.

In vitro NCAM treatment with specific antibodies diminishes adhesion, migration and cellular proliferation while induces actine cytoskeleton reorganization, compatible with mesenchematic epithelial reversion.

B) We have study the roll of serum NCAM as a tumoral marker in patients with benign and malign brain pathology. First, we determine the levels of serum NCAM isoforms in healthy individuals paired by sex and age by western blot and densitometry. Low Molecular Weigh NCAM bands (100-130kDa) decreased significantly with age independently of sex. Then, we determine NCAM isoforms levels in serum from primary brain tumor patients: gliomas (n=34), brain metastasis (n=37) and benign tumors (n=22). NCAM values were associated with clinico-pathological prognostic parameters, as well as clinical evolution of each patient. There were detected specific bands of high ( $\geq 130$  kDa) and low molecular weigh ( $< 130$  kDa). It was observed that the ratio  $\geq 130 / < 130$  kDa is increased in patients vs control. It was no differences between benign and maligns tumors. NCAM showed a sensitivity of 60% and a specificity of 80%. The PV+ was about 60% and the PV- was 80% for brain tumors patients' identification. In a post surgery sample we detected decreased serum values of NCAM in 9 of 12 patients.

C) We have measure serum NCAM levels in patients with cognitive deficit like Dementia of Alzheimer Type (DAT). DAT patients presented values of all isoforms significantly higher than healthy controls of similar age. Only low molecular weight NCAM isoforms were associated with GDS, which may be useful as follow up marker. This marker would allow the diagnostic and treatment in early stages.

# Capítulo 1

## Moléculas de adhesión

En 1824 Dutrochet informó acerca de la capacidad que poseen los leucocitos de adherirse a las paredes de los vasos y de migrar a los tejidos circundantes. Este primer informe sobre moléculas que permiten la adhesión celular a otros tejidos ha abierto una rama muy importante dentro de la investigación celular básica. Posteriormente, se han aislado y purificado una gran cantidad de moléculas de adhesión celular (CAMs) a partir de las cuales se han podido interpretar muchas de las interacciones celulares en una gran variedad de tejidos embrionarios y adultos, normales y patológicos.

Hasta la fecha las moléculas de adhesión se han agrupado en cuatro clases principales: las cadherinas, las selectinas, las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (Roche P et al).

Las Cadherinas son una familia de glicoproteínas tipo I que median la adhesión célula-célula en una forma dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tienen un largo dominio extracelular, un segmento transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático, que interacciona con el citoesqueleto a través de moléculas especializadas, las Cateninas. El dominio extracelular contiene cinco módulos de alrededor de 100 aminoácidos dispuestos en tandem, en cuyos extremos aminos se encuentra tanto la actividad adhesiva de la molécula como el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Las cadherinas presentan un tipo de unión homofílica, aunque recientemente se ha encontrado que también pueden unirse a dos Integrinas, las  $\alpha\text{E}\beta 7$  y la  $\alpha 2\beta 1$  (Nagar B et al).

Se han identificado por cristalografía de rayos X dos tipos de Cadherinas las E y las N (Humphries y Newham). La aparente similitud



estructural y funcional que presentan estas moléculas con la superfamilia de las inmunoglobulinas, podría ser el resultado de una evolución divergente donde el evento de duplicación de un gen originó diferentes especializaciones dentro de cada familia. Otros autores sostienen que la presencia de hojas plegadas  $\beta$ , una estructura explotada por la naturaleza más de una vez y presente en estas moléculas, sugiere un mecanismo de evolución convergente (Shapiro L et al).

Las Selectinas presentan tres miembros homólogos tipo I: las L, presentes en los leucocitos, las E en el endotelio y las P en las plaquetas. Estas moléculas de adhesión contienen en el extremo amino terminal un módulo tipo lectina que media las interacciones catiónicas con los carbohidratos (uniones heterofílicas). Luego le sigue un motivo en tandem similar a una secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las Selectinas presentan además un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático. El ligando natural de las mismas no está completamente caracterizado pero se cree que es un oligosacárido sulfatado o sialilado (Humphries y Newham).

Las Integrinas son la principal familia de receptores que median tanto interacciones célula-célula como célula-matriz extracelular (ME). Estas son moléculas heterodiméricas, conteniendo una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , ambas glicoproteínas transmembrana tipo I. Existen diferentes heterodímeros, cada uno de los cuales presenta distinto perfil de unión al ligando. Un ejemplo es la fibronectina, quien constituye el principal ligando de la ME para las Integrinas por afinidad a su motivo RGD. En los últimos años se ha encontrado que otro motivo, el LDV presente en las inmunoglobulinas,

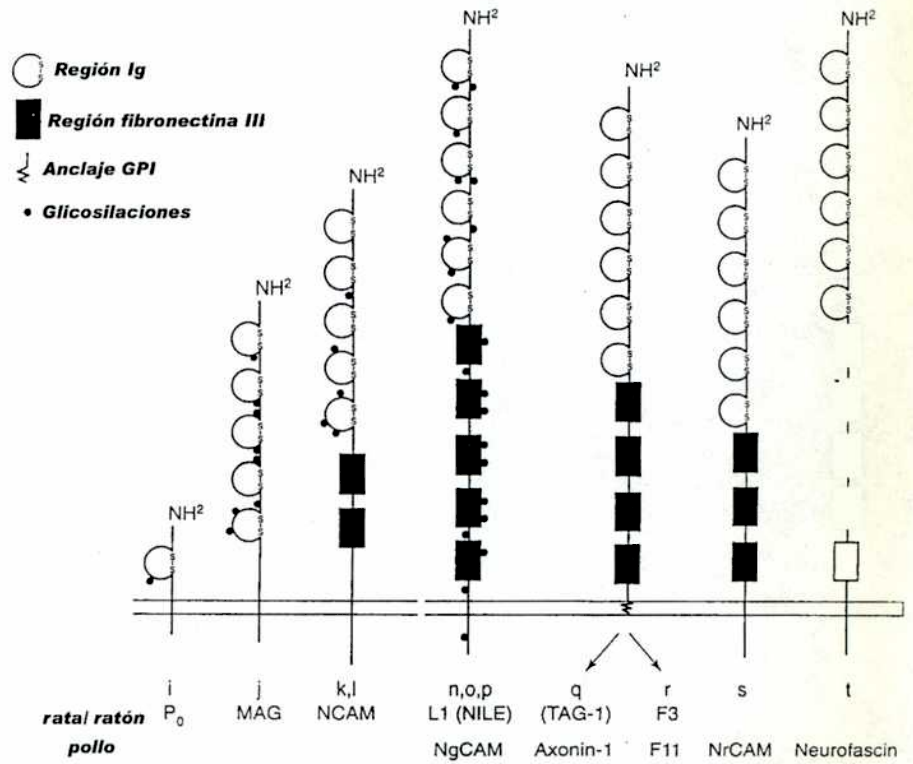
## Capítulo 1

---

también sirve como sitio activo para la unión con las Integrinas. Otros ligandos de las Integrinas son las VCAM (molécula de adhesión vascular) una proteína endotelial que es un substrato para la extravasación de los leucocitos y la ICAM (molécula de adhesión intercelular) la cual participaría en la recirculación de los linfocitos (Newham P y Humphries, Jones E et al, Casasnovas J et al).

La Superfamilia de las Inmunoglobulinas median interacciones homofílicas y heterofílicas, presentando dominios característicos Ig en la zona extracelular (figura 1.1). Algunas moléculas de esta superfamilia están ancladas a la membrana mediante un glicosilfosfatidilinositol, GPI, en cambio otras poseen una porción citoplasmática involucrada en la transducción de señales pudiendo estar relacionadas al citoesqueleto (Hampel et al). A esta superfamilia pertenecen: L1 y TAG1 presentes en la superficie axonal de las neuronas, MAG expresadas en los oligodendrocitos y células de Schwann, P<sub>0</sub> en las células de Schwann y la NCAM a la cual nos referiremos en forma especial más adelante en este capítulo.

Figura 1.I. Superfamilia de las Inmunoglobulinas



k Edelman, G.M. et al. (1983) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48, 515-526  
l Harrelson, A.L. and Goodman, C.S. (1988) *Science* 242, 700-708  
m Walsh, F.S. and Doherty, P. (1991) *Semin. Neurosci.* 3, 271-284  
n Moos, M. et al. (1988) *Nature* 334, 701-703  
o Burgoon, M.P. et al. (1991) *J. Cell Biol.* 112, 1017-1029  
p Bieber, A.J. et al. (1989) *Cell* 59, 447-460  
q Sonderegger, P. and Rathjen, F.G. (1992) *J. Cell Biol.* 119, 1387-1394  
r Brummendorf, T. et al. (1989) *Neuron* 2, 1351-1361  
s Grumet, M. et al. (1991) *J. Cell Biol.* 113, 1399-1412  
t Volkmer, H. et al. (1992) *J. Cell Biol.* 118, 149-161  
u Edelman, G.M. and Crossin, K.L. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 155-190  
v Burden-Gulley, S.M. and Lemmon, V. (1995) *Semin. Dev. Biol.* 6, 79-87  
w Vaughn, D.E. and Bjorkman, P.J. (1996) *Neuron* 16, 261-273  
x Rutishauser, U. (1995) *Semin. Dev. Biol.* 6, 97-104

Moléculas de adhesión independientes de calcio

## **Funciones**

Cientos de moléculas interactúan en forma cooperativa para modular la adhesión celular. Aunque muchas moléculas de adhesión han sido identificadas, la mayor parte de ellas provienen de un limitado número de genes, que da lugar a distintas moléculas que inducen la unión estable célula-célula, median el contacto entre célula-ME, o establecen interacciones transitorias pro-migratorias permitiendo a las células moverse dentro de su medio ambiente.

· Así, las Cadherinas *in vivo* actúan en la organización de los tejidos sólidos, participando en la morfogénesis, en etapas tempranas del desarrollo del embrión, y manteniendo la integridad del tejido.

Las Selectinas median la adhesión, dependiente de carbohidratos, de los leucocitos a células endoteliales y plaquetas, y por lo tanto participan de la migración leucocitaria y del proceso inflamatorio.

Las funciones biológicas de las Integrinas son muy diversas, desde anclar a los queratinocitos a la membrana basal epidérmica hasta mediar el pasaje de los leucocitos a través del endotelio. Participan de la morfología y reparación tisular, motilidad, proliferación y diferenciación celular. La distribución y actividad de las integrinas puede ser regulada dinámicamente a través de la membrana plasmática, por combinación de cambios conformacionales y formación de clusters.

Dentro del complejo grupo de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas podemos mencionar que participan en la migración, elongación y fasciculación neuronal (L1 y TAG1), que median la interacción entre la glia y

el axón (MAG) o que participan en la compactación de la mielina en las células de Schwann como la P<sub>0</sub>.

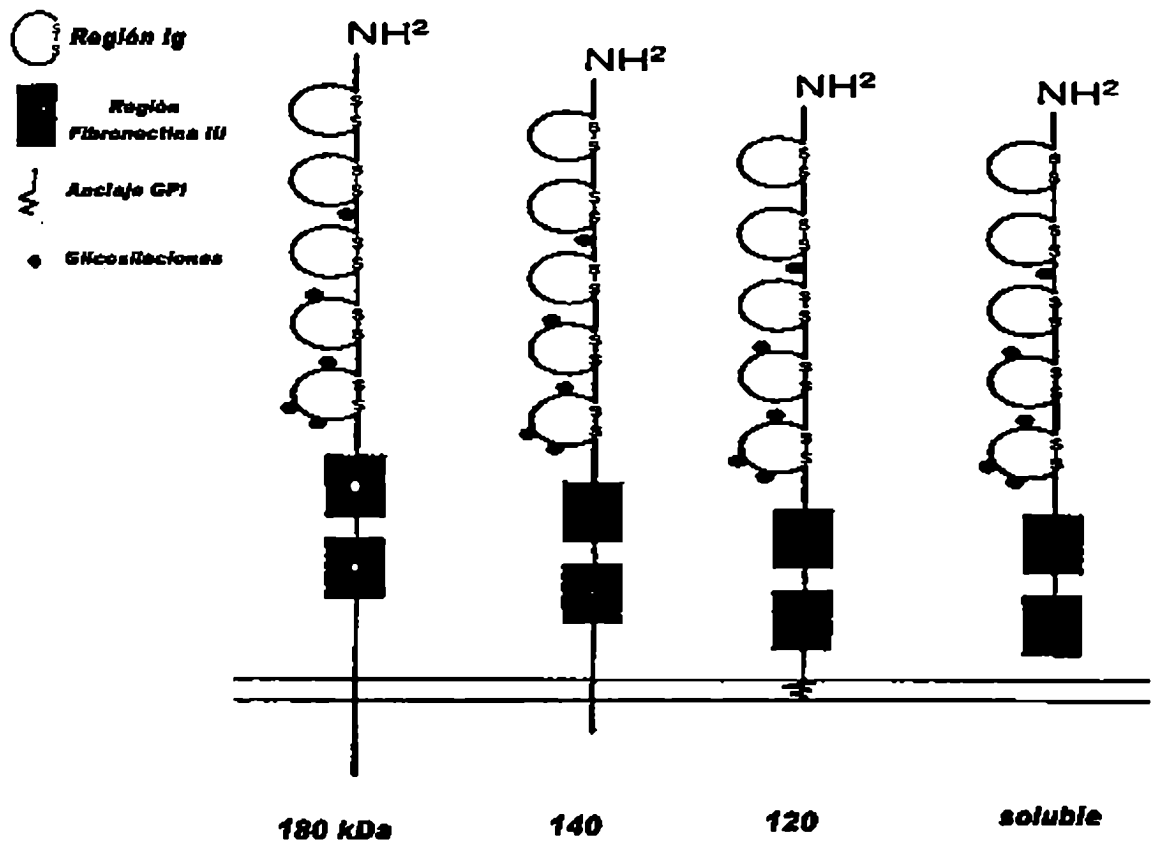
### **Molécula de adhesión NCAM**

Las moléculas NCAM pertenecen a la superfamilia de las Inmunoglobulinas y son capaces de promover la adhesión neurona-neurona a través de interacciones homofílicas, asociándose a la estabilización de las uniones sinápticas y a la fijación del aprendizaje y de participar en el crecimiento axónico, la histogénesis de la retina y del desarrollo del sistema olfatorio (Cremer et al).

Las moléculas NCAM se encuentran ancladas en la membrana celular y presentan una porción citoplasmática posiblemente asociada a la transducción de señales a través de una vía tirosina-quinasa (Hampel H et al).

La NCAM es codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 11 en humanos y en el 9 en murinos. Por splicing alternativo de un ARN mensajero inmaduro se producen tres isoformas mayoritarias: las NCAM de 120, NCAM de 140 y NCAM de 180 kDa (Rønn L et al; Ricard C et al). Mientras la NCAM de 120 kDa carece de un dominio citoplasmático y está anclada a la membrana a través de una unión covalente con un fosfatidilinositol, las de 140 y 180 kDa presentan dominios transmembrana y citoplasmático. También se ha encontrado formas de NCAM solubles de las cuales hablaremos más adelante (figura 1.II).

Figura 11l. Isoformas de la molécula de adhesión neural NCAM.



La molécula de adhesión neural NCAM es codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 11 y por splicing alternativo se producen tres isoformas mayoritarias: NCAM de 120, NCAM de 140 y NCAM de 180 kDa.

También se ha demostrado que NCAM tiene ligandos heterofílicos, como proteoglicanos tipo heparan sulfato (Hampel H et al). La NCAM puede interactuar con la molécula de adhesión L1 y con el receptor FGF. Por otro lado, la NCAM 180 kDa se une a través de la espectrina al citoesqueleto, mientras que la NCAM 140 kDa se une a p59 fyn y se asocia a la quinasa de adhesión focal FAK (Crossin et al).

Las moléculas NCAM sufren modificaciones post- traduccionales dando lugar a distintas isoformas (Goridis y Brunet), cuya existencia no ha podido ser interpretada hasta la fecha. Todas las isoformas presentan cinco dominios tipo inmunoglobulina (Ig) y dos dominios tipo Fibronectina III. NCAM es una molécula altamente glicosilada presentando seis sitios de N-glicosilación (Crossin et al). Algunos ensayos de agregación realizados con porciones solubles de cada uno de los dominios globulina, demostraron que la NCAM participa de la unión homofílica célula-célula de manera antiparalela y que con un péptido recombinante de la IgIII se puede inhibir la proliferación glial *in vivo* e *in vitro* en forma similar a la NCAM intacta (Todd S et al).

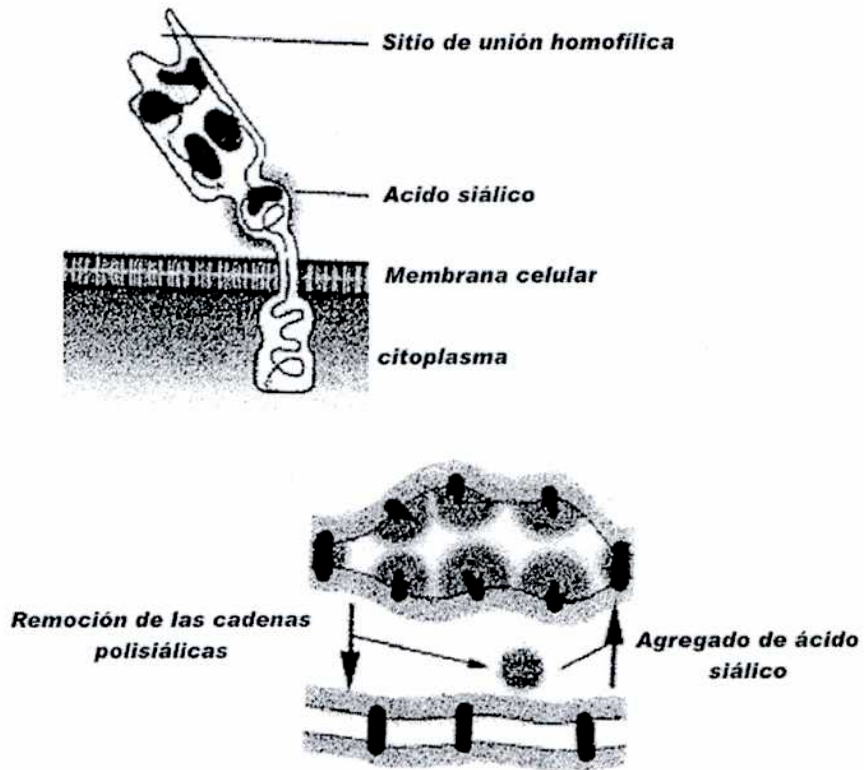
En el sistema nervioso de los vertebrados, la NCAM posee largas cadenas homopoliméricas de Ácido Siálico (PSA), un carbohidrato de 10 carbonos con cargas negativas. Así, una NCAM altamente glicosilada presenta aproximadamente un 30% de ácido siálico. Estas secuencias polisiálicas están unidas covalentemente a tres sitios del quinto dominio globulina de la NCAM. Estudios experimentales han demostrado que los ratones que no expresan NCAM son viables, pero presentan dramáticos

defectos en el aprendizaje, memoria y comportamiento, explicados por la pérdida de ácido siálico, asociado a la NCAM dado que es la principal carrier de esta estructura (Crossin et al).

La PSA NCAM se expresa abundantemente en el sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo embrionario y en las primeras etapas post-natales (Hampel H et al, Ni Dhuill C et al; Seki y Arai). En el cerebro adulto, la expresión de la PSA NCAM es regulada negativamente y confinada a unas pocas áreas, como el sistema olfativo y el sistema fibrilar del hipocampo, caracterizadas por un alto nivel de remodelación estructural. Se propone que la regulación negativa de la PSA NCAM acompaña un cambio en la función de esta proteína, desde promover la plasticidad hasta la de estabilizar las uniones celulares. Acorde a esta hipótesis, la presencia de largas cadenas de PSA sobre la NCAM inhibe la adhesión celular desfavoreciendo las interacciones homofílicas de la proteína, facilitando la migración de las células embrionarias y permitiendo el remodelamiento estructural (Rønn L et al, Osborne M et al) (figura 1.III).



Figura 1.III. Esquema de la interacción homofílica mediada por NCAM



La presencia de largas cadenas de PSA sobre la NCAM inhibe la adhesión celular desfavoreciendo las interacciones homofílicas de la proteína.

En el adulto la NCAM se expresa predominantemente en neuronas y en células gliales (Nybroe O et al). También se expresa en músculo (Moore and Walsh), médula adrenal (Langley O y Aunis D), pituitaria anterior (Langley O et al) e islotes pancreáticos (Langley O et al).

Existen fuertes evidencias que la NCAM no sólo se encuentra asociada a la membrana celular, sino que también puede presentarse en forma soluble. Estas formas han sido descritas en medios condicionados provenientes de células nerviosas o musculares y en diferentes fluidos corporales (Thomaidou D et al; Bock E et al, Lynch D et al; Poltorak M et al; Rutishauer U et al; Ibsen S et al; Bock E. et al y Cole G. et al). Esta forma soluble podría ser liberada por proteasas o por la actividad de una fosfolipasa. Algunos estudios han evidenciado que la forma soluble de NCAM puede ser generada a partir de la forma de 120 kDa, anclada a membrana por GPI, como resultado de un clivaje hidrolítico (Gower et al), aunque otros investigadores demostraron que en cultivos de cerebro de rata, donde había liberación de NCAM, la NCAM soluble es diferente de la isoforma de 120 kDa (Bock E et al).

## Capítulo 2

Cáncer: enfermedad de múltiples etapas.

### **Mecanismos de la progresión tumoral**

El cáncer es un proceso de múltiples etapas en el cual los controles normales de proliferación celular y de interacción célula-célula se encuentran alterados, llevando a la célula tumoral a un crecimiento descontrolado, a la capacidad de inducir neovascularización y a la adquisición de un fenotipo invasivo.

Los factores que regulan el crecimiento de una célula tumoral pueden ser producidos por la propia célula maligna (factores autócrinos) y/o por las células del microambiente (factores parácrinos). Estas moléculas interactúan con receptores específicos de la célula tumoral, los activan e inducen respuestas que van desde la inducción de proteínas relacionadas con el control de la proliferación hasta la modulación de la expresión de componentes de las ME, controlando su síntesis y/o degradación, y al estímulo de la invasividad celular. Estos factores podrían actuar también indirectamente modulando la respuesta del huésped ya sea mediante el estímulo de la angiogénesis o la supresión de la respuesta inmune.

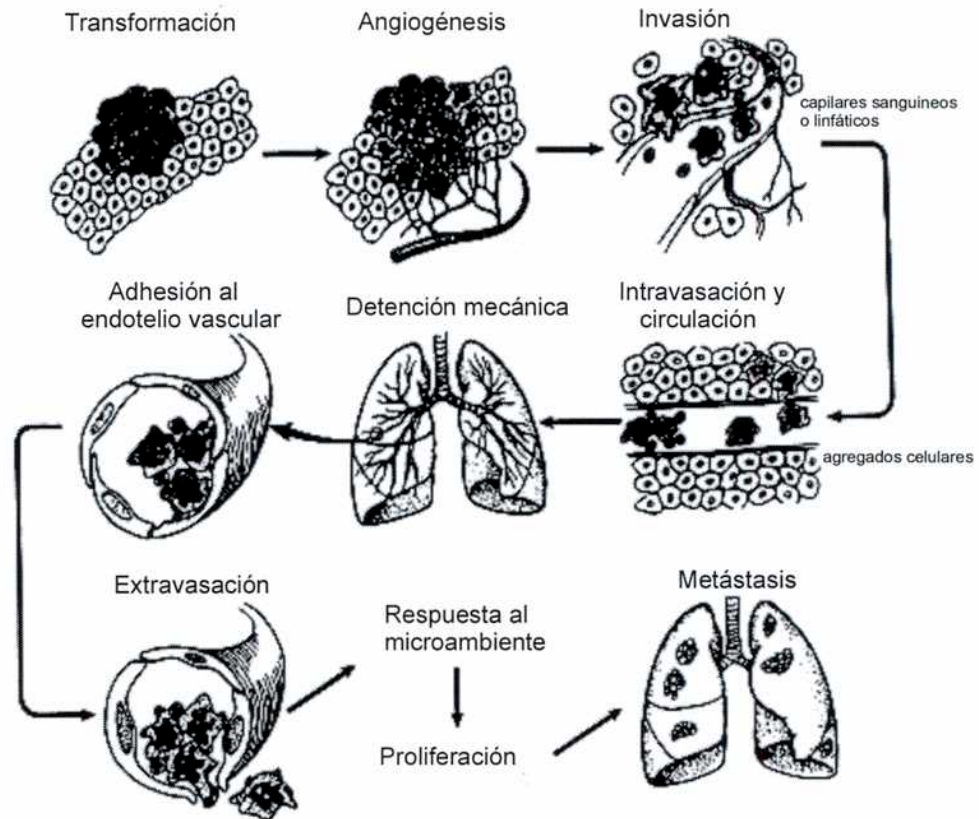
La capacidad de las células neoplásicas de desprenderse de tumor primario permite la invasión de los tejidos vecinos por continuidad o contigüidad, facilita su intravasación y de este modo, favorece uno de los aspectos más insidiosos de la patología tumoral: la colonización de órganos alejados del sitio primario, lo cual constituye un proceso fisiopatológico de profunda relevancia clínica. La diseminación metastásica provoca en el paciente un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que ensombrece el pronóstico del paciente oncológico.

La adquisición de fenotipo invasor metastásico depende la capacidad de la célula tumoral para adherirse a la ME, degradar sus componentes y luego, migrar a través de esa matriz parcialmente degradada. La repetición cíclica de estos tres procesos permite a la célula tumoral penetrar los tejidos vecinos (Liotta et al).

La migración celular es una propiedad importante también en condiciones normales, por ejemplo durante la embriogénesis, la implantación del trofoblasto, el desarrollo u organización del SNC, la invasión controlada de monocitos, linfocitos y neutrófilos, la remodelación de la glándula mamaria al concluir el proceso de lactancia y en circunstancias fisiopatológicas tales como la neovascularización que ocurre en la retinopatía diabética y la artritis reumatoidea, en procesos inflamatorios y en reparación de heridas, entre muchos otros (Matrisian L et al, Prince J et al, Nicolson G et al).

Tanto la invasión como la metástasis (MTS) representan dos enormes obstáculos para el tratamiento de las neoplasias. La MTS es un proceso ineficiente, si consideramos que son pocas las células malignas que logran sobrevivir una vez que han alcanzado la circulación. Este proceso dinámico, complejo, selectivo, resultante de una sucesión de etapas múltiples y dependiente de la interacción entre factores producidos tanto por el huésped como por el tumor, no es estrictamente de naturaleza impredecible, dado que un tumor determinado tiende a colonizar órganos específicos (Schirmacher V et al) (Figura 2.I).

FIGURA 2.1 Esquema de la cascada metastásica (modificado de DeVita et



al).

Para generar metástasis las células tumorales se deben desprender del tumor primario, invadir la ME y entrar en la circulación, detenerse en los lechos capilares, adherirse a la membrana basal subendotelial, entrar en el parénquima del órgano blanco, responder a factores de crecimiento autócrinos o parácrinos y proliferar. De esta manera, se puede concluir que la "Cascada Metastásica" es un proceso complejo que consiste en múltiples etapas secuenciales, selectivas e interdependientes donde intervienen tanto factores de la célula tumoral como factores del huésped.

### Etapas de la cascada metastásica

En 1889 Stephen Paget propuso, luego de una detallada revisión del historial de la distribución metastásica de pacientes con cáncer de mama y otros tumores, una novedosa teoría para explicar la razón de la especificidad del órgano huésped de las MTS. Paget sugirió que la célula neoplásica se comporta como una semilla que puede diseminarse en toda dirección llevada por el viento (circulación sanguínea) y que necesita un “suelo” compatible, es decir, un órgano que le proporcione las condiciones necesarias y suficientes para establecerse, crecer y proliferar. Esta teoría de “suelo-semilla” propone que las MTS no se distribuyen al azar, cumpliendo el órgano blanco un papel activo en su formación.

Mas tarde, hacia el año 1928, Ewing propuso la llamada teoría anátomo- mecánica, la cual propone que las conexiones vasculares del tumor primario son las que determinan las vías de diseminación y los sitios donde las células se extravasarán, estableciéndose de este modo el patrón metastásico. Actualmente se acepta que ambas teorías no son mutuamente excluyentes y que ambas contribuyen a explicar la forma de colonización de un tumor asociada con la progresión tumoral (Rusciano D et al).

La invasión es un fenómeno multifacético que involucra interacciones célula-célula y célula-ME. Esta se inicia con la adhesión de la célula neoplásica a la ME, seguida por la disolución o desorganización de las matrices por enzimas proteolíticas y finalmente por la migración celular a través de la ME alterada. En este complejo proceso participan numerosas moléculas con actividades específicas como moléculas de adhesión y sus receptores (CD44, NCAM, integrinas y proteoglicanos de membrana),

factores promotores de la motilidad, componentes estructurales de la ME (laminina, fibronectina) y enzimas proteolíticas como las serino, cisteíno y metalo-proteasas.

Se ha demostrado que la célula maligna presenta una inapropiada expresión de las moléculas involucradas en la invasión normal. Esto permite pensar que la diferencia fundamental entre células normales y tumorales podría estar al nivel de la regulación de la expresión de estas moléculas. Así, se ha propuesto que el empleo de inhibidores específicos del proceso invasivo (como por ejemplo anticuerpos neutralizantes) podrían tener utilidad en la clínica como anti-metastásicos.

Para que la célula invada es necesario que pueda migrar en forma activa a través de la ME desorganizada por la acción de las proteasas. En muchos modelos se observó que las células tumorales más invasivas y metastásicas muestran un mayor grado de motilidad. Las células tumorales pueden migrar en forma direccional en respuesta a gradientes de concentración de factores solubles (quimiotaxis) o bien hacia proteínas insolubles de la ME (haptotaxis). Entre los agentes que estimulan la capacidad migratoria de la célula tumoral se encuentran factores secretados por la propia célula tumoral, componentes de la ME, factores de crecimiento, etc. Los factores estimulantes de la migración varían de acuerdo al tipo tumoral. Así, por ejemplo los tumores astrocíticos migran sobre una amplia variedad de componentes de ME, mientras que los tumores neuroectodérmicos primitivos parecen ser más restrictivos, ya que migran preferentemente sobre laminina, fibronectina o colágeno tipo IV.



En las distintas etapas de la cascada metastásica también están involucradas diversas clases de enzimas proteolíticas (familias de serino, cisteíno, aspárico proteasas, metaloproteasas, glicosilasas y ADAMs involucradas en la proteólisis pericelular). Se conoce que las células tumorales producen mayor cantidad de estas enzimas que las células normales de igual estirpe (Mac Dougall J et al, De Clerck Y et al, Boyer M et al).

En los últimos años se ha acumulado evidencia suficiente que permite asociar a las metaloproteasas (MMPs) con los procesos de invasión tumoral y metástasis. En particular, la MMP2 o gelatinasa A de 72 kDa y la MMP9 también denominada Gelatinasa B de 92 kDa son las más estrechamente vinculadas a estos procesos demostrado en varios modelos experimentales y numerosos ensayos clínicos (Werb Z et al; Matrisian L et al, Garbisa S et al). Estas enzimas son hasta el presente, las más importantes en la degradación del colágeno tipo IV, principal componente de las membranas basales.

Se conoce que las MMPs no sólo están asociadas a los procesos degradativos, sino que participan en la progresión tumoral desde las etapas iniciales de la misma. Así, su actividad es requerida para el desarrollo y mantenimiento de un microambiente adecuado que facilita la proliferación, la angiogénesis y la invasión en el lugar de desarrollo del tumor primario. Las MMPs favorecen la intravasación, ya sea como célula aislada o en clusters, y la extravasación a partir de la microvasculatura. Una vez alcanzado el parénquima del órgano blanco, los mecanismos antes descritos para lograr la eficiencia de invasión y crecimiento en los sitios de establecimiento de

tumores secundarios se repiten (Nelson AR et al; Massova I et al, Chambers A et al, Kadono Y et al).

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), es una serino proteasa que participa junto con las MMPs en la degradación de la ME. Por activación del plasminógeno a plasmina, permite que las pro MMPs se activen y produce su propio clivaje. El precursor inactivo del uPA, es secretado como una proteína soluble y se une con mucha afinidad a su receptor (uPAR) de la membrana celular presente en las células invasivas. Estos receptores localizados principalmente entre las interacciones célula-célula, focalizan la actividad del uPA cerca de la membrana plasmática donde es utilizado para guiar el frente de invasión. El sistema uPA-uPAR también está asociado con la proliferación, la adhesión, migración y diferenciación celular, independientemente de su actividad catalítica, probablemente por interacciones del uPAR con el citoesqueleto mediadas por integrinas. Ossowski y Aguirre, Todaro L et al). Por lo tanto el uPA como las MMPs tienen ambos un rol importante en la diseminación de la cascada metastásica, compartiendo vías de señalización dependiente de calcio que regulan su producción (Aguirre J et al, b).

### **Rol de las moléculas de adhesión en el proceso invasivo**

Los factores de adhesión pueden ser sintetizados por las propias células tumorales o bien estas células pueden utilizar factores de adhesión ya presentes en las matrices.

Las moléculas de adhesión establecen el contacto tanto con las células vecinas como con la ME. La función de estas moléculas abarca tanto el contacto estable célula –célula como célula – ME, como interacciones migratorias que permiten el movimiento celular.

Las cadherinas son una familia de glicoproteínas dependientes de calcio cuya función es mediar la adhesión célula a célula a través de uniones homotípicas. De esta manera, las cadherinas, *in vivo* organizan la formación de tejidos sólidos tanto epiteliales como endoteliales. Mutaciones en los genes codificantes para las cadherinas resultan en desdiferenciación celular y en la inducción de malignidad.

Las selectinas son moléculas que median la adhesión dependiente de carbohidratos entre los leucocitos y las células endoteliales y plaquetas. Por otro lado, las integrinas son una familia de receptores de adhesión que se unen tanto a ligandos de la superficie celular como a ligandos de la ME. Contrariamente a las cadherinas que median interacciones estables y a las selectinas que favorecen interacciones transcientes, las integrinas pueden restringir o promover el movimiento celular. Gracias a la combinación de cambios conformacionales y de agrupamientos de las integrinas, las células pueden utilizarlas tanto para controlar la fuerza como el tipo de adhesión (Humphries y Newham).

## Capítulo 3

### Tumores del Sistema Nervioso Central

Los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) ocurren con una incidencia de aproximadamente 6 por 100000 habitantes en los países desarrollados. Si bien esta incidencia es baja, la mayoría de estos tumores son muy agresivos y prácticamente incurables. En nuestro país (Argentina) la tasa de mortalidad es de 2,8 para los varones y de 2,1 para las mujeres (período 1997-2001) (Matos E et al). La alta tasa de mortalidad convierte a estos tumores poco frecuentes en la tercera causa de muerte en hombres de 15 a 51 años de edad y en mujeres de 15 a 34. En los niños menores de 15 años, el impacto del cáncer en el SNC es aún más pronunciado ya que los tumores primarios de cerebro son los tumores sólidos más frecuentes y es la segunda causa de muerte después de la leucemia.

Los tumores del SNC pueden dividirse en:

- tumores intracraneales primarios,
- tumores cerebrales primarios y
- tumores metastásicos.

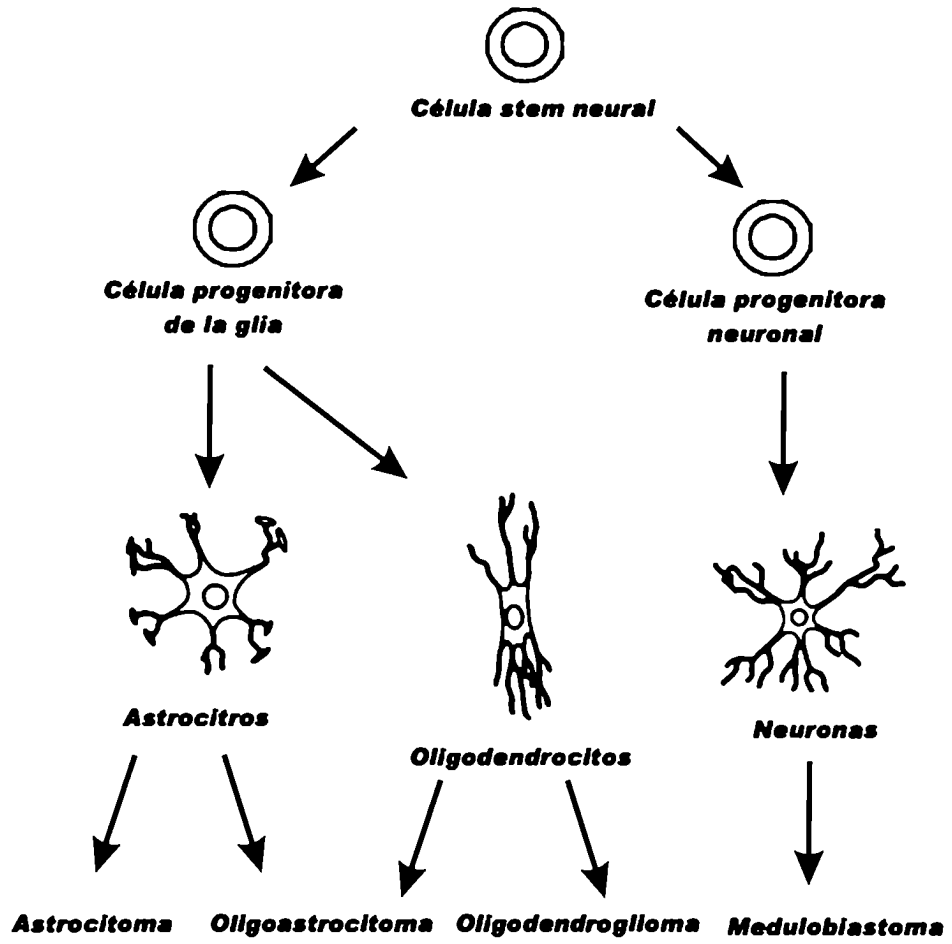
Una dificultad diagnóstica deriva de la amplia gama de aspectos histológicos que presentan estas neoplasias. Este hecho puede dar lugar a la presencia de similitudes morfológicas importantes entre tumores de muy diferente origen y pronóstico.

Los tumores malignos del SNC más comunes derivan generalmente de la glia, ya sea de astrocitos, oligodendrocitos o de células ependimales, y se denominan gliomas. Aunque estos tumores raramente dan metástasis,

muestran una marcada propensión a la invasión del tejido nervioso contiguo. Subpoblaciones tumorales con características no muy bien estudiadas, pueden dar lugar a la recurrencia tumoral local luego de la resección del tumor primario y del tratamiento adyuvante.

Los tres tipos de gliomas más frecuentes son: los astrocitomas, cuyas células tienen un fenotipo astrocítico, los oligodendrogliomas, con fenotipo oligodendrocítico y los oligoastrocitomas que poseen características fenotípicas de ambos. Los ependimomas (gliomas compuestos por células ependimales) son menos frecuentes y se diferencian en su comportamiento biológico de los anteriores (figura 3.1).

Figura 3.1. Tumores malignos derivados del SNC



*Clasificación de tumores derivados de células neuroectodérmicas del*

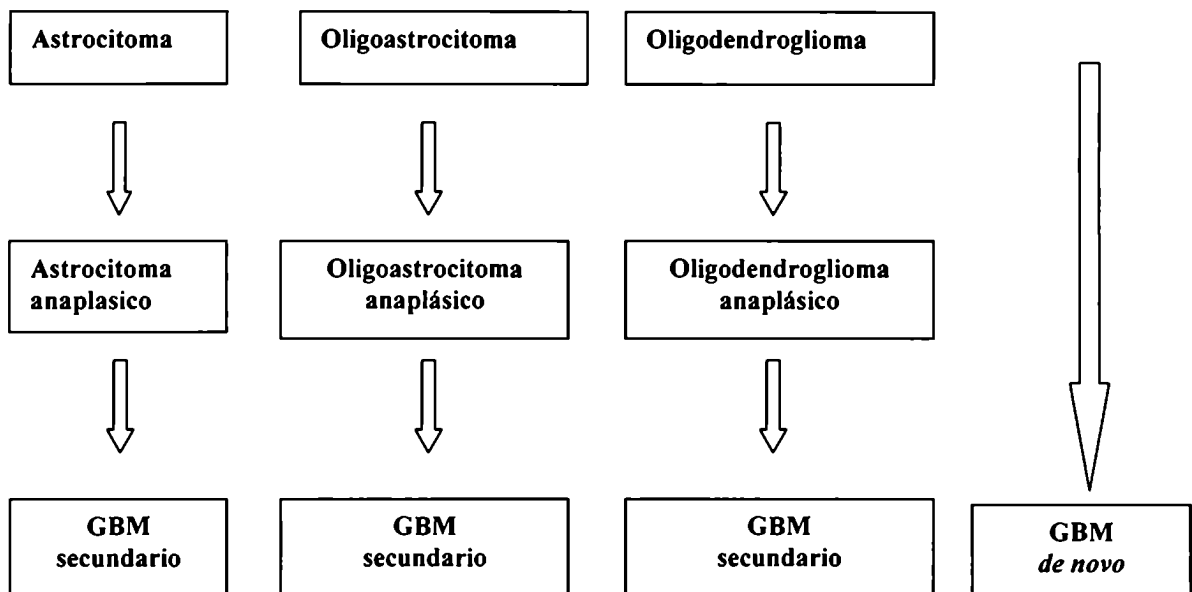
*SNC.*

En cuanto a sus características histopatológicas los gliomas se dividen, en tres grados: bajo o difuso (OMS grado II), anaplásico (Grado III) y Glioblastoma Multiforme (GBM) (Grado IV). Si bien, en general, el pronóstico de estos pacientes es malo, hay variación en la evolución de cada uno de ellos. Estudios randomizados multicéntricos han identificado la edad, el status performance y los tipos histológicos como los determinantes más importantes en la sobrevida de pacientes con gliomas malignos. En general, los pacientes más jóvenes, con tumores no astrocíticos de bajo grado, tienen mejor pronóstico. Sin embargo, los pacientes más jóvenes con tumores de bajo grado frecuentemente recurren con tumores de alto grado. Por esta razón es de enorme interés determinar las bases biológicas de la progresión maligna en gliomas.

El GBM, la forma más maligna, refiere su nombre a la heterogeneidad histopatológica que posee. En los últimos años se ha determinado que los GBMs pueden surgir en forma secundaria a partir de gliomas de bajo grado de cualquiera de los tres tipos (astrocitomas, oligoastrocitomas u oligodendrogliomas), incluso pueden desarrollarse años después del diagnóstico inicial de tumor de bajo grado. Sin embargo, los GBMs también pueden surgir *de novo* sin una historia de lesiones precursoras de bajo grado siendo más frecuentes en individuos de más edad (figura 3.II). Si bien el punto final en ambos casos es el desarrollo de un tumor con características histopatológicas similares, los eventos genéticos que llevan a la formación y progresión de los GBMs son diferentes, como se detallará en el punto siguiente (Louis D y Gusella J).



**Figura 3.II: Formación y progresión de los GBMs.**



*Si bien los glioblastomas multiformes poseen un tipo histológico característico, estos pueden evolucionar a partir de distintos tipos de gliomas o bien pueden surgir de novo. Esto implica la existencia de múltiples caminos en la progresión de los tumores malignos de cerebro.*

### **Biología molecular de los gliomas**

#### **Desregulación de la proliferación celular en los gliomas. Conceptos generales**

Una célula normal posee una serie de controles que aseguran su proliferación. Muchas de las mutaciones o alteraciones genéticas observadas en tumores del SNC ocurren en genes que controlan el ciclo celular, lo cual induce la división celular descontrolada. El impulso exagerado

a dividirse y crecer está promovido tanto por la activación de oncogenes como por la inactivación de supresores (Rempel S et al, Stiles C).

Los cambios moleculares en los gliomas implican alteraciones de los factores de crecimiento (GFs) y sus receptores (pe. los receptores para el GF derivado de plaquetas -PDGF- y para el factor de crecimiento epidérmico -EGF-) como oncogenes y en genes ubicados en distintos cromosomas como supresores tumorales.

La interacción entre GFs y sus receptores específicos sobre la membrana celular activa señales intracitoplasmáticas intermediarias que transducen la señal al núcleo, donde la decisión de dividirse o no está regulada a su vez por diversos factores (Finn P et al). Entre los efectores positivos que promueven la división se encuentran las llamadas quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Las quinasas son enzimas capaces de fosforilar una proteína sustrato y por ende modificar su funcionalidad biológica. Las CDK se activan al formar complejos con moléculas llamadas ciclinas siendo las más importantes las que regulan la entrada en ciclo, llamadas Ciclinas G1 (pe. las Ciclinas D1, D2, D3 reguladoras del punto de restricción R en G1) y las llamadas Ciclinas G2 (pe. la Ciclina B necesaria para que la célula entre en la mitosis). Otros efectores positivos son los proto-oncogenes MDM2 y PAX5.

Los efectores negativos incluyen a los inhibidores de CDK (CDI) p16, p15 y p21 y a los supresores tumorales Rb (Retinoblastoma) y p53 (Dirks P y Rutka J).

### **Formación del GBM secundario vía astrocitoma de bajo grado**

La formación del astrocitoma de bajo grado o grado II de la OMS está asociado con al menos tres alteraciones: inactivación del supresor p53, la activación del sistema PDGF/PDGFR y la pérdida de genes supresores tumorales sobre el Cr 22q. La pérdida de este cromosoma se observa entre el 20-30% de los astrocitomas, sugiriendo la existencia de un supresor tumoral aún no identificado.

En una tercera parte de los astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos y GBMs se ve mutada una copia de p53 y deletado el otro alelo. En estos tumores se ha observado también bloqueo de la función p53 en forma secundaria por alteración de moléculas que regulan su funcionamiento como MDM2. Algunos astrocitomas acumulan p53 normal o "wild type" (p53<sup>wt</sup>) en su núcleo, un fenómeno que es más común en los tumores de alto grado. Esta acumulación probablemente refleje una respuesta fisiológica de p53 al aumento del daño en el ADN. Estos tumores, además de acumular p53<sup>wt</sup>, expresan mayor cantidad de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

La transición hacia astrocitoma anaplásico está asociada con la inactivación de genes supresores en los Cr 9p, 13q y 19q asociadas con pérdidas alélicas en estos cromosomas. La pérdida del Cr 13q ocurre en aproximadamente la tercera parte de los tumores de alto grado y el gen involucrado parece ser el Rb. La proteína Rb es importante para que la célula prosiga en G1, por lo tanto su supresión elimina un punto importante en la regulación del ciclo celular.

La gran mayoría de las líneas celulares de gliomas muestran deleciones homocigotas sobre el gen del supresor p16, regulador de Rb (Cr 9p). Aunque también podría estar involucrado el gen del supresor p15, ya que los dos bandean en zonas muy próximas.

El posible gen supresor localizado en el Cr 19q es de particular importancia por dos razones, primero porque la pérdida del Cr 19q parece ser única y sólo relacionada con los gliomas y por otro lado porque esta pérdida es compartida por otros GBMs secundarios.

Finalmente, la progresión de los astrocitomas anaplásicos a GBM está asociada con la pérdida del Cr 10p y 10q (Ng H y Lam P).

#### **Formación de GBM secundario vía oligodendroglioma/oligoastrocitoma**

Los oligodendrogliomas y los oligoastrocitomas son los gliomas menos comunes. En estos tumores raramente se observa amplificación de oncogenes. La mayoría de los trabajos reportan pérdidas alélicas preferentemente sobre los Cr 1p y 19q afectando al 40-80% de estos tipos tumorales. A causa de la pérdida frecuente de estos loci aún en oligodendrogliomas y oligoastrocitomas de bajo grado, se supone que los supresores tumorales presentes en 1p y 19q son probablemente importantes en la tumorigénesis oligodendroglioma.

Se ha reportado en oligoastrocitomas pérdidas alélicas sobre el cromosoma 17p, no asociada con mutaciones en p53, quizá implicando la existencia en gliomas de un segundo supresor sobre este cromosoma.

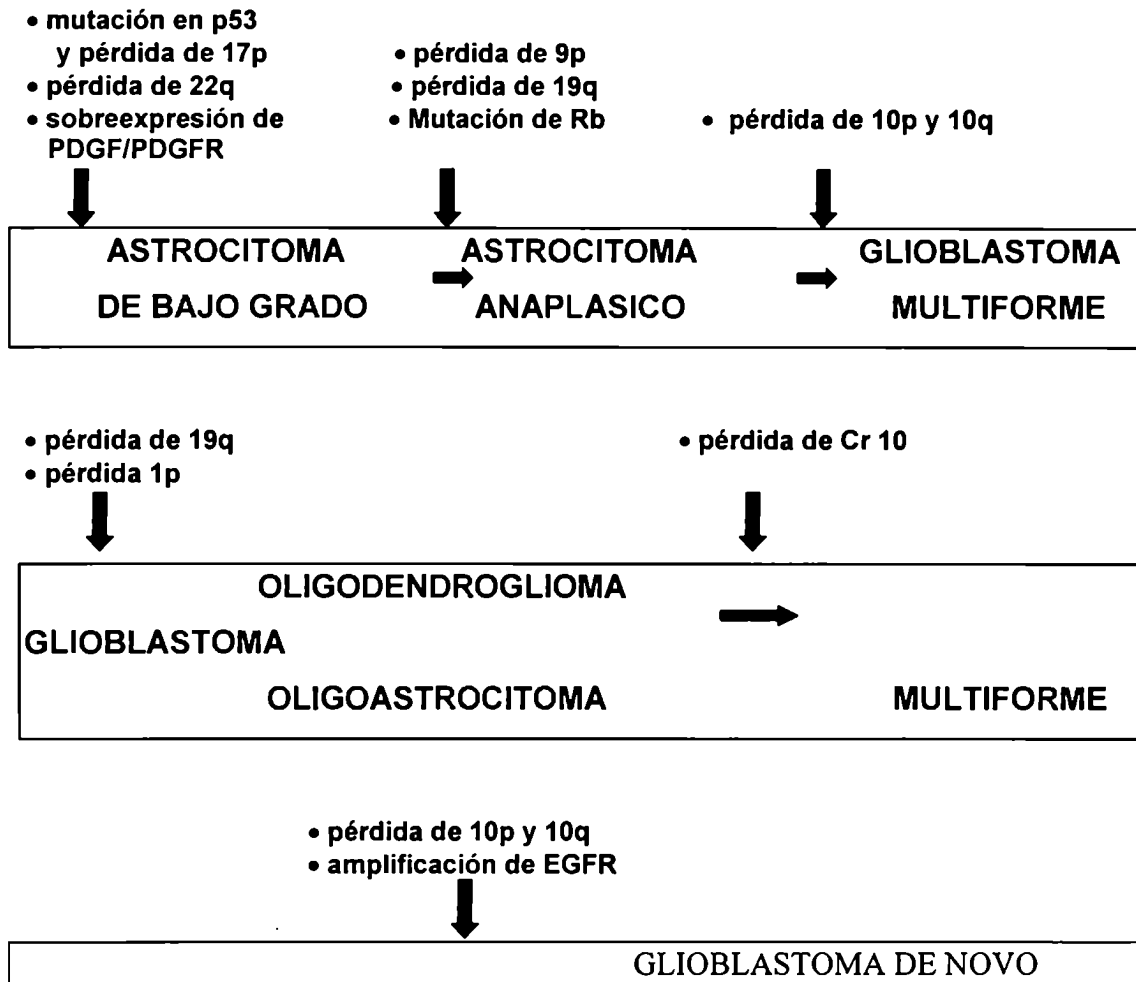
Los oligodendrogliomas y oligoastrocitomas muestran además pérdidas alelicas sobre los Cr 9p y 10, loci que probablemente estén relacionados con la progresión de los gliomas a GBM (Ng H y Lam P).

### **Formación de GBM *de novo***

La entidad GBM *de novo* está asociado con la inactivación de un posible gen supresor tumoral sobre el cromosoma 10 y con la amplificación de EGFR, cambios que se observan muy raramente en astrocitomas anaplásicos u otros gliomas de bajo grado. El EGFR está amplificado en aproximadamente el 40% de los GBMs, la tercera parte de los cuales producen una proteína truncada que es biológicamente activa. Se ha observado que todos los GBMs que tienen amplificación de EGFR también muestran pérdida del Cr 10.

En la figura 3.III se esquematiza en forma sencilla, los distintos caminos de progresión a GBM. En resumen los gliomas malignos pueden provenir de astrocitomas de bajo grado via inactivación de p53 asociada a la activación del sistema PDGF/ PDGFR, *de novo* o rápidamente vía alteración de EGFR y p53 o de neoplasias oligodendrogliales a través de alteraciones en el Cr 1 y 19. Desde ya que la suposición de que todos los gliomas progresan en forma lineal a través de distintos estadios genéticos es una simplificación, puesto que no todos los GBMs muestran la totalidad de los cambios descriptos (Ng H y Lam P).

**Figura 3.III. Alteraciones moleculares asociadas a la progresión de los gliomas.**



*Esquematización de los múltiples caminos genéticos que llevan al desarrollo de un Glioblastoma Multiforme.*

Los GBMs con inactivación de p53 ocurren en individuos más jóvenes que los GBMs con amplificación en EGF-R. Los GBMs en adultos jóvenes tienen a menudo una historia previa de astrocitoma de bajo grado. Estas observaciones son consistentes con la noción que los GBMs asociados con alteraciones en p53 son secundarios. Por otro lado, los gliomas que muestran amplificaciones de EGF-R ocurren típicamente en personas

mayores, sin historia de astrocitoma de bajo grado precedente. Por lo tanto, la amplificación de EGF-R asociada a GBM, podría llegar por una vía de novo (Brocks C y Bower M).

Como se observa en la figura 3.III una alteración común a todos los GBMs es la pérdida del Cr 10 que ocurre en el 60-85% de los GBMs. En la mayoría de los casos hay pérdidas alélicas de todo el cromosoma. Los mapas de deleción sugieren un primer gen supresor sobre el brazo largo y un segundo, menos común, que involucra un supresor sobre el brazo corto (Ng H y Lam P).

Se están realizando estudios tratando de correlacionar las características fenotípicas de los gliomas con el comportamiento de los tumores. Si esto es así, se abre la posibilidad de avances en el diagnóstico y tratamiento, basados en parámetros biológicos más objetivos (Sehgal A)

Las alteraciones genéticas específicas en los tumores del SNC y las consecuencias en procesos fundamentales como crecimiento, invasión y angiogénesis, permitirá avances en el diagnóstico, pronóstico y desarrollo de estrategias terapéuticas que redundarán en un mejor manejo de estos pacientes (Brocks C y Bower M).

### **Mecanismos moleculares involucrados en la invasión local**

#### **Características invasivas de los tumores cerebrales**

En general los tumores malignos muestran propensión a desarrollar metástasis en otros órganos. Sin embargo, los tumores de origen cerebral

están confinados al SNC y es sumamente raro la formación de tumores secundarios a distancia. Por otro lado, sólo en el 5-9% de los pacientes con otras neoplasmas primarias (por ejemplo, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón), se observan metástasis cerebroespinales, los cuales en general son focos tumorales satélites que muchas veces se ubican dentro del espacio subaracnoideo.

Si bien las metástasis cerebrales son lesiones bien definidas, los gliomas, aún en estadios tempranos, invaden el parénquima cerebral normal en forma difusa. En general, esta infiltración sigue estructuras anatómicas bien definidas, como los tractos de fibras mielinizadas y los vasos sanguíneos. Incluso en los gliomas altamente diferenciados, no existe una clara demarcación con el tejido normal adyacente. Esta propiedad, sumada al hecho de que las células tumorales presentan características similares a la de la glía reactiva, impide la remoción total del tumor y representa la principal causa del fracaso terapéutico.

Los mecanismos que facilitan la invasión de las células neurales neoplásicas en el tejido normal contiguo comienzan a entenderse gracias al aporte de la biología celular y molecular. El crecimiento y la invasión tumoral dependen del microambiente e intervienen interacciones complejas entre los tejidos del huésped y las células tumorales. Una vez adquirido el fenotipo invasivo, la recurrencia asociada con la progresión tumoral es casi inevitable.

Dado que es difícil el estudio de los aspectos biológicos dinámicos de la invasión de los tumores cerebrales usando cortes histológicos de biopsias quirúrgicas o tejido de autopsias, se han desarrollado varios modelos experimentales. Los modelos en animales resultan poco útiles a causa de la



baja incidencia y alta latencia de los tumores cerebrales inducidos por carcinógenos químicos. Por otro lado, los tumores transplantables tienen una alta capacidad proliferativa y producen daños por expansión y no por invasión como en los tumores espontáneos. Por lo tanto se han diseñado una serie de modelos *in vitro*, como el uso de cultivos tridimensionales para el estudio de invasión que permite agregar al medio de cultivo distintas sustancias tratando de modular el potencial invasivo. Estos ensayos han permitido la identificación de factores exógenos involucrados en los comportamientos migratorios e invasivos como por ejemplo algunos factores de crecimiento (bFGF, EGF, TGF $\beta$  y gangliósidos) que estimulan el comportamiento invasivo de líneas de glioma animales no invasivas.

Por otro lado, se han desarrollado varias técnicas para observar e identificar en modelos experimentales las células de glioma capaces de invadir para lo cual las células tumorales se marcan con sustancias vitales o con marcadores genéticos (Proteína Verde Fluorescente (GFP)) (Pilkington G et al).

Como se mencionó en el capítulo 2, el fenotipo invasor requiere la coordinación de varios procesos incluyendo la modulación de la degradación de la ME, las interacciones célula-ME y los contactos célula-célula (Thorgeirsson U et al).

## **Degradación de la matriz extracelular asociada al fenotipo invasivo de los gliomas**

La adquisición del fenotipo invasivo depende en parte de la capacidad de la célula tumoral de desorganizar las ME al degradar sus componentes, permitiendo la migración celular. Además, las enzimas facilitan el movimiento de las células al romper los sitios de anclaje que la adhieren a moléculas de la ME (Pilkington G).

Como se indicó en el capítulo 2, una de las familias de enzimas más fuertemente asociada al proceso invasivo es la de las Metaloproteasas (MMPs). Estas son enzimas dependientes de átomos de zinc y calcio, que se secretan como zimógenos y se activan in vitro mediante tratamientos ácidos, por la remoción autoproteolítica del extremo amino-terminal, por el bloqueo de inhibidores tisulares de MMP endógenos o por quelantes de calcio (EDTA)

De todas las MMPs, la MMP 2 de 72 kDa y la MMP 9 de 92 kDa son las enzimas más fuertemente vinculadas con el fenotipo invasor. Varios autores han encontrado aumentada su expresión en tumores cerebrales respecto al correspondiente tejido normal. Los niveles de estas enzimas se asociaron fuertemente con el grado de invasividad del tumor. Forsyth y colaboradores estudiaron actividad de MMP 2 y 9 en GBMs. Sólo detectaron MMP 2 en su forma activa en los casos raros de GBMs con metástasis extraneurales.

El empleo de inhibidores de MMPs reduce la invasividad de células de glioma. Esto abre la posibilidad de su uso en el tratamiento y control de los tumores del SNC (Pilkington G et al).

No sólo las MMPs se han asociado con el fenotipo invasor de los gliomas. Otras enzimas implicadas son el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y la cisteína proteasa Cathepsina B (Pilkington G, et al).

La invasividad de los gliomas está facilitada por la interacción de las células con la ME. La ME del SNC está constituida por laminina, fibronectina, heparan sulfato, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos. Las células tumorales son capaces de sintetizar estos componentes.

El ácido hialurónico (AH) puede modular tanto el crecimiento como la invasión de las células de glioma. CD44 es el principal receptor celular para AH y es una glicoproteína transmembrana cuya porción citoplasmática interactúa con el citoesqueleto. CD44 pertenece a una familia polimórfica de glicoproteínas que puede encontrarse en su forma standard o hematopoyética (CD44H) o como variantes (CD44v, 1 a 10) originadas por "splicing" alternativo de sus 10 exones. Algunos autores han demostrado que ciertas isoformas (v6) confieren capacidad metastásica al ser transfectadas en células tumorales no metastásicas. Aún no se han identificado los mecanismos por los cuales estas moléculas afectarían la capacidad metastásica. Sin embargo, ciertas evidencias indican que CD44 actuaría a través de la alteración de la adhesión intercelular y del aumento de la motilidad celular.

En algunos tumores humanos la expresión de variantes de CD44 podría ser un marcador muy útil de pronóstico. En nuestro laboratorio se ha realizado un estudio sobre 59 tumores cerebrales donde se demostró que los gliomas expresan CD44H, pero no las variantes 3, 4-5 y 6. El análisis de datos indica una asociación significativa entre alta expresión de CD44H y alto grado de malignidad tumoral, siendo esta variable independiente de las otras variables de pronóstico estudiadas (Ranunolo SM et al).

La capacidad de la célula tumoral de adherirse y migrar está mediada también en parte por las integrinas.

El complejo uPA y su receptor (uPAR) se encuentra aumentado en gliomas. El uPAR es, además, el receptor para vitronectina y el complejo uPA-uPAR es capaz de unirse a las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , modulando, no sólo la actividad enzimática de uPA, sino también la interacción de la célula tumoral con la ME. Así, células de GBM humanas transfectadas *in vitro* de tal forma que son incapaces de sintetizar uPAR son menos invasivas (Varela M, et al)

### **Interacciones célula - célula**

La migración celular está influenciada, también, por la pérdida de los contactos célula-célula. Entre las moléculas de adhesión que se encuentran alteradas en gliomas se destaca la molécula de adhesión DCC (nombre que alude a su delección en el carcinoma colónico). Esta proteína transmembrana se expresa en el 94% de los gliomas de bajo grado y en el 66% de los GBMs. La pérdida de la expresión del gen DCC podría contribuir a la

progresión de astrocitomas, presumiblemente a través de la ruptura de los contactos célula-célula.

El gen PTEN, que codifica para una proteína fosfatasa que interacciona con los filamentos de actina en zonas de la membrana plasmática que se encuentran adheridas fuertemente al sustrato (zonas de contacto focal), se encuentra alterado en gliomas. Su alteración podría modular las interacciones célula-célula y por ende modular la invasividad.

Los datos *in vitro* indican que las células de astrocitoma NCAM negativas migran más eficazmente que las células NCAM positivas. Esta regulación negativa del gen NCAM favorecería la invasión tumoral. Datos obtenidos a partir de células de glioma creciendo en cultivo sugieren que la expresión disminuida de NCAM embrionaria de alto PM no sólo se asocia a una mayor disgregación celular sino también con un aumento en la secreción de MMPs.

Los gangliósidos pertenecen a una familia de glicolípidos ubicados en la membrana plasmática, caracterizados por poseer residuos de ácido siálico. Su significado biológico no ha sido bien estudiado, pero se cree que juegan un papel importante en el desarrollo del tejido nervioso. En tumores cerebrales se comunicó un incremento de su expresión, sobre todo de GM3 y GD3 (Gratsa A et al).

### **Angiogénesis**

Para que el tumor pueda crecer es necesario que se desarrollen nuevos vasos a partir de los preexistentes (neoangiogénesis). Este proceso

se ha asociado con la expresión inapropiada de factores angiogénicos, como un aumento de factores estimuladores y/o la pérdida de factores inhibitorios.

La trombospondina-1 es un potente inhibidor de la angiogénesis, expresado en tejido cerebral normal y en astrocitomas de bajo grado. La expresión de esta molécula está regulada por un gen ubicado en el Cr 10. El aumento de angiogénesis observado en los gliomas de alto grado se correlaciona con la pérdida del Cr 10 y con una consecuente falta de trombospondina.

También se ha observado en los tumores del SNC un aumento en los efectores positivos de la angiogénesis. Se ha comunicado una sobreexpresión del gen que codifica para VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). La expresión de VEGF y la densidad vascular son factores pronósticos de sobrevida y se han asociado con el edema peritumoral en meningiomas.

Otros efectores positivos de la angiogénesis que se encuentran frecuentemente desregulados son: EGFR en meningiomas y  $\beta$ FGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) en schwannomas, meningiomas y gliomas (Thorgeirsson U et al).

## **Capítulo 4**

### **Marcadores tumorales**

### **Generalidades. Definición y clasificación**

Se consideran marcadores tumorales a aquellas sustancias que pueden cuantificarse objetivamente a nivel tisular (biopsia tumoral o pieza de resección quirúrgica) o en distintos fluidos fisiológicos (suero, plasma, orina, saliva) o patológicas del paciente (derrames pleurales, pericárdico, ascitis, contenidos de quistes). La utilidad de esta determinación es variada dependiendo del tipo de patología tumoral y de las características del marcador, permitiendo entre otros por ejemplo facilitar el diagnóstico tumoral, seleccionar la aplicación de un esquema terapéutico específico, predecir el pronóstico del paciente y establecer el origen de las metástasis en el caso de un primario desconocido. Algunos marcadores tumorales son de gran ayuda en la caracterización anatomopatológica de tumores de estirpe dudosa, problema que plantean los tumores anaplásicos o poco diferenciados y la metástasis de primario desconocido (Costa J et al). Muchas moléculas, incluyendo antígenos asociados a tumor, enzimas, metabolitos, productos de oncogenes, o de supresores tumorales y el mismo material genético (ADN genómico o mitocondrial, alteraciones microsatelitales, pérdida de heterocigosis), pueden ser potencialmente útiles como marcadores tumorales.

El proceso que media desde el laboratorio de investigación hasta la aplicación de los biomarcadores en poblaciones humanas es complejo. A partir del conocimiento de algunos aspectos del comportamiento biológico de los tumores malignos, se evalúa la eventual utilidad de factores producidos por las células tumorales, o por células vecinas estimuladas por éstas, como



posibles marcadores tumorales. Finalmente, luego de someter a este potencial marcador a una serie de pruebas y contrapruebas, se intenta alcanzar las disciplinas clínicas, donde el biomarcador en cuestión deberá ser contrastado con métodos tradicionales y de esta manera demostrar su verdadero valor práctico. La eventual utilidad clínica de los marcadores biológicos está relacionada con la posibilidad de proporcionar información adicional a los métodos clínicos, radiológicos y de laboratorio convencionales (Gómez D et al).

Así la conclusión definitiva respecto de cada biomarcador en particular surgirá del análisis multidisciplinario, incluyendo los campos biológicos, anatomopatológico, clínico y epidemiológico.

El primer marcador tumoral fue descrito a mediados del siglo XIX por Sir Henry Bence Jones, quien reportó la presencia de una proteína en la orina de pacientes con mieloma (Rustin G (a) y (b)). Esta proteína, hoy en día conocida con el nombre de quien la descubriera (proteína de Bence Jones), corresponde a la cadena liviana de la IgG producida en exceso por las células plasmáticas o plasmocitos con alto grado de diferenciación celular. La Ig monoclonal, presente en el plasma de los pacientes con mieloma, recibe el nombre de Proteína M y puede evidenciarse mediante una corrida electroforética. Casi ochenta años más tarde en 1928, se descubre la gonadotropina coriónica humana (HCG) y su asociación con los tumores de origen trofoblástico, por Ascheim y Zondeck (Rustin G (b)). A partir de aquellos primeros hallazgos y hasta el presente, el número de moléculas propuestas como potenciales marcadores se ha incrementado en forma notoria particularmente en estos últimos años.

### **Marcadores Tumorales y su utilidad en la clínica**

En los últimos años muchos investigadores se han abocado a la búsqueda de marcadores tumorales ya que permitirían entre otras cosas, anticiparse a las manifestaciones de déficit funcional del paciente cuando las posibilidades curativas son mucho mayores.

El mejor marcador tumoral depende de la información que se busca:

- 1- Predecir *SUSCEPTIBILIDAD TUMORAL*
- 2- Establecer o confirmar un *DIAGNOSTICO*
- 3- Lograr una mejor *ESTADIFICACIÓN*
- 4- Dar información *PRONOSTICA*
- 5- Monitorear la *ENFERMEDAD EN CURSO*
- 6- Dirigir (*PREDICTIVO*) o monitorear la *TERAPIA*
- 7- Predecir el *SITIO* de recurrencia
- 8- Estudiar la *BIOLOGÍA* de un determinado tumor

De acuerdo a cuál es el problema a resolver se emplean distintos tipos de marcadores:

**Marcadores Inmunológicos:** se basan en la utilización de una batería de anticuerpos para establecer un perfil de reactividad contra proteínas o factores que las células tumorales pueden presentar, como ser:

- Expresión de Antígenos embrionarios o fetales
- Pérdida o ganancia de la expresión de algún/os antígenos

- Alteración del antígeno (moléculas incompletas, estructuralmente aberrantes o con diferencias conformacionales respecto de las encontradas en la célula normal).

Algunos de los problemas técnicos que surgen del uso de estos marcadores son evitar las reactividades cruzadas, lograr especificidad y sensibilidad considerando la heterogeneidad del tumor.

Marcadores moleculares: se basa en la identificación de genes, ARN mensajeros, o proteínas a través de diversas técnicas específicas (southern, northern o western blot respectivamente).

Así, los tumores linfoides pueden ser clasificados según su pertenencia al linaje de células B o T, basados en la presencia de los rearrreglos de los genes de las inmunoglobulinas o de los receptores T.

Un ejemplo de marcador molecular es el análisis del gen Bcl2 el cual puede ser un marcador de translocación indicativo del Linfoma folicular de célula B.

Otro ejemplo es la identificación de un ARN mensajero de 8,5 Kb, a través de la técnica de northern blot, responsable de la proteína de fusión de 220 kDa que se genera como producto de la translocación 9:22 en la LMC (leucemia mieloide crónica).

Marcadores citogenéticos: se basan en detectar mutaciones cromosómicas como fisiones, translocaciones, fusiones etc. Por ejemplo en la LMC, donde existe una translocación 9:22, se puede detectar un cromosoma pequeño (Cromosoma Philadelphia) correspondiente al residuo del cromosoma 22.

## **Nuevas tecnologías para el estudio de marcadores tumorales**

En los últimos años se desarrollaron nuevas tecnologías para el estudio de marcadores patológicos, como los microarrays, SAGE y proteomics.

La tecnología basada en los microarreglos o microarrays, consiste en la inmovilización o síntesis de ácidos nucleicos en alta densidad sobre un soporte sólido, el cual se usa como detector de una sonda complementaria marcada en forma fluorescente. Esta sonda puede ser un cDNA sintetizado a partir de los ARN mensajeros provenientes de tejidos o células y que se marcan en forma diferente según se trate de una muestra de un paciente o control. Dado que cientos de genes pueden ser inmovilizados en una superficie sólida, puede usarse para monitorear al mismo tiempo secuencias polimórficas del ADN, genotipos, mutaciones o cambios en la abundancia de los ARN mensajeros, provenientes de muestras biológicas, como tejidos o fluidos orgánicos (De Risi J y Iyer V, Miller L et al).

El análisis serial de la expresión génica o SAGE consiste en elaborar una biblioteca de cDNA (provenientes de los ARN mensajeros que se están expresando en ese momento en las células), con la finalidad de poder secuenciar entre 30-35 transcritos al mismo tiempo. Los cDNA se marcan con el sistema biotina–streptavidina y se cortan con enzimas de restricción para agregarles un linker que permita clonarlos y secuenciarlos. Esta técnica es muy sensible en la medición de transcritos poco abundantes y en la detección de pequeños cambios de la expresión, pero sobre todo cuenta con la ventaja de prescindir de la secuencia de genes conocidos, permitiendo ser útil en el descubrimiento de nuevos genes (Weber B).

Otra de las metodologías está basada en el estudio e identificación de un perfil proteico o proteomics. En este caso las proteínas presentes en el tejido o fluido que se quiere analizar son separadas en geles de poliacrilamida bidimensionales o por microdisgregación con laser y pegado en soporte sólido (SELDI TOF), para luego ser analizado a través de espectrometría de masa. De esta manera se elabora un perfil de proteínas, que ayuda tanto en el diagnóstico temprano de una enfermedad como en la detección temprana de efectos citotóxicos como respuesta a un determinado tratamiento. La ventaja de esta técnica se basa en que el perfil de proteínas está íntimamente ligado a la actividad biológica de las mismas, en cambio el análisis de los cambios o mutaciones del ADN no siempre se correlaciona a la manifestación de la enfermedad (Wulfschlegel J et al).

Por otro lado es posible analizar la distribución de una determinada proteína sobre tejido. De manera automatizada pueden realizarse múltiples cortes provenientes de distintos pacientes e inmovilizarlos sobre un soporte sólido para luego enfrentarlos a un anticuerpo contra una proteína específica (tissue arrays). Este arreglo permite el estudio de una molécula en cientos de muestras respetando la arquitectura del tejido (Celis J y Gromov P).

Además se ha desarrollado metodología tendiente a determinar no sólo la expresión de determinadas proteínas sino su funcionalidad biológica. Así, es posible por ejemplo determinar la presencia de determinadas enzimas y el grado de activación catalítica.

Existen múltiples variantes de estas técnicas que conducen al análisis masivo de genes o expresión de los mismos, a partir de una mínima porción

de muestra biológica, permitiendo analizar ya no cambios puntuales sino cambios en los patrones de expresión de cientos de genes al mismo tiempo.

### **Marcadores para predecir susceptibilidad tumoral**

Están basados en la identificación de aquellos genes asociados a caracteres hereditarios. Estos genes alterados son generalmente supresores tumorales o genes involucrados en la reparación del ADN.

Así, un individuo puede presentar una mutación germinal o somática, dependiendo si recibió el alelo mutado de uno de sus padres. Este individuo que ya presenta un alelo mutado, tendrá mayores posibilidades de mutar el otro alelo y de acuerdo a la penetrancia del gen adquirir la enfermedad (enfermedades recesivas). Por otro lado, aquellos individuos que no tengan mutaciones germinales en ningún alelo, tendrán menores posibilidades de adquirir cáncer, ya que para que la enfermedad se declare es necesario que los dos alelos del gen supresor muten.

#### Ejemplo de genes supresores de tumores y enfermedad relacionada:

- Rb (Cr 13) Retinoblastoma
- DCC (Cr 18) FCC (Familiar Colorectal Cancer)
- p16 Melanoma familiar
- BRCA1 (Cr 17) y BRCA 2 (Cr 13) Cáncer de mama familiar

Desde hace años numerosos investigadores han intentado desarrollar métodos analíticos capaces de identificar bioquímicamente productos específicos del tumor. A pesar que una enorme cantidad de moléculas de variada naturaleza se han propuesto como marcadores tumorales, no todos ellos demostraron en estudios de validación, utilidad en la clínica.

Una propiedad que se espera de los marcadores es que permitan detectar la presencia de un tumor mucho antes que los métodos en uso. Cuando un tumor comienza a ser evidente por métodos de diagnóstico por imágenes (llamada detección precoz) consta al menos de  $1 \times 10^{10}$  células.

El cáncer de sitio primario desconocido representa del 5 al 10% de todos los pacientes oncológicos, constituyendo una forma relativamente frecuente de presentación. Se trata de una población heterogénea dado que comprende numerosas formas clínicas y diversas variedades histológicas, siendo lo más común el diagnóstico de metástasis de un adenocarcinoma oculto (40%). En estos casos se evalúa a nivel del tejido la expresión de marcadores de estirpe o linaje celular y marcador de diferenciación celular además del dosaje de determinados marcadores circulantes. La valoración de la información, aportada por el panel de marcadores evaluados, ayuda al diagnóstico del tipo tumoral y por ende al esquema terapéutico a implementar.

Tal como se describirá más adelante, la utilidad de un marcador en un determinado tipo de cáncer y aplicando una metodología adecuada al objetivo buscado, se estima a través del número de falsos positivos y de

falsos negativos. Esta valoración se expresa en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VP+) y valor predictivo negativo (VP-), tal como se realiza para otros tests diagnósticos o de laboratorio.

En la tabla 4.I se presenta una lista de marcadores tumorales, los que analizados a nivel del tejido tumoral mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la caracterización de estirpe celular y grado de diferenciación.

**Tabla 4.I. Antígenos analizados mediante IHQ en el diagnóstico y caracterización tumoral.**

<b>Antígeno</b>	<b>Especificidad tisular y tumoral</b>
Actina	Isoforma específica para músculo liso y miofibroblastos Isoforma sarcomérica específica para músculo estriado
$\alpha$ -Fetoproteína	Hígado, carcinoma hepatocelular
$\alpha$ -Lactalbúmina	Epitelio de glándula mamaria, Carcinoma de mama lobulillar y ductal
CA 19.9	Carcinoma pancreático-biliar
CA 125	Tumor epitelial mucinoso de ovario, cérvix, endometrio y mama
Cadherina	Carcinomas. Su nivel de expresión correlaciona inversamente con el grado de diferenciación del tumor epitelial
Antígeno Carcinoembrionario	Adenocarcinomas del tracto gastrointestinal y páncreas, pulmón, carcinoma medular de tiroides
CD31	Células endoteliales
CD34	Células endoteliales, células stem hematopoyéticas de médula ósea



## Capítulo 4

Cromograninas	Tumores neuroendócrinos
Citoqueratinas	Tumores de estirpe epitelial
Desmina	Fibras musculares lisas y estriadas
Antígeno epitelial de membrana	Adenocarcinomas, mesoteliomas, meningiomas
Factor VIII	Megacariocitos, plaquetas, mastocitos, endotelio, tumores endoteliales
Factor XIII	Megacariocitos, fibroblastos, macrófagos, histiocitomas
Proteína gliofibrilar ácida	Células gliales, astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, schwannomas
GCDFP-15	Diferenciación apócrina en piel y mama, algunos carcinomas mamarios
HMB-45	Melanoma, angiomiolipoma, algunos tumores derivados de las crestas neurales
Receptores hormonales	Carcinomas de mama (receptores para estrógenos y progesterona)
HCG-β	Trofoblasto, tumores derivados del mismo y originados en células germinales
Lactógeno placentario	Trofoblasto, células germinales
Inmunoglobulinas	Mieloma múltiple, linfomas
Ki-67	Ag de proliferación celular, todos los tumores con células en división
Laminina	Tumores endoteliales y de músculo liso
Antígeno leucocitario común	Linfocitos, ausente en otros tipos tumorales
LeuM-1	Linfoma de Hodking, adenocarcinomas

## Capítulo 4

Leu-7	Tumores neuronales y neuroendócrinos, carcinoma prostático
MyoD-1	Tumores de músculo esquelético
Mioglobina	Músculo esquelético y cardíaco
Miosina	Isoformas específicas para músculo liso y estriado
Enolasa neuroespecífica	Tumores neuronales y neuroendócrinos
Notch	Algunas células stem
glicoproteína P	Colon, endotelio y adrenal normales. Asociado al mecanismo de resistencia a multidroga
Fosfatasa alcalina símil placentaria	Tumores de células germinales, marcador de tumores germinales in situ
Antígeno prostático específico	Epitelio de acinos y túbulos de la próstata normal, hiperplasia y carcinoma de próstata
Fosfatasa ácida prostática	Carcinoma de próstata, carcinoides y otros tumores
S-100	Tumores de nervios periféricos, gliomas de SNC, tumores adiposos y cartilagosos, células mioepiteliales
Apoproteína surfactante	Adenocarcinoma primario de pulmón
Sinaptofisinas	Tumores neuroectodérmicos y neuroendócrinos
Tiroglobulina	Tumores originados en las células foliculares de tiroides
Vimentina	Tumores mesenquimáticos
Ag relacionados con los estadios de maduración de linfocitos T y B	Tumores hematolinfáticos

Para el diagnóstico de un *tumor indiferenciado* pueden utilizarse, no sólo el estudio de la morfología celular, sino también el uso de reactivos inmunohistoquímicos que permitan determinar la estirpe celular del tumor (epitelial, mesenquimático, nervioso, etc). Este punto es importante cuando por ejemplo se detectan metástasis de un tumor primario de origen desconocido, ya que la especificidad de estos marcadores no es del 100 %, en algunos casos se necesita estudiar simultáneamente varios marcadores para definir el origen celular. Estos marcadores permitirían diagnosticar el tumor, como perteneciente a una categoría amplia. Por ejemplo: CARCINOMA, o bien permitir un diagnóstico más preciso, como CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

### **Marcadores de estadificación**

Estos marcadores sirven para evaluar si ya algunas células se han escapado del tumor primario, así, por ejemplo se busca reconocer micrometástasis en médula ósea, o en ganglios linfáticos drenantes. Por ejemplo en Cáncer de Mama el fracaso en la detección de micrometástasis es tan alta como del 25%, por lo tanto hay un interés creciente en mejorar la estadificación.

### **Marcadores de pronóstico**

Estos marcadores sirven para predecir el comportamiento biológico del tumor y permite delinear grupos de pacientes más homogéneos. El

marcador pronóstico es capaz en el momento del diagnóstico (o cirugía) de dar información sobre la evolución clínica que tendrá el paciente. Los marcadores pronósticos evalúan el tiempo de supervivencia libre de enfermedad y/o la supervivencia global teniendo como punto final la recidiva/ recurrencia o la muerte del paciente respectivamente.

La introducción de un nuevo marcador pronóstico implica:

- Demostrar su utilidad en estudios multicéntricos con alto número de pacientes
- Demostrar independencia de las variables clínico patológicas convencionales
- Aportar nueva información para el manejo del paciente

A pesar de contar en algunas patologías oncológicas con algunos marcadores pronósticos, aun se necesitan otros factores pronósticos que permitan conocer en certeza la evolución individual de cada paciente. Así, por ejemplo en el caso de Cáncer de mama sin compromiso de ganglios linfáticos es necesario contar con marcadores que predigan el porcentaje que progresarán. Estos marcadores permitirían la identificación de pacientes cuyo pronóstico es tan pobre que una terapia adyuvante agresiva temprana lo beneficiaría. También serían importantes para identificar pacientes cuyo pronóstico es tan bueno, que la terapia adyuvante luego de la cirugía local no justificaría el riesgo ni el costo para el paciente.

### **Marcadores para monitorear la enfermedad en curso**

Se trata de marcadores que permiten seguir la evolución de la enfermedad, una vez que el paciente ha finalizado su tratamiento, siendo útiles por ejemplo para:

Anticipar recidiva local

Anticipar formación de tumor a distancia o MTS

Detectar tumor mínimo residual

Existen diversas técnicas que detectan muy finamente el antígeno buscado, a pesar de su baja densidad. Por ejemplo, empleando Citometría de Flujo junto con marcadores inmunológicos es posible detectar enfermedad mínima residual y potencialmente una única célula del tumor entre una población de células normales. Se pueden mencionar, como ejemplos, la detección de células leucémicas post- terapia o la búsqueda de células metastásicas de tumores sólidos en Médula ósea.

### **Marcadores predictivos o para monitorear la terapia**

Se define como cualquier factor capaz de dar información útil para seleccionar pacientes con alta probabilidad de responder a algún tipo de tratamiento o estimar la respuesta a los tratamientos aplicados. Es decir, permite seleccionar una terapia específica dependiendo de las características del tumor y del paciente y también desarrollar nuevas modalidades de tratamiento dirigidas sobre estos parámetros alterados. Esto

involucra medir sustancias marcadoras en sangre u orina u otros fluidos. Las mismas pueden aplicarse en la detección por imágenes, solas o acompañadas con el uso de colorantes unidos a radioligandos o ser anticuerpos contra antígenos tumorales.

### **Marcadores tumorales circulantes**

En la tabla 4.II se muestran algunos de los marcadores circulantes que mostraron una utilidad concreta cuando se aplicaron en la clínica oncológica, presentándolos como marcadores de alta, moderada y baja utilidad clínica (Grem J).

**Tabla 4.II. Marcadores circulantes con reconocida utilidad clínica.**

<b>Marcador</b>	<b>Utilidad-Aplicación</b>
<b>De alta utilidad clínica</b>	
<p><b>Antígeno Prostático Específico (PSA)</b> (Serino-proteasa órgano específica, producida por las células ductales de la próstata. Es una glicoproteína citoplasmática)</p>	<p>Aumento en cáncer de próstata, aunque también en otras condiciones patológicas no neoplásicas como: prostatitis, retención urinaria y en ciertas condiciones tales como maniobras de exploración diagnóstica y/o terapéuticas. Su determinación es útil en la detección tumoral, como factor de pronóstico (asociado a otros parámetros tales como el estadio tumoral y el score de Gleason) y como factor de seguimiento.</p>
<p><b>Subunidad <math>\beta</math> de la Gonadotropina Coriónica Humana (<math>\beta</math>-GCH)</b></p>	<p>Elevada en tumores germinales, especialmente en corioncarcinoma y tumores placentarios, aunque también en cáncer de estómago avanzado.</p> <p>Su mayor utilidad se encuentra en la estadificación, respuesta al tratamiento y seguimiento de pacientes con cáncer de células germinales y tumores placentarios.</p>
<p><b><math>\alpha</math>-Fetoproteína (<math>\alpha</math>-FP)</b></p>	<p>Se eleva en los tumores germinales no-seminoma (del varón) y no-disgerminoma (de la mujer), específicamente en el carcinoma embrionario y tumores del seno endodérmico, carcinoma hepatocelular y tumores gastrointestinales.</p>
<p><b>Adrenalina, noradrenalina y sus metabolitos urinarios</b></p>	<p>Feocromocitoma</p>
<p><b>Serotonina y sus metabolitos</b></p>	<p>Carcinoides</p>
<p><b>Tiroglobulina</b></p>	<p>Carcinoma folicular y papilar de tiroides</p>
<p><b>Calcitonina</b></p>	<p>Carcinoma medular de tiroides</p>
<b>De moderada utilidad clínica</b>	

## Capítulo 4

<b><i>Antígeno Carbohidrato-125 (CA-125)</i></b>	Como antígeno de superficie se expresa en el 80% de los tumores epiteliales de ovario no mucinosos, algunos de éstos lo liberan a circulación
<b><i>Lactato Deshidrogenasa (LDH)</i></b>	Comprende varias isoenzimas, pero en la práctica se utiliza la determinación total, ya que refleja la tasa de crecimiento tumoral. Es un marcador mucho menos específico, pero es un factor pronóstico independiente en pacientes con tumores germinales avanzados y linfomas.
<b>De baja utilidad clínica</b>	
<b><i>Antígeno Carbohidrato19-9 (CA19-9)</i></b>	Se encuentra elevado en pacientes con tumores gástricos (sensibilidad 78%) y en pacientes con cáncer de páncreas (sensibilidad 70 a 93%). Se relaciona con el volumen tumoral y es un factor pronóstico. No es útil como método de detección de cáncer pancreático, pero puede ayudar a distinguir el proceso neoplásico de la pancreatitis (aunque el 30% de las pancreatitis crónicas y el 20% de las agudas también lo elevan).
<b><i>Fosfatasa Alcalina (FAL)</i></b>	Es un marcador de actividad tumoral y factor pronóstico en pacientes con osteosarcoma. El 45% de los pacientes lo tienen elevado. No mostró utilidad en el manejo terapéutico.



**Marcadores tumorales. Parámetros más usados**

Como se ha mencionado anteriormente, los marcadores tumorales, entre otras cosas, pretenden ayudar al médico oncólogo a dar un diagnóstico certero de la enfermedad, para poder recurrir a terapias más convenientes. Para definir mejor las cualidades de un marcador se definen algunos parámetros indicados en las siguientes tablas (Fletcher RH et al).

		ENFERMEDAD	
<u>TEST</u>	<i>Presente</i>	<i>Ausente</i>	
<i>Positivo</i>	Verdadero Positivo <b>A</b>	Falso Positivo <b>B</b>	
<i>Negativo</i>	Falso Negativo <b>C</b>	Verdadero Negativo <b>D</b>	

<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>ESPECIFICIDAD</b>
Es la proporción de personas con enfermedad a quienes el test dio positivo. <b>A/A+C.</b>	Es la proporción de individuos sin enfermedad con test negativo <b>D/B+D.</b>

<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO</b>	<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO</b>
Es la probabilidad de un paciente de padecer una enfermedad cuando el resultado del test es positivo <b>A/A+B</b>	Es la probabilidad de no tener enfermedad cuando el resultado del test es negativo <b>D/C+D</b>

### **Problemas asociados con el análisis de los marcadores tumorales**

Estos son algunos de los puntos a considerar en la evaluación del marcador tumoral.

- Heterogeneidad tumoral (la muestra debe ser representativa del tumor).
- Estimación del comportamiento in vivo de la célula.
- Estandarización de los resultados en los distintos laboratorios

### **Puntos a considerar al introducir un nuevo marcador tumoral**

- Proveer información única o nueva
- El material a estudiar debe obtenerse fácilmente
- El test debe ser simple, confiable, reproducible, con acceso a controles positivos y negativos
- El test debe ser específico y sensible
- Deben realizarse estudios de costo- beneficio
- Los resultados deben ser independientes de los criterios en uso
- Los resultados deben ser validados en estudios multicéntricos y con alto número de pacientes
- El manejo del paciente debe ser modificado de acuerdo al resultado del marcador
- Tener muy en cuenta los aspectos éticos

### **Moléculas de adhesión como marcadoras oncológicas**

La forma en la que las células establecen un contacto adhesivo depende en gran parte del medio en el que se encuentran. Existe una gran interacción cooperativa entre las proteasas y las moléculas de adhesión para regular diversos procesos celulares que van desde la interacción a través de los receptores de membrana hasta la expresión de un gen. Una serie de moléculas importantes están involucradas en la adhesión celular incluyendo: fibronectina, vitronectina, laminina, colágenos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, la familia de las integrinas así como receptores de adhesión: cadherinas, CD44 y las CAMs. Los cambios producidos en la composición de la ME, la membrana basal de los tejidos y en las moléculas de adhesión tienen un profundo impacto en el fenotipo de la célula tumoral.

Daremos algunos ejemplos de moléculas de adhesión como marcadoras oncológicas. Se conoce que la pérdida de la Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , la disminución de la  $\alpha 6\beta 1$  y el incremento de la  $\alpha v\beta 3$  están asociadas con el cáncer de mama poco diferenciado. Otros estudios muestran que la expresión del receptor para laminina si bien no correlaciona con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama, si se asocia al riesgo de recurrencia local (Kathleen P y Marc E).

También se ha evaluado la utilidad de las Integrinas y CD44 como marcadoras de diagnóstico y pronóstico en melanoma, dada su expresión diferencial en la progresión del tumor (Peter E et al). Otros autores han demostrado que la expresión de algunas isoformas de CD44 puede estar regulada cuantitativamente en forma diferencial en las células tumorales y esto podría ser importante en el evento metastásico (Man-Sun S et al). Sin

embargo, la forma soluble CD44v6 presente en plasma no ha sido de utilidad como marcadora tumoral para el carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas (Nicole L et al).

### **NCAM como marcadora tumoral**

Se observaron altos niveles de expresión de NCAM en algunos tumores como por ejemplo en feocromocitoma (Margolis RK. and Margolis RU.), neuroblastoma (Livingstone B. et al; Moolenaar C. et al), tumor de Wilms (Roth J. et al) y cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) (Moolenaar C. et al; Aletsee-Ufrecht M. et al)

Por otro lado en el suero de pacientes con cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) se ha encontrado altas concentraciones de NCAM, comparada con la concentración en sueros normales (Jaques G. et al). Otros resultados obtenidos por el mismo grupo de investigadores (Takamatsu et al), indican que la NCAM soluble de 140-180 kDa puede ser considerada como un marcador para diferenciar el SCLC de otros tumores pulmonares.

También la NCAM sérica se encuentra elevada en mielomas pudiendo ser útil como marcador de la enfermedad (Ong F. et al). No hay trabajos que estudien si la NCAM soluble está alterada en pacientes portadores de tumores cerebrales.

## Capítulo 5

### Enfermedades neurodegenerativas

### **Demencia Tipo Alzheimer. Conceptos generales.**

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en el mundo afectando entre el 5 al 10% de la población mayor de 65 años. El diagnóstico de esta patología es definido a través de la autopsia o biopsias cerebrales por observación de manifestaciones histológicas, encontradas predominantemente en la amígdala del hipocampo y en la corteza cerebral, como degeneración neurofibrilar, ovillos fibrilares intraneuronales, placas seniles extracelulares y depósitos amiloides vasculares (Merched A et al)

A causa de la dificultad de su diagnóstico y para evitar confusiones fisiopatológicas respecto a este heterogéneo síndrome, esta patología es referida como Demencia Tipo Alzheimer (DTA) (Schellenberg G et al). De manera que el diagnóstico antemortem de esta enfermedad está basado en el historial clínico del paciente, exámenes físicos y neurológicos junto a la exclusión de otras causas de demencia por neuroimagen.

Existe cierta interrelación clínica entre las enfermedades primariamente degenerativas del sistema nervioso, ya que en ellas se hay síntomas que son la traducción del daño que se ubica en localizaciones anatómicas diferentes, estructuras que son compartidas por distintas patologías, hecho que dificulta la tarea diagnóstica, tratando de individualizar una enfermedad determinada. Hasta el momento se desconocen biomarcadores útiles que ayuden al diagnóstico y tratamiento de estos pacientes.

Se cree que entre los factores etiológicos que hacen a la DTA se encuentran factores inflamatorios atípicos y alteraciones de receptores nicotínicos y estrogénicos. También existen factores genéticos hereditarios.

A partir de asociaciones entre DTA y síndrome de Down, se han encontrado mutaciones genéticas en el cromosoma 21, que involucran al precursor de la proteína  $\beta$  amiloide. Por otro lado se ha encontrado que el genotipo E4 para la apolipoproteína E es más frecuente en individuos que presentan esta demencia. La presencia de E4 incrementa la densidad de las placas  $\beta$  amiloides y favorece su depósito vascular. Así, las interacciones gen- gen y gen-ambiente crean una figura patológica que caracteriza a la DTA, incluyendo placas seniles, ovillos neurofibrilares, disfunción y muerte neuronal.

La identificación de la proteína  $\beta$  amiloide como eje principal de las placas seniles o neuríticas comprende actualmente el evento más importante para comprender la patogénesis de la DTA, hipotetizándose que la forma insoluble de esta proteína es digerida rápidamente en individuos sanos mientras que comienza a formar depósitos en el cerebro de los pacientes desarrollando neurotoxicidad y acumulación de glia alrededor del depósito.

Por otro lado existe una íntima relación entre la formación de los ovillos neurofibrilares por fosforilación de la proteína tau, y la muerte celular. Aunque la tau hiperfosforilada no sólo aparece en la DTA sino también en otras enfermedades neurodegenerativas del SNC, tal como la parálisis supranuclear progresiva.

La pérdida de la función sináptica y la eventual muerte celular contribuyen al desarrollo de la DTA, incluyendo anomalías en la función de la glia, a través de mecanismos que involucran a la Apo E, los proteoglicanos, citoquinas, y la propia proteína amiloide. El daño neuronal también podría acentuarse por acción de los radicales libres. El incremento

del stress oxidativo produciría cambios en la glicosilación proteica (Whithouse P).

En relación a estos datos se han propuesto como posibles marcadores a la medición de la proteína  $\beta$  amiloide, Apo E y tau en el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo no está claro cual es la asociación que presentan estas moléculas en relación a otras condiciones neurológicas. Existen solapamientos importantes en los niveles encontrados para estas proteínas entre pacientes DTA y controles sanos o con otras enfermedades neurológicas. A pesar de la alta sensibilidad y especificidad encontradas en la medición del genotipo Apo E en muestras provenientes de autopsias, este estudio no ha mostrado utilidad clínica como marcador para testear individuos presintomáticos (Whithouse P).

En vista a estas evidencias, y al hecho de que la mayoría de las figuras clínicas y neuropsicológicas que distinguen a los pacientes DTA de individuos añosos o con otras demencias son similares, la búsqueda de marcadores solubles, fácilmente medibles en circulación por métodos poco invasivos, es un desafío importante para ayudar a la detección temprana de este tipo de patología (Lustig E et al).

### **Moléculas de adhesión en procesos neurodegenerativos**

Las glicoproteínas involucradas en la adhesión de las células nerviosas, regulan la estabilización de las uniones sinápticas, el crecimiento de las neuritas, la reparación de heridas, la plasticidad funcional y el control de la liberación de enzimas relacionadas a la biosíntesis de



neurotransmisores. Estas moléculas pertenecen a una de las tres principales familias de adhesión: la superfamilia de las Inmunoglobulinas, las Cadherinas y las Integrinas, que son expresadas en altos niveles sobre las neuronas y células no neuronales (Hampel H, et al).

Evidencias recientes sugieren que algunos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas están involucrados tanto en la plasticidad neuronal del adulto, como en el aprendizaje (Rose SP; Fields RD y Itoh K), y la memoria de corto y largo plazo donde se requiere que moléculas de adhesión permitan la formación de la sinapsis (Ranheim TS, et al). Una de estas opciones es la glicoproteína NCAM, que media uniones homofílicas entre células como las neuronas, astrocitos y células musculares y uniones heterofílicas entre células y componentes de la ME (Rønn LC, et al).

Además, se ha encontrado que las formas de NCAM de alto peso molecular (mayores a 130 kDa) están reguladas positivamente en astrocitos expuestos a una elevada presión hidrostática *in vitro*, y en enfermedades neurodegenerativas, luego del trauma neural (Ricard C et al, Cotman C et al, Roche P et al), lo cual propone a NCAM como una molécula atractiva para el estudio etiológico de este tipo de enfermedades.

## Capítulo 6

### Objetivos

**OBJETIVO GENERAL**

**Estudiar la relación de NCAM (neural-cell adhesion molecule) con procesos neurodegenerativos y con patologías tumorales.**

**OBJETIVOS PARTICULARES**

**A) Estudiar el papel de NCAM en la progresión tumoral de la línea LP07, un adenocarcinoma de pulmón murino con componente neuroendocrino y altamente metastásico.**

**B) Cuantificar los niveles de NCAM circulante en la población control y en pacientes con tumores cerebrales primarios benignos y malignos, y con metástasis cerebrales. Estudiar el valor de NCAM sérica como molécula marcadora de tumores cerebrales humanos.**

**C) Estudiar el valor de NCAM sérica como molécula marcadora de la Demencia Tipo Alzheimer (DTA). Estudiar sus niveles en función del grado de avance la enfermedad.**

# Capítulo 7

## Materiales y Métodos

**A) Estudios de NCAM en el modelo experimental murino de adenocarcinoma de pulmón LP07**

**Estudios *in vivo***

**Tumor**

El adenocarcinoma de pulmón P07 surgió espontáneamente en una hembra BALB/c de nuestro bioterio. El tumor es transplantable en forma s.c. ratones singéneos generando adenocarcinomas poco diferenciados, no invasivos y de alta capacidad metastásica pulmonar. Se incluyó en este estudio la línea celular continua LP07 derivada del adenocarcinoma de pulmón antes mencionado y de similar comportamiento *in vivo*, cuyas características luego de la inyección sc de  $5 \times 10^4$  células se detallan a continuación:

Latencia (días) Md (rango)	3 (2-4)
Tumorigenicidad ( $5 \times 10^4$ células)	100%
Tasa de crecimiento (mm/día)	$0,59 \pm 0,03$
Metástasis pulmonares/ ratón Evaluado a los 35 días de progresión tumoral. Md (rango)	7,5 (0-31)

Las células LP07 cultivadas *in vitro* establecen uniones intercelulares rudimentarias y presentan gránulos secretorios, sugiriendo un origen epitelial-glandular, con componente neuroendócrino (Urtreger AJ, et al). Los

ratones portadores de los tumores LP07 desarrollan síndromes paraneoplásicos como leucocitosis, hipercalcemia y caquexia.

### **Mantenimiento in vitro de la línea celular LP07**

La línea celular LP07 es mantenida en medio de cultivo MEM (41500, Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y 80µg/ml de gentamicina a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono gaseoso. Los pasajes sucesivos son realizados por tripsinización de monocapas subconfluentes (0,25% de tripsina y 0,02% de EDTA en PBS sin Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup>) dos veces semanales.

### **Animales**

Para los estudios *in vivo*, se utilizaron ratones endocriados de 2-4 meses de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo". Los animales son mantenidos allí de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del NIH. La comida y bebida fue administrada *ad libitum*.

### **Preparación de homogenatos tumorales**

Se obtuvo masa tumoral correspondientes a 15 ratones portadores de tumores originados a partir de la inoculación subcutánea de 3x10<sup>5</sup> células LP07, luego de 25 y 48 días de portación.

Se procedió a la limpieza y fraccionamiento de la pieza tumoral. El material fue homogenizado con potter en PBS con un mix de inhibidores de proteasas (Sigma proteases inhibitor cocktail). Estos homogenatos fueron

luego sonicados para evitar la formación de complejos con polinucleótidos. Se procedió a la cuantificación proteica utilizando el método de Bradford (reactivo de cuantificación proteica Bio Rad). Los homogenatos fueron alicuotados y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Cultivo primario**

Se obtuvieron cultivos primarios a partir de tumores de 48 días de portación. La suspensión celular se obtuvo por digestión enzimática de fragmentos del tumor LP07 con 0,01% de Pronasa (Sigma) y 0,0035% de DNasa (Sigma) en MEM. Las células viables se cultivaron en medio MEM suplementado con 10% de SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ . en atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Preparación de los lisados celulares a partir de los cultivos primarios**

El cultivo celular fue lavado con PBS y lisado utilizando una solución de Tritón 0,1% en PBS con inhibidores de proteasas (mix de inhibidores Sigma). El material obtenido fue sonificado y la concentración proteica se midió por el método de Bradford. Los lisados fueron alicuotados y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Detección de NCAM mediante Western blot**

Los homogenatos tumorales y/o el lisado celular proveniente de los cultivos primarios fueron disueltos en buffer de siembra compuesto por 100 mM de Tris pH 6,8, glicerol al 10% v/v, 50 mg/ml de SDS, 0,5 mg/ml de azul de bromofenol y 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, calentados a  $100^{\circ}\text{C}$  y resueltos en

SDS-PAGE al 7,5% (Laemmli). Se utilizó como buffer de corrida una solución compuesta por Tris 0,25M, Glicina 2,0M, SDS al 1%, a pH de 8,3. Los geles fueron transferidos a membranas de nylon (PVDF Amersham) y las mismas se incubaron con un anticuerpo anti NCAM (Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:500) y revelaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Las bandas correspondientes a la proteína NCAM se cuantificaron por densitometría. Los valores obtenidos se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA) y se normalizaron en función del valor de un standard interno (valor 1).

### **Ensayo de metástasis experimentales**

Para estudiar *in vivo* si NCAM modula la capacidad metastásica de LP07, se inocularon por vía iv 30 animales con  $3 \times 10^5$  células LP07 pretratadas con: a) anti NCAM (Santa Cruz Biotechnology) (5µg/ml), b) IgG pre inmune (5µg/ml) o c) MEM sólo. Veintiún días post inóculo los ratones se sacrificaron y el número y tamaño de los nódulos metastásicos superficiales en pulmón fueron analizados bajo lupa.

### **Estudios *in vitro***

#### **Ensayo de adhesión**

Se estudió la capacidad de las células LP07 para adherirse al plástico cuando las mismas son neutralizadas con anticuerpos específicos contra NCAM. Para ello, una suspensión de  $1 \times 10^5$  células LP07 se incubó por 45 min. con A) MEM/BSA (1µg/ml), B) MEM/BSA/NCAM (5µg/ml). C)



MEM/BSA/IgG pre inmune (5µg/ml). Una vez transcurrido el tiempo de incubación,  $3 \times 10^5$  células/ pocillo se sembraron, por triplicado, en placas de 24 wells. Luego de 60 minutos a 37°C, se eliminaron las células no adherentes mediante suaves lavados con PBS. Las células restantes se despegaron mediante tripsinización y contaron inmediatamente en cámara de Newbauer.

### **Ensayo de migración**

Se evaluó la capacidad migratoria de las células LP07 neutralizadas con anticuerpos contra NCAM, mediante el ensayo de "Wound Healing". Para ello, se practicaron heridas de 400µm de ancho a monocapas subconfluentes de células LP07. Las células se lavaron con PBS e incubaron con: A) MEM, B) MEM/NCAM (5µg/ml), C) MEM/IgG pre inmune (5 µg/ml). En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 2% de SFB. A tiempo cero de incubación, se procedió a tomar registros fotográficos de diferentes áreas de las heridas. A las 12 horas se repitió el registro fotográfico de las mismas áreas. La capacidad migratoria se cuantificó calculando el porcentaje del área ocupada respecto la herida original.

### **Organización del citoesqueleto**

Monocapas subconfluentes de células LP07 crecidas sobre cubreobjetos fueron sometidas a los tratamientos mencionados anteriormente en el ensayo de migración (A, B y C). Luego de 24 horas las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formol neutro. Se procedió luego al bloqueo de sitios inespecíficos con leche descremada al 5% en

PBS/Tween 20 al 0,1%. Finalmente los cubreobjetos se incubaron por una hora con Faloidina conjugada a FITC (Sigma) (molécula de alta afinidad por la actina) y se realizaron registros fotográficos representativos de cada grupo bajo el microscopio de fluorescencia.

### **Capacidad proliferativa**

Se evaluó la capacidad proliferativa de las células LP07 en presencia de anticuerpos neutralizantes contra NCAM. Para ello se sembraron  $2 \times 10^4$  células por cuadruplicado en placas de 96 wells, en presencia de los tratamientos A, B y C mencionados previamente. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 2% de SFB. Luego de 48 horas se evaluó el crecimiento utilizando el ensayo de la actividad metabólica mitocondrial (MTS) (Promega).

### **Evaluación de muerte celular por apoptosis**

Monocapas subconfluentes de células LP07 crecidas sobre cubreobjetos fueron sometidas a los tratamientos mencionados anteriormente en el ensayo de migración (A, B y C). Luego de 48 horas las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formol neutro. Los núcleos celulares se tiñeron utilizando el reactivo de Hoechst 0,5 $\mu$ g/ml (dilución 1:100) y posteriormente se montaron en solución acuosa (PBS-glicerina) para ser observados en microscopio de fluorescencia bajo luz UV. Se evaluaron núcleos celulares contando imágenes apoptóticas sobre un total de 200 células y se tomaron registros fotográficos representativos de cada grupo.

### **Western blots de moléculas involucradas en la adhesión**

Se prepararon lisados de células LP07 con el fin de evaluar mediante Western blot otras moléculas de adhesión cuya expresión pudiese ser modulada por el tratamiento con anti NCAM,. A tal efecto se sembraron  $3 \times 10^5$  células LP07 en placas de 35 mm por triplicado en MEM con 10% de SFB. Luego de 24 horas se reemplazó este medio por los tratamientos correspondientes como se indicó en los ensayos de crecimiento y migración. Finalmente las células fueron lisadas en buffer de siembra (conteniendo 100 mM de Tris pH 6,8, glicerol al 10% v/v, 50 mg/ml de SDS, 0,5 mg/ml de azul de bromofenol y 5% de  $\beta$  mercaptoetanol).

Para las moléculas de adhesión, las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida al 7,5% y transfirieron a membranas de nylon (PDVF Amersham). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en solución de PBS/ Tween 20 0,1%, se incubaron con anticuerpos anti  $\beta$  catenina (dilución 1:500, Transduction Laboratories) y anti cadherina E (dilución 1:1000, Transduction Laboratories) y revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia de Amersham.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el test de Anova y el test t de student para analizar las diferencias entre medias de los distintos grupos experimentales.

Para analizar la diferencia entre el número de las metástasis experimentales entre los distintos grupos se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney.

Se consideró el nivel de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## **B) Estudios del rol de NCAM sérico en patologías humanas**

### **NCAM sérico en población control**

Puesto que la información bibliográfica sobre las isoformas de NCAM presente en suero humano es prácticamente nula, en una primera etapa se encaró un estudio sobre la identificación y cuantificación de NCAM circulante.

Para este estudio se extrajo suero a 69 donantes sanos sin evidencia de patología neurológica o tumoral.

Los controles fueron obtenidos del Inst. de Oncología Ángel H. Roffo y del Hospital Italiano de Buenos Aires.

### **Comportamiento de NCAM sérico en pacientes con tumores cerebrales**

Se incluyeron 83 pacientes provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires. Se estudiaron 3 grupos de patología cerebral:

- A) Gliomas de distinto grado de malignidad
- B) Metástasis cerebrales únicas provenientes de pacientes con cáncer de pulmón 60%, cérvix 9%, melanoma 9% y otros 22%.
- C) Tumores benignos (ependimomas, meningiomas, adenoma de hipófisis).

Las muestras incluidas en este estudio fueron obtenidas al diagnóstico inicial de los pacientes, todos vírgenes de tratamiento, y fueron

clasificadas acorde al grado histológico que presentaron sus biopsias o resección quirúrgica posterior. El status fue evaluado por el índice de Karnofsky. Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento escrito de participación voluntaria.

### **NCAM sérica en enfermedades neurodegenerativas**

La NCAM sérica fue medida en 43 pacientes con Demencia tipo Alzheimer (DTA), obtenidos del Hospital Italiano de Buenos Aires.

En este caso la población control consta de un subgrupo de individuos mayores de 55 años.

Los pacientes incluidos en este estudio nunca sufrieron trauma cerebral, hipertensión descontrolada, falencias cardíacas severas, ataque cerebral, disfunción tiroidea, terapias electroconvulsivas, ataques epilépticos, desorden del sueño, retardo mental, psicosis o depresión. Fueron excluidos aquellos pacientes que sufrieron desórdenes neurológicos sistémicos o neurológicos como Parkinson, hidrocefalea o enfermedad de Huntington.

A todos los individuos se los examinó neurológica, psiquiátrica y físicamente. También se evaluaron imágenes cerebrales, así como un conjunto de tests neurofisiológicos que permiten evaluar las deficiencias cognitivas de edad y demencia. Se incluyeron tests para evaluar todos los diferentes tipos y procesos de memoria, atención velocidad psicomotora, lenguaje, función de la visión espacial y praxis. La severidad del deterioro cognitivo fue medida usando la Escala Global de Deterioro (GDS), donde los grados 2-3 corresponden a leve, 4-5 a moderado y 6-7 a avanzado (Reisberg, 1982).

Este estudio fue debidamente cumplimentado según la Declaración de Helsinki.

### **Muestras de suero**

Se recolectaron muestras de sangre que fue centrifugada para la obtención del suero, el cual fue alicuotado y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. En el caso de pacientes oncológicos, la muestra se tomó previo a cualquier tratamiento quirúrgico o adyuvante. Las alicuotas fueron utilizadas sólo una vez luego de ser descongeladas.

### **Electroforesis (SDS-PAGE) y Western Blot**

Los niveles de NCAM se midieron por Western Blot en dos situaciones diferentes: a) condiciones no reductoras, usando un anticuerpo monoclonal anti humano (MAB 2122, Chemicon International Inc. USA, dilución 1:250), que revela bandas específicas de distinto PM (100-180 kDa) y b) bajo condiciones de reducción (tratamiento con 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) incubando con un anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:500) que reconoce una única banda de 80 kDa.

El suero fue diluido 1:30 en PBS y 100ul de cada muestra fue sometida a condiciones reductoras y no reductoras como se indicó previamente. Luego las muestras fueron calentadas a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto y sembradas en un gel de poliacrilamida-SDS al 7,5% (Laemmli). En todas las corridas se sembró una calle con un pool de sueros provenientes de controles sanos (n=10), que se usa como estándar interno. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nylon (PVDF, Amersham) e incubadas con los anticuerpos anti NCAM (situación a

y b). En todas las corridas fue sembrado un Standard interno que corresponde a un pool de muestras controles. Se utilizó un marcador de peso molecular (Kaleidoscope, Bio Rad) para la determinación del peso molecular de las proteínas. Luego de la transferencia, las membranas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con buffer de bloqueo (5% de leche en polvo en de PBS-Tween-20 al 0,1%).

Las membranas provenientes de los geles en condición A, fueron incubadas con un anticuerpo anti IgG de cabra biotilado (Gibco, dilución 1:500), como segundo anticuerpo, durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Gibco, dilución 1:1000) por 1 hora a temperatura ambiente.

Las membranas provenientes de la condición B fueron expuestas a un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, como segundo anticuerpo (Amersham) durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos fueron diluidos en buffer de bloqueo.

Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia) y luego expuestas a una película radiográfica (Bio Max Light, Kodak).

#### **Medición de las bandas NCAM**

Las bandas específicas fueron cuantificadas por densitometría utilizando un densitómetro Bio Rad GS 700 y el programa Molecular Analysis. El valor de cada muestra fue normalizado en función del valor obtenido para el estándar interno (valor 1). Los niveles de NCAM se

expresaron en Unidades Arbitrarias (UA). El error intra e inter experimento fue alrededor del 15%.

### **Análisis estadísticos**

Las diferencias de los niveles de NCAM entre los grupos (control vs pacientes) fueron comparadas usando el test de Mann Whitney, basado en el análisis de las medias por métodos no paramétricos que ofrece cada grupo de análisis. Se utilizó una Regresión Lineal para el análisis del efecto conjunto del sexo y la edad sobre los valores hallados para NCAM.

Fue desarrollada una curva ROC (Receiver Operator Characteristic) (Fletcher RH et al) para determinar el mejor valor de corte que permitiera diferenciar pacientes de controles.

También se calcularon Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo (VP+) y Valor Predictivo Negativo (VP-), usando el punto de corte para NCAM hallado anteriormente. Se utilizó la curva de Kaplan-Meier y el log rank test para estudiar sobrevida.

El test de Chi cuadrado fue utilizado para estimar el grado de significación en las comparaciones bivariadas. Se consideró como significativo una diferencia menor de 0,05.

Se realizó un estudio multivariado para evaluar el valor predictivo de cada variable (edad, sexo, GDS, Karnofsky etc) independientemente de las otras. Se consideró como significativa una diferencia menor de 0,05.

Fue utilizado el programa SPSSPC+10.0 para realizar todos los análisis estadísticos antes mencionados.



## Capítulo 8

### NCAM en relación a la patología oncológica

## Parte A

### Rol de NCAM en la progresión tumoral de la línea de adenocarcinoma de pulmón LP07

**Resultados**

**Discusión**

## **Estudios *in vivo* en el modelo experimental murino**

### **Determinación de NCAM en los lisados de la línea LP07**

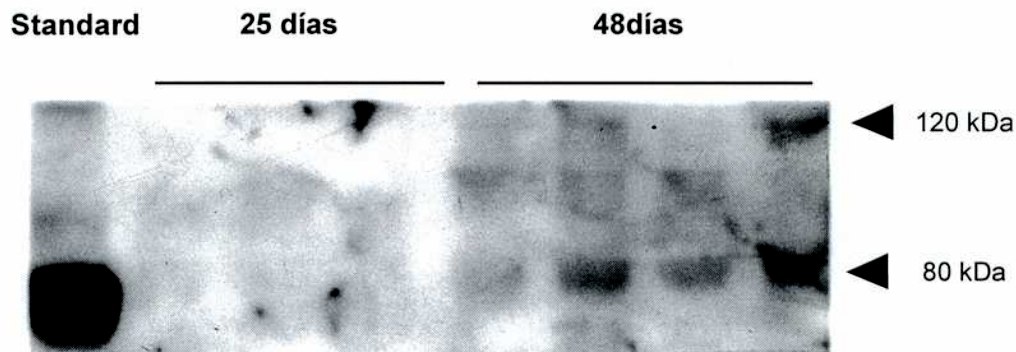
En primer lugar se determinó la presencia de NCAM en los lisados celulares LP07 con el fin de establecer si esta línea era un buen modelo para estudiar la participación de NCAM en la progresión tumoral y desarrollo de la metástasis. Pudieron detectarse por WB bandas de NCAM específicas correspondientes a 80, 120 y 140 kDa.

### **Determinación de NCAM en los homogenatos del tumor LP07**

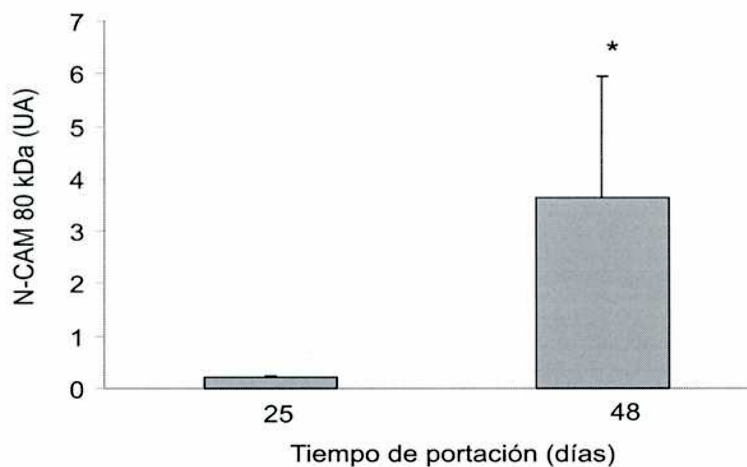
Para establecer si la línea LP07 inoculada *in vivo* continúa expresando NCAM y si su expresión varía a lo largo de la portación tumoral, homogenatos tumorales obtenidos a los 28 y 48 días de inoculación subcutánea de células LP07 en ratones singéneos, se analizaron por WB. El mismo (figura 8.1 A) revela la presencia de la banda de NCAM de 80 kDa, que aumenta con la portación tumoral, cuya cuantificación se ejemplifica en la figura 8.1 B. Por otro lado, las isoformas de 120 y de 140 kDa sólo se detectan en el estadio más avanzado.

**Figura 8.I. Determinación de NCAM en los homogenatos del tumor LP07**

**A**



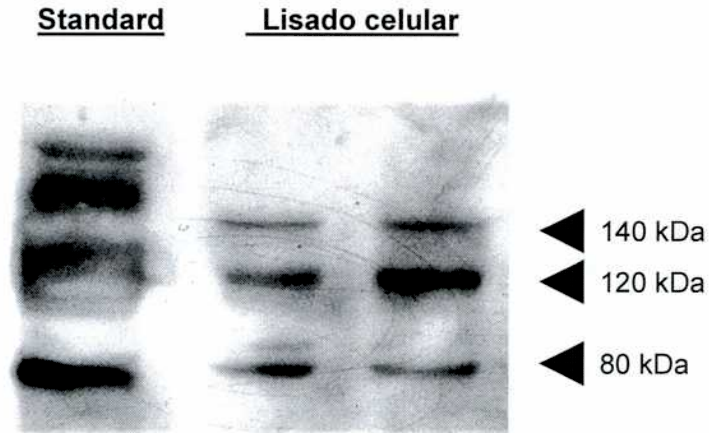
**B**



La figura es representativa de dos experimentos independientes.  $n=5$  para cada grupo experimental  $*p < 0.05$ , *t test*.

El análisis por WB del lisado celular de un cultivo primario de tumores avanzados (48 días de evolución) constituidos en un 95% por células tumorales, muestra la presencia de bandas de NCAM de 80, 120 y 140 kDa, corroborando que las células tumorales *in vitro* son capaces de expresar las mismas isoformas de esta molécula de adhesión (figura 8.II)

**Figura 8.II. Detección de NCAM por Western blot en cultivos primarios obtenidos a partir del tumor LP07 luego de 48 días de portación.**

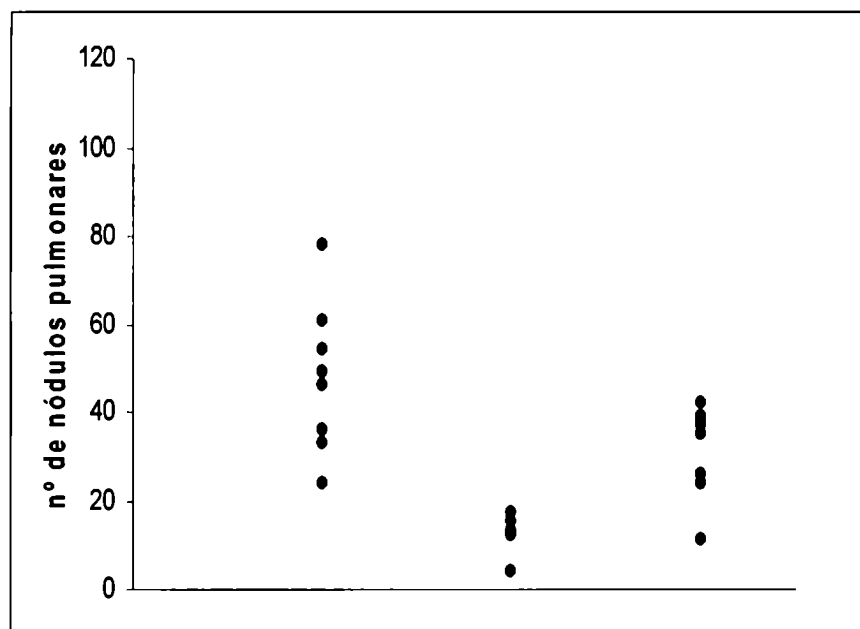


*El lisado de los cultivos primarios obtenidos a partir del tumor LP07 expresa tres isoformas de NCAM, de 140, 120 y 80 kDa.*

#### **Rol de NCAM en la diseminación metastásica *in vivo* de la línea LP07**

A los 21 días post inóculo i.v. de las células LP07 pre incubadas con MEM, o con anti NCAM o con IgG pre inmune a ratones Balb/c, los mismos fueron sacrificados y el número de metástasis pulmonares fue evaluado. El grupo experimental que ha recibido células tratadas con anti NCAM presenta significativamente un menor número de nódulos superficiales en pulmón respecto de los otros grupos (figura 8.III).

**Figura 8.III. Inhibición de las metástasis experimentales de las células LP07 tratadas con anti NCAM**

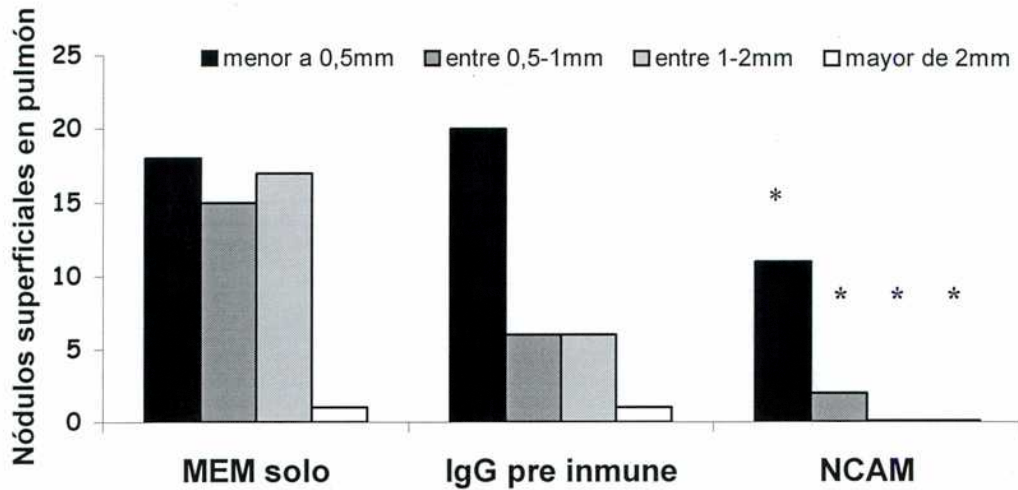


	MEM sólo	NCAM*	IgG pre inmune
<b>Mediana (Md)</b>	49	13	38
<b>Rango</b>	(24-103)	(4-75)	(11-88)

*Se grafica la mediana de cada grupo (n=10). Se realizó otro experimento con idénticos resultados. \*p <0,01, KW vs MEM e IgG pre inmune.*

También se evaluó el tamaño de los nódulos metastásicos pulmonares. Puede observarse en la figura 8.IV que el grupo que fue inyectado i.v. con células LP07, pre incubadas con anti NCAM, presenta nódulos de menor tamaño, no encontrándose metástasis mayores a 1mm.

**Figura 8.IV. Determinación del tamaño de las metástasis experimentales de las células LP07 tratadas con anti NCAM**



*Se observa una disminución del número total y tamaño de los nódulos pulmonares de los ratones inoculados con células tratadas con anti NCAM.*

*\* $p < 0,01$ ,  $X^2$  vs MEM solo e IgG pre inmune.*

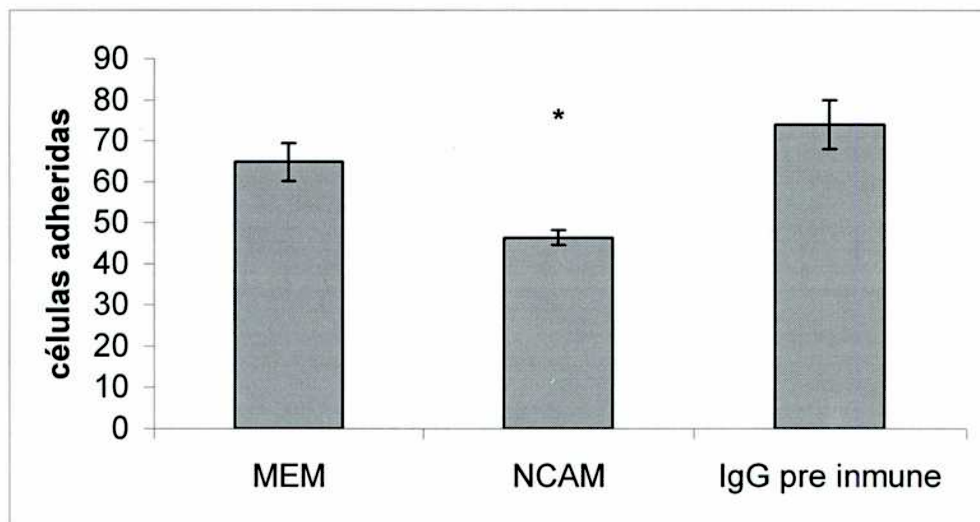
**Evaluación de la participación de la molécula NCAM en diferentes etapas de la cascada metastásica en el modelo de adenocarcinoma pulmonar murino LP07. Estudios *in vitro*.**

**Rol de NCAM en las propiedades adhesivas de LP07**

Con el objeto de evaluar la participación de NCAM en diferentes etapas de la cascada metastásica se estudió, en primer lugar, la adhesión a plástico de las células LP07 cuando han sido neutralizadas con anticuerpo anti NCAM.

Como se observa en la figura 8.V el tratamiento con anti NCAM disminuye significativamente la adhesión a plástico (46,3% vs 64,8% en células incubadas con MEM solo y 73,9% en células tratadas con IgG pre inmune).

**Figura 8.V. El tratamiento con anti NCAM disminuye la adhesión in vitro de las células LP07**



*Se graficó media y desvío de cada grupo. Las determinaciones se han realizado por triplicado. El gráfico es representativo de dos experimentos independientes,  $\chi^2$  \* $p$ <0,05.*

### **Rol de NCAM en la migración celular**

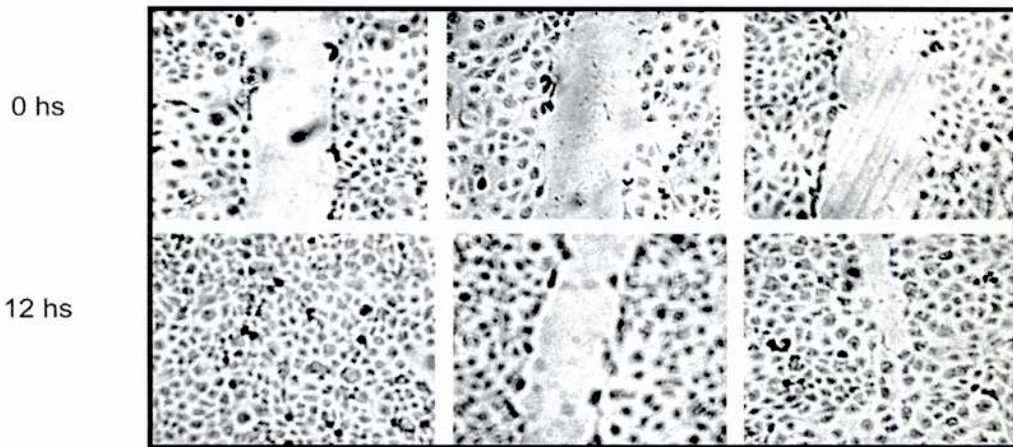
Se ha evaluado la capacidad de las células LP07 para cubrir una herida realizada sobre monocapa, cuando el cultivo ha sido sometido a diferentes tratamientos: MEM sólo o IgG pre inmune como controles y anticuerpos específicos contra NCAM. Puede observarse en la figura 8.VI A



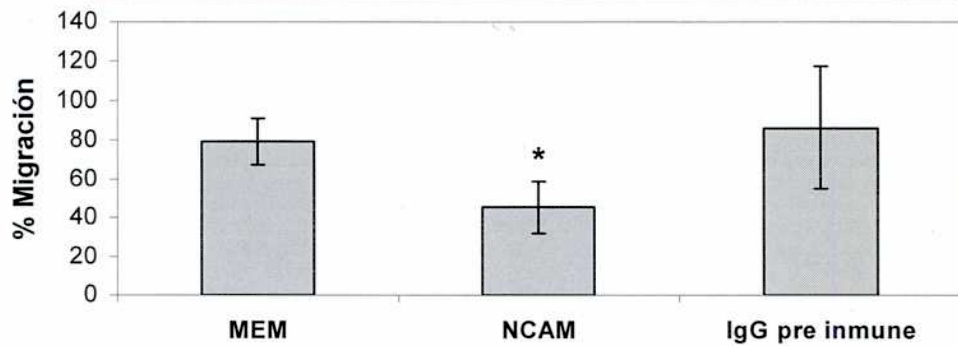
que las células LP07 incubadas con anti NCAM tardan más tiempo en cubrir la herida que los controles MEM e IgG. Estas diferencias, como se ve en el gráfico 6.VII B son significativas luego de 12 horas de tratamiento, a las 24 horas todos los grupos cubren la herida alcanzando una migración del 100%.

**Figura 8.VI. Ensayo de migración de las células LP07 tratadas con anti NCAM**

**A**



**B**

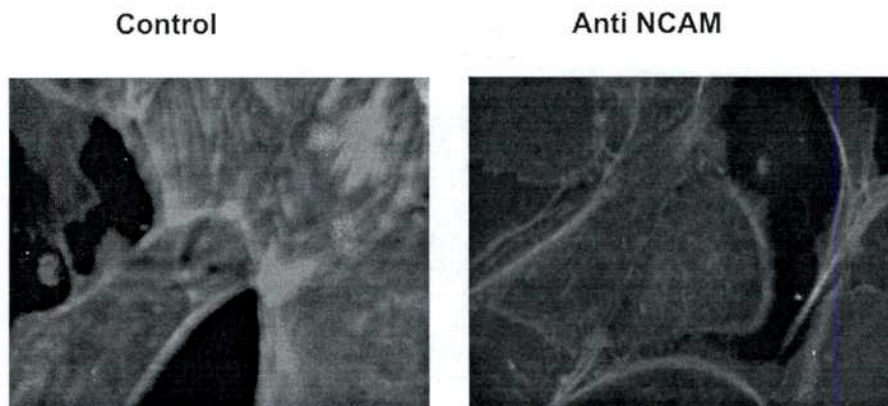


*Ensayo de wound sobre monocapas de células LP07 luego de 12 horas de tratamiento. Se grafican medias y desvíos de cada grupo (n=8). Experimento representativo de dos independientes. \*p<0,01 t test.*

### NCAM como modulador del citoesqueleto de actina

Se evaluó la modulación del citoesqueleto de actina de células LP07 luego del bloqueo de la molécula de adhesión NCAM, mediante el uso de Faloidina FITC. Se ha podido observar al microscopio de fluorescencia que mientras las células controles o tratadas con IgG pre inmune por 24 horas presentan una red de fibras de stress, en las células tratadas con anti NCAM ésta desaparece casi totalmente, observándose sólo tinción específica en disposición cortical (figura 8.VII).

**Figura 8.VII: Modulación del citoesqueleto de actina**

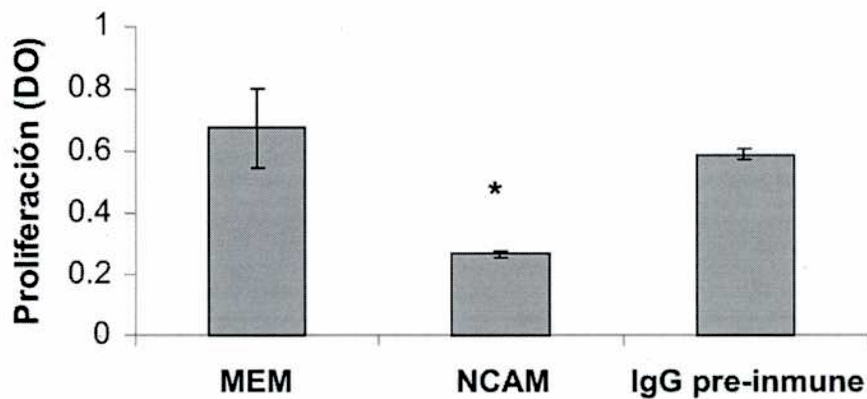


*Las células neutrizadas con anticuerpos anti NCAM presentan solo actina cortical, mientras que las células control presentan además fibras de stress en su citoesqueleto.*

**Rol de NCAM en la proliferación *in vitro* de células LP07**

Se evaluó la participación de la molécula de adhesión NCAM en el crecimiento en cultivo de la línea LP07. Para ello se incubaron las células bajo diferentes condiciones durante 48 horas: con MEM solo o con IgG pre inmune como controles y con el anticuerpo específico contra NCAM. Como puede observarse en la figura 8.VIII las células neutralizadas contra NCAM presentan una disminución significativa en la cantidad de células, medidas indirectamente por el ensayo de actividad metabólica mitocondrial (MTS).

**Figura 8.VIII. Ensayo de proliferación en la línea LP07 tratadas con anti NCAM**

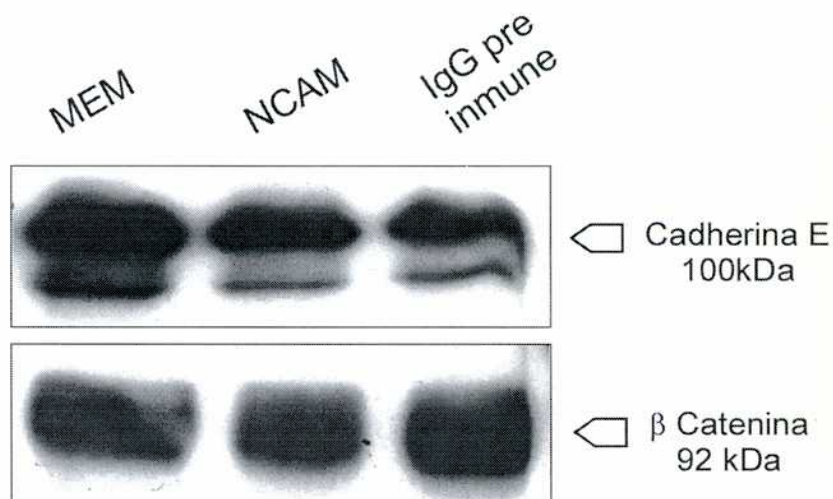


*El gráfico es representativo de dos experimentos independientes. Cada determinación se ha realizado por cuadruplicado luego de 48 horas de tratamiento, utilizando el método MTS. \*p < 0,01, t test.*

**Modulación de otras moléculas de adhesión inducidas por el tratamiento de células LP07 con anti NCAM**

Dado que NCAM interviene en la modulación del citoesqueleto de actina, hemos evaluado si el tratamiento de células LP07 con anti NCAM induce también cambios en la expresión de otras moléculas de adhesión. Para ello, se han realizado Western blots a partir de lisados celulares, de cultivos expuestos a los diferentes tratamientos, para evaluar cambios en las moléculas Cadherina E y  $\beta$ -Catenina. Como puede observarse en la figura 8.IX, el bloqueo específico de NCAM no induce cambios en la expresión de estos antígenos

**Figura 8.IX. Western blot para la detección de las moléculas de adhesión Cadherina E y  $\beta$ -Catenina.**



*Mediante Western blot no se observó modulación en la expresión de Cadherina E y  $\beta$  Catenina luego del tratamiento con anticuerpos anti NCAM.*

**Discusión: NCAM en el modelo experimental murino LP07**

Tanto la invasión como la metástasis representan dos enormes obstáculos para el tratamiento de las neoplasias (Liotta et al, Schirrmacher et al). La invasión es un fenómeno multifacético que involucra interacciones célula-célula y célula-ME. Este proceso se inicia con la adhesión de la célula neoplásica a la ME, seguida por la disolución o desorganización de estas matrices por enzimas proteolíticas. Finalmente las células migran a través de la ME alcanzando la circulación y el posterior arresto en el órgano blanco de la metástasis. En esta cascada de eventos intervienen numerosas moléculas entre las cuales se hallan las moléculas de adhesión (Humphries and Newham, Bissell y Nelson).

La molécula de adhesión NCAM ha sido descrita en varios tumores neuroectodérmicos como neuroblastoma, tumor de Wilms y especialmente en el cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) donde incluso se la propone como marcadora de la enfermedad (Livingstone et al, Roth et al, Moolenaar et al, Aletsee et al). Este tipo de cáncer de pulmón humano con características neuroendócrinas ha sido de particular interés para el estudio de NCAM (Jaques et al, Takamatsu et al). Más aún, la NCAM se utiliza actualmente en la clínica para discriminar SCLC de otros tumores de pulmón.

La línea LP07 es derivada de un adenocarcinoma pulmonar murino surgido espontáneamente en un ratón Balb/c de nuestro bioterio (Urtreger A et al). Su morfología y el de hecho que produce y secreta adrenomedulina (Montuenga, comunicación personal) nos permite incluirlo dentro de los

tumores con componente neuroendócrino constituyéndose en un modelo atractivo para el estudio de NCAM en la progresión tumoral.

Es importante destacar que no existen modelos experimentales que permitan estudiar el rol de NCAM en el comportamiento biológico de los tumores de pulmón. Sólo se han empleado modelos derivados de células nerviosas para analizar el papel de esta molécula.

En nuestro modelo experimental, se detectaron en los homogenatos del tumor LP07 distintas isoformas de NCAM. Esta observación nos llevó a preguntarnos si la NCAM era sintetizada por las células tumorales o si provenía de células normales asociadas al tumor. Con este propósito se realizaron los cultivos primarios correspondientes constituidos en un 95% por células malignas, lo que nos llevó a corroborar el origen tumoral de la NCAM. Estos datos pueden asociarse con estudios realizados por otros autores en tumores SCLC humanos, donde la expresión de NCAM se asoció con la célula tumoral (Lantuejoul S et al).

Por otro lado observamos que la expresión de NCAM varía con el crecimiento tumoral. En los estadios más avanzados se registró un aumento de la expresión de la NCAM de 80kDa y la aparición de isoformas de alto PM, ricas en ácido siálico. En cáncer de pulmón humano se observó que las formas de NCAM con alto contenido en ácido siálico (PSA NCAM), son significativamente más frecuente en los tumores de alto grado y en los más metastáticos.

Se conoce que las cadenas de ácido siálico reducen la capacidad adhesiva de las células, hipotetizándose que este hecho favorecería la

formación de metástasis al permitir que las células tengan mayor independencia y puedan acceder más fácilmente a la circulación sanguínea o linfática. Por lo tanto la presencia de largas cadenas de ácido siálico unidas a NCAM en las células tumorales producirían un remodelamiento estructural al desfavorecer las interacciones intercelulares y la adhesión, (Ronn et al). En otros modelos *in vitro* utilizando células normales, se ha podido encontrar una íntima relación entre el grado de polisialilación de la NCAM, el contacto célula-célula y la concentración de calcio intracelular. Así, altos niveles de este electrolito en el citoplasma inducen la inhibición de la polisialiltransferasa presente en la cara trans del Golgi, la cual interviene en modificaciones postraduccionales de la NCAM, por un mecanismo dependiente de la PKC delta. De esta manera una concentración alta de  $Ca^{++}$  se asocia con un grado bajo de ácido siálico en la NCAM, correspondiendo con un fenotipo de baja plasticidad celular y alta adhesividad.

Por lo tanto es posible que el tratamiento de células tumorales con anticuerpos anti NCAM induzca cambios transitorios que alteren su comportamiento biológico. Así, por ejemplo se podría alterar la adhesión, penetración y crecimiento de la célula metastásica en el parénquima del órgano blanco al modular la adhesión homofílica. Para analizar esta hipótesis, células LP07 pre incubadas con anti NCAM fueron inoculadas por vía endovenosa en ratones singeneicos. Esto nos permitió observar una marcada disminución del número y tamaño de los nódulos superficiales pulmonares, sugiriendo que NCAM cumpliría un rol relevante en la

colonización del órgano blanco de la metástasis en nuestro modelo experimental. El hecho de encontrar un número reducido de MTS permitiría suponer que el tratamiento con anti NCAM modula las primeras etapas de la invasión secundaria. Pero además, el hecho de no encontrar metástasis de gran tamaño (mayor de 1mm) en los ratones inoculados con células tumorales tratadas con anti NCAM, podría implicar que también la proliferación en el pulmón podría estar alterada.

A partir de estos resultados hemos realizado estudios *in vitro* para determinar algunos de los mecanismos por los cuales NCAM estaría modulando distintos procesos relacionados en la cascada metastásica. Así, demostramos que el tratamiento de células LP07 con el anticuerpo específico anti NCAM disminuye significativamente la adhesión y la migración celular. Estos dos eventos están influenciados por las uniones célula-célula. Si bien está aceptado que la menor capacidad migratoria se asocia con un fenotipo menos invasor, el papel de la adhesión en la cascada metastásica es controvertido y paradójico. Teóricamente se espera que una menor adhesión de las células en el tumor primario ayuden a la extravasación, sin embargo se requiere una adhesión exacerbada para la invasión secundaria al órgano blanco. La menor capacidad adhesiva *in vitro* de las células LP07 tratadas con anti NCAM puede relacionarse con una menor capacidad de adherencia al endotelio pulmonar o parénquima y por ende de formación de metástasis. Cabe aclarar que en los ensayos de metástasis experimentales las células se inoculan por vía iv., por lo cual se omiten las primeras etapas de la cascada metastásica.



Otros autores, mediante ensayos de agregación a ligandos inmovilizados en microesferas, bloquearon las interacciones homofílicas con neurocam, un proteoglicano que puede unirse a NCAM y demostraron disminución de la capacidad adhesiva *in vitro* (Retzler et al). Por otro lado, un trabajo reciente demostró que inhibición de la PKC delta con agentes farmacológicos produce un aumento de la polisialilación de NCAM lo que abre la posibilidad de modular la NCAM en forma indirecta (Gallagher H et al).

Si bien adhesión y migración guardan íntima relación con la configuración del citoesqueleto, se conoce que los dominios citoplasmáticos de NCAM no interaccionan en forma directa con la actina y a partir de nuestras observaciones mediante WB bien sabemos que no modula el sistema cadherina E/  $\beta$  catenina. Sin embargo hemos visto que las células neutralizadas contra NCAM inducen, probablemente en forma indirecta, la reorganización del citoesqueleto desapareciendo significativamente las fibras de stress y aumentando la actina cortical. Quizá el tratamiento con anti NCAM, además de interferir en la adhesión de las células al sustrato induzca cambios en la concentración de calcio intracitoplasmático en otras moléculas, que conduzca tanto a un remodelamiento del citoesqueleto como a un fenotipo más normal. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con anti NCAM llevaría a las células a una forma más epitelial revirtiendo en parte la transición epitelio mesenquimática asociada a la invasión tumoral.

Nosotros observamos que las células neutralizadas con anti NCAM tienen una menor tasa de crecimiento. Se conoce que la inhibición de la

proliferación por NCAM soluble, péptidos recombinantes o por anticuerpos específicos en astrocitos, células de glioma, neuroblastoma y fibroblastos, tanto *in vivo* como *in vitro*, es causada no sólo por la inhibición de las interacciones homofilicas sino que involucra la activación de receptores glucocorticordes (Krushel L et al). Esta inhibición es específica ya que no pudo inhibirse la proliferación por agregado de NCAM soluble en células provenientes de ratones knockout para NCAM. Es posible que la modulación de las interacciones entre NCAMs, causen cambios conformacionales en estas proteínas, bloqueando vías de señalización asociadas a la proliferación celular (Krushel L et al). Por otro lado, se demostró que la sobreexpresión de la NCAM de 140 kDa en líneas celulares de glioma, reducen la tasa de crecimiento, además de reducir la invasión celular (Edvardsen K et al).

Otros autores observaron que la NCAM está involucrada en la inhibición del crecimiento por contacto en líneas de fibroblastos transformados y en líneas de cerebelo de rata (Aoki et al, Brady-Kalnay et al). Más aún, el uso de suramina, una droga que reduce la tasa de crecimiento *in vitro* de células de glioma, mostró un incremento de la expresión de NCAM en membrana (Fantini et al), sugiriendo la participación de NCAM en la regulación del crecimiento del tumor *in vitro*. Por lo tanto una mayor interacción mediada por NCAM como consecuencia de un aumento de la densidad celular, implicaría una menor tasa de crecimiento. Se conoce que la adición de NCAM soluble inhibe la actividad de la proteína activadora mitogénica MAP quinasa inducida por el factor de crecimiento fibroblástico

básico (bFGF), y que un antagonista de glucocorticoides, puede revertir este hecho (Krushel L et al).

Recientemente, observamos que el tratamiento con anti NCAM induce además apoptosis en las células LP07. Los datos preliminares sugieren que esta inducción es independiente de la expresión de las moléculas proapoptóticas Bcl2 o Bclx<sub>L</sub>.

Como se comentó más arriba la NCAM es una molécula compleja cuyo comportamiento biológico depende del número de cadenas polisialiladas que tenga. Así la presencia de NCAM de bajo PM aumenta la adhesión celular, mientras que una alta presencia de NCAM con alto contenido de PSA disminuye la adhesión y aumenta la migración celular. Nosotros demostramos que el tratamiento de células LP07 con anti NCAM disminuye la proliferación, aumenta la apoptosis y disminuye la formación de fibras de stress *in vitro*.

Es probable, si bien o es la única explicación, que los anticuerpos específicos al unirse a la molécula NCAM produzcan un efecto similar a la unión estable con otra NCAM (adhesión homofilica), induciendo una menor plasticidad celular y revirtiendo en consecuencia el fenotipo tumoral metastásico.

## **Parte B**

**Valoración de NCAM sérica como molécula  
marcadora de tumores cerebrales humanos.**

**Resultados**

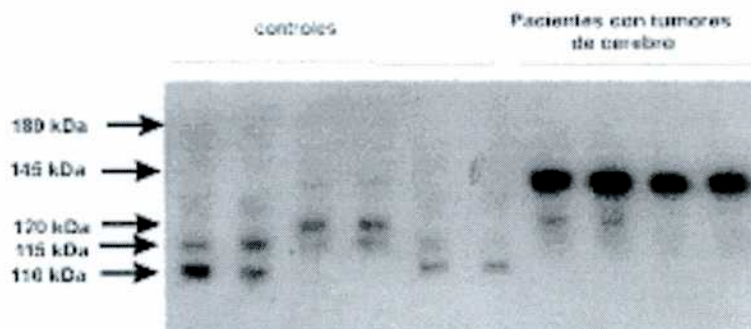
**Discusión**

**Detección de NCAM sérica**

De acuerdo a lo detallado en materiales y métodos, la NCAM sérica se estudió bajo dos condiciones diferentes. Cuando la corrida electroforética se realizó en condiciones no reductoras y se reveló con un anticuerpo monoclonal se obtuvo un patrón de bandas que oscilan entre 100 y 180 kDa (figura 8.X). Las bandas se analizaron considerando dos grupos, las de alto ( $\geq 130$  kDa) y las de bajo PM ( $< 130$  kDa). Por otro lado, cuando el SDS-PAGE se realizó bajo condiciones reductoras y se reveló con un anticuerpo policlonal se obtuvo una única banda de 80 kDa (figura 8.XI).

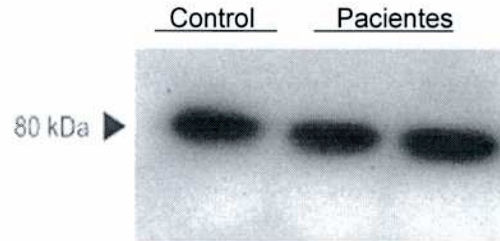
También se probaron condiciones inversas para cada anticuerpo (reducción para el monoclonal y no reducción para el policlonal), pero en estas situaciones no se obtuvieron bandas discretas que se pudieran medir fácilmente.

**Figura 8.X. Western blot de suero humano revelado con el anticuerpo monoclonal anti NCAM**



*El anticuerpo monoclonal detecta bandas específicas de alto ( $\geq 130$  kDa) y bajo peso molecular ( $< 130$  kDa) de NCAM.*

**Figura 8.XI. Western blot de suero humano revelado con el anticuerpo policlonal anti NCAM**



*Se detecta una única banda específica de NCAM de 80 kDa*

#### **Niveles de NCAM soluble en la población control**

Puesto que los valores de NCAM de 80kDa y los de las bandas de alto y bajo PM no se distribuyen en forma normal (dato no mostrado), se emplearon test no paramétricos para determinar diferencias entre los grupos en estudio.

Los valores de la NCAM sérica encontrados en la población control (n= 69) fueron estratificados de acuerdo a la edad. Como se muestra en la tabla 8.I, las bandas de 80 kDa no muestran cambios en los diferentes grupos etarios. Por otro lado, las NCAM de bajo PM decrecen en forma progresiva con la edad mientras que las de alto PM en individuos con edad avanzada.

**Tabla 8.I. Distribución de los niveles séricos de NCAM  
estratificado por la edad de los individuos de la población control.**

<b>Edad en años (n)</b>	<b>NCAM 80 kDa</b>	<b>NCAM&lt;130kDa*</b>	<b>NCAM≥130kDa **</b>
<34 (12)	1,04 (0,05-1,52)	0,72 (0,00-1,72)	0,41 (0,00-2,47)
35-44 (10)	0,91 (0,22-1,61)	0,68 (0,24-1,96)	0,26 (0,06-0,86)
45-54 (11)	0,98 (0,04-1,59)	0,60 (0,00-1,24)	0,16 (0,00-1,85)
55-64 (12)	0,69 (0,22-1,75)	0,45 (0,14-1,30)	0,69 (0,03-2,00)
65-74 (10)	0,98 (0,35-1,52)	0,35 (0,00-1,00)	0,90 (0,43-1,80)
>75 (14)	0,99 (0,69-1,93)	0,23 (0,02-1,34)	0,64 (0,00-1,95)

*\*KW test y LR test  $p<0.01$ . \*\* KW test  $p<0.01$ . Los valores se expresan en mediana y rango.*

Cuando la población control se estratificó en individuos  $<$  y  $\geq$  a los 55 años, observamos que las NCAM de bajo PM presentan un valor de mediana de 0,35 (0,00-1,34) en la población de mayor edad, mientras que los individuos jóvenes presentan valores más altos para esta isoforma [0,70 (0,00-1,96)] (Mann Whitney,  $p<0,01$ ).

Por otra parte, la NCAM de alto PM se encuentra significativamente elevada en individuos mayores de 55 años [0,82 (0,00-2,00)] respecto de los más jóvenes [0,27 (0,00-2,47)] (Mann Whitney,  $p<0,01$ ).

Los niveles de NCAM también fueron analizados acorde al sexo. La tabla 8.II muestra que sólo las isoformas de alto PM fueron mayores en las mujeres.

**Tabla 8.II. Valores de NCAM circulante respecto del sexo en la población control**

<i>NCAM</i>	<i>Femenino</i>	<i>Masculino</i>	<i>p*</i>
<b>80 kDa</b>	1,01 (0,22-1,93)	0,88 (0,04-1,59)	NS
<b>NCAM&lt;130kDa</b>	0,55 (0,00-1,73)	0,73 (0,00-1,96)	NS
<b>NCAM&gt;130kDa</b>	0,67 (0,03-2,48)	0,31 (0,00-1,95)	0,01

*\* MW Test. Los valores se expresan en mediana y rango.*

Posteriormente, el efecto de la edad y el sexo sobre la distribución de NCAM fue analizado en conjunto. Mediante un estudio multivariado cuando los datos fueron ajustados por sexo y edad, sólo las isoformas de bajo PM difirieron significativamente con la edad ( $p < 0,01$ ), siendo las otras diferencias no significativas.

También se analizó la posible asociación entre las NCAM de bajo versus las de alto PM de cada individuo de la población control, no encontrándose correlación entre estos valores.

### **Niveles de NCAM en pacientes con tumores de cerebro**

En la siguiente tabla se muestran las características de las poblaciones estudiadas (tabla 8.III)

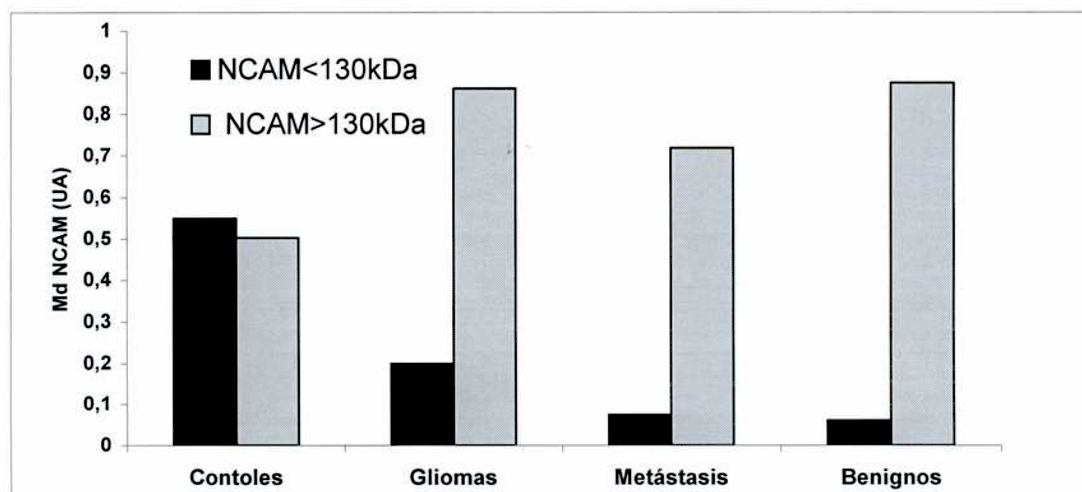


**Tabla 8.III: Características de las poblaciones estudiadas**

	Mujeres / Varones	Mediana de la edad (rango)
<b>Controles (n=69)</b>	40/29	55 (19-87)
<b>Gliomas (n=34)</b>	14/20	58 (24-77)
<b>Mts. cerebrales (n=27)</b>	14/13	56 (33-79)
<b>Tumores benignos (n=22)</b>	15/7	47 (27-72)

Como puede observarse en la figura 8.XII, las isoformas de NCAM  $\geq 130\text{kDa}$  aumentan mientras que las NCAM  $< 130\text{kDa}$  disminuyen en la población tumoral respecto del control ( $p < 0,01$ ).

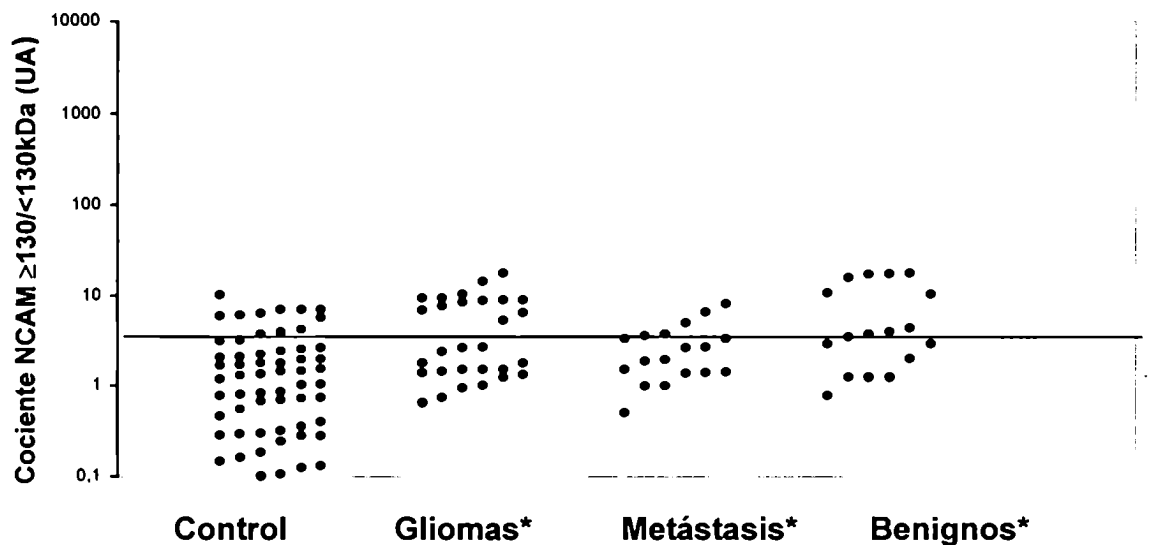
**Figura 8.XII . Valores de NCAM sérico de alto y bajo peso molecular en las poblaciones estudiadas.**



*Distribución de isoformas de alto y bajo peso molecular de NCAM en controles sanos y en pacientes con patología tumoral cerebral. Se grafican medianas de cada grupo.*

Por lo tanto el cociente  $\geq 130 / < 130 \text{kDa}$  de NCAM está aumentado en los pacientes con tumores cerebrales vs controles sanos ( $p < 0,001$ ). La figura 8.XIII muestra la distribución de esta relación para cada uno de los individuos en los distintos grupos en estudio. Mediante el uso de la curva ROC se eligió el nivel de NCAM del percentilo 80 de la población control como valor de corte. Se encontró que 17/33 (52%) pacientes con gliomas, 16/27 (59%) con metástasis y 15/22 (68%) con tumores cerebrales benignos presentan valores elevados de NCAM  $\geq 130 / < 130 \text{kDa}$  respecto de los controles (14/69, 20%) ( $p < 0,01$ ). El análisis multivariado indicó que estas diferencias son independientes de la edad y sexo.

**Figura 8.XIII. Distribución del cociente NCAM  $\geq 130 / < 130 \text{kDa}$  en pacientes y controles**

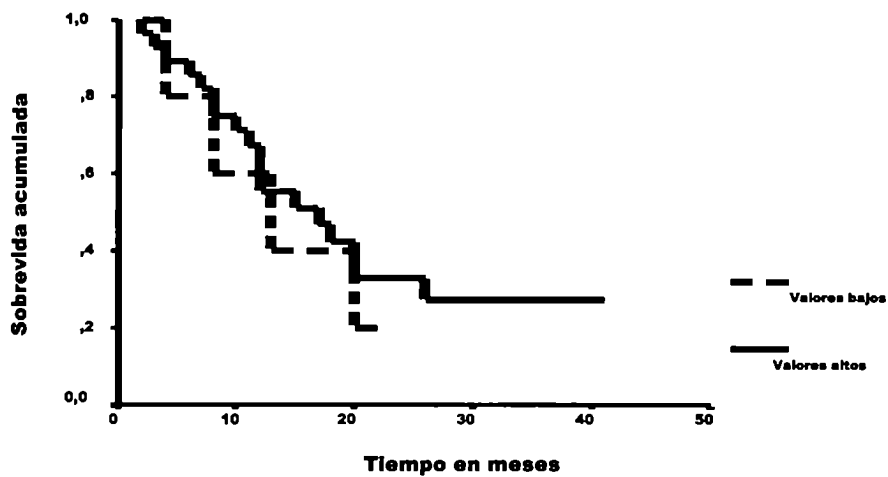


*Distribución de los valores del cociente NCAM  $\geq 130 / < 130 \text{kDa}$  en las poblaciones estudiadas. La línea de corte pertenece al percentilo 80 de la población control (3.2 UA). Puede observarse que los pacientes con patología tumoral cerebral presentan valores significativamente elevados de NCAM  $\geq 130 / < 130 \text{kDa}$ .*

NCAM sérico mostró una especificidad del 80% y una sensibilidad del 60% para identificar pacientes con tumores cerebrales, con un VP+ del 60% y VP- del 80%.

Si bien se encontró aumento en el cociente de NCAM  $\geq 130 / < 130$  kDa sérico asociado a la patología tumoral cerebral, no se pudo discriminar entre tumor maligno o benigno. Tampoco se encontraron diferencias dentro del grupo de pacientes que presentaban metástasis de diferente origen.

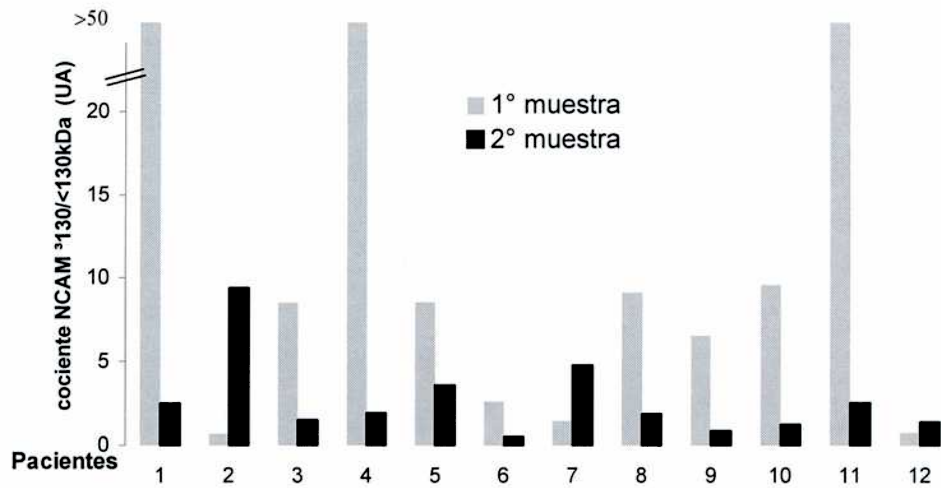
Debido a que ninguno de los pacientes con gliomas presentaron tumores de bajo grado histológico, no fue posible establecer ninguna correlación con respecto al grado de malignidad. Por otro lado, se estudió si los niveles de NCAM estaban asociados con la sobrevida global. Para ello se realizaron las curvas de Kaplan Meier (figura 8. XIV), no observándose diferencias entre pacientes con valores altos y bajos de NCAM  $\geq 130 / < 130$  kDa (Log Rank test NS).



*Curva de Kaplan Meier. No se observan diferencias en la sobrevida global entre ambos grupos.*

En relación a la utilidad de los niveles séricos de NCAM para efectuar el seguimiento de los pacientes, fue posible tomar una segunda muestra (entre 1-3 meses) luego del tratamiento quirúrgico. En 12 pacientes se vio que la remoción del tumor se corresponde con una disminución del valor sérico de NCAM  $\geq 130 / < 130$  kDa, independientemente del valor inicial (figura 8.XV).

**Figura 8.XV. Distribución de NCAM  $\geq 130$ / $<130$ kDa en pacientes con gliomas pre y post tratamiento quirúrgico**



*En 9/12 pacientes con glioma se observa disminución de NCAM  $\geq 130$ / $<130$ kDa sérico.*

**Discusión: NCAM como marcadora soluble de patologías tumoral**

La identificación de moléculas producidas por el tumor o por el huésped constituye una herramienta muy útil para establecer el diagnóstico y pronóstico del paciente oncológico. En los últimos años muchos investigadores se han abocado a la búsqueda de este tipo de marcadores tumorales ya que permitirían entre otras cosas, anticiparse a las manifestaciones de déficit funcional del paciente cuando las posibilidades curativas son mucho mayores (Costa et al).

Una dificultad diagnóstica que presentan los tumores del sistema nervioso central deriva de la amplia gama de aspectos histológicos que presentan estas neoplasias. Este hecho puede dar lugar a la presencia de similitudes morfológicas importantes entre tumores de muy diferente origen y pronóstico. Los tumores derivados de la glia son raramente metastásicos pero son muy invasivos localmente. Si bien el pronóstico de estos pacientes es malo, hay variación en la evolución de cada uno de ellos (Varela et al). Por lo tanto es de particular interés la identificación de posibles marcadores tumorales, de los cuales, se carece hasta el momento.

La NCAM es una molécula de adhesión que se expresa en el cerebro asociada a neuronas y células gliales. Esta molécula participa en las uniones intercelulares y se ha hipotetizado que en procesos neuroproliferativos, sobre todo en tumores invasivos estaría desregulada (Sherbert y Lakshmi).

## Capítulo 9

### NCAM en relación a la patología neurodegenerativa

**Resultados**

**Discusión**

**Análisis de NCAM en pacientes con Demencia tipo Alzheimer (DTA)**

Acorde a las diferencias encontradas y con el objetivo de estudiar a NCAM en una patología cerebral neurodegenerativa, como la demencia tipo Alzheimer, se comparó la expresión de NCAM circulante en estos pacientes con un subgrupo de la población control mayor a 55 años (n=35). En la siguiente tabla se detallan las características de las poblaciones analizadas (tabla 9.I).

**Tabla 9.I: Características de las poblaciones estudiadas**

	<b>Mujeres / Varones</b>	<b>Mediana de la edad (rango)</b>
<b>Controles mayores de 55 años (n=35)</b>	16/19	70 (55-87)
<b>DTA (n=43)</b>	32 / 11	82 (59-95)

Como se muestra en la tabla 9.II, no existen diferencias en los niveles de NCAM soluble de 80 kDa entre pacientes con enfermedad neurodegenerativa y los controles.

Por otro lado, los análisis densitométricos del Western blot revelados con el anticuerpo monoclonal (figura 9.I) indicaron un incremento en las bandas de NCAM tanto de alto como de bajo PM, en la población de pacientes DTA respecto de los controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

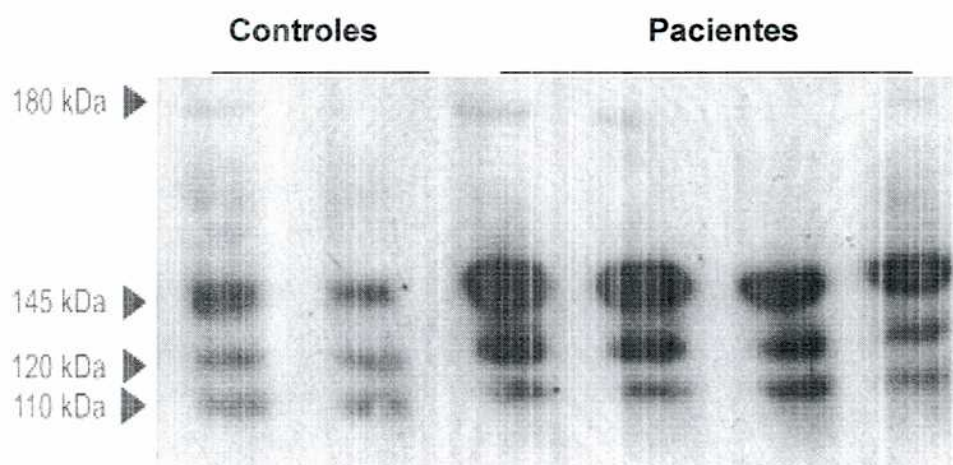


**Tabla 9.II. Valores de NCAM sérica en pacientes con Demencia tipo Alzheimer en comparación a la población control mayor de 55 años**

<b>NCAM</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes DTA</b>	<b>p*</b>
<b>80 kDa</b>	0,97 (0,22-1,93)	0,94 (0,15-2,11)	NS
<b>NCAM&lt;130kDa</b>	0,35 (0,00-1,34)	0,70 (0,56-18,62)	0,01
<b>NCAM≥130kDa</b>	0,82 (0,00-2,00)	1,18 (0,14-6,24)	0,01

*MW Test. Los valores fueron expresados en mediana y rango.*

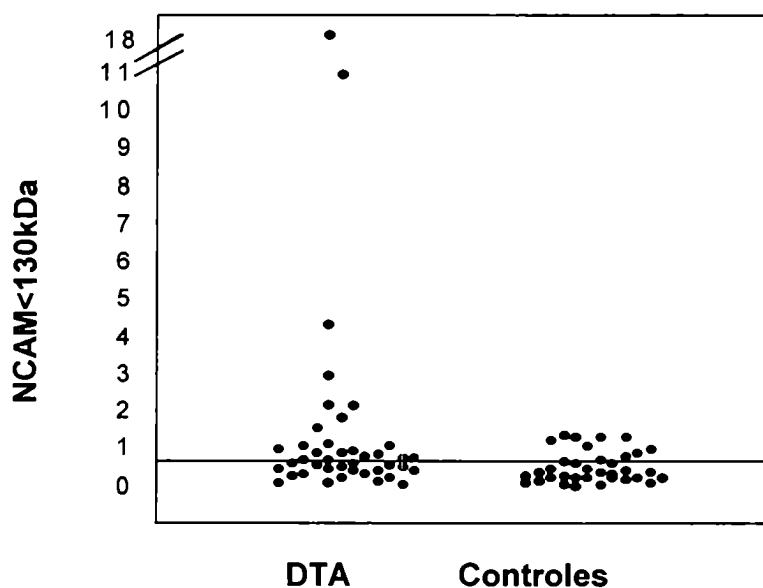
**Figura 9.I. Western blot de suero humano revelado con el anticuerpo monoclonal anti NCAM**



*El anticuerpo monoclonal detecta bandas específicas de alto ( $\geq 130$  kDa) y bajo peso molecular ( $< 130$  kDa) de NCAM.*

Las figuras 9.II y 9.III muestran la distribución de las NCAM de bajo y de alto PM en el suero de cada uno de los individuos con demencia y en los controles. El valor de referencia de 0,63 UA para NCAM de bajo PM y de 1,06 UA para las de alto PM, fueron elegidas utilizando el punto de inflexión de cada una de las curvas ROC de manera de maximizar la sensibilidad y la especificidad. Estos puntos corresponden al valor del percentilo del 70% de la población control (individuos mayores de 55 años), tanto para las isoformas de alto como de bajo PM de esta molécula sérica de adhesión. Así en cada caso, valores por sobre el punto de corte elegido fueron definidos como valores elevados de NCAM.

**Figura 9.II. Distribución de los valores de NCAM <130kDa en el suero de pacientes DTA y controles mayores de 55 años.**

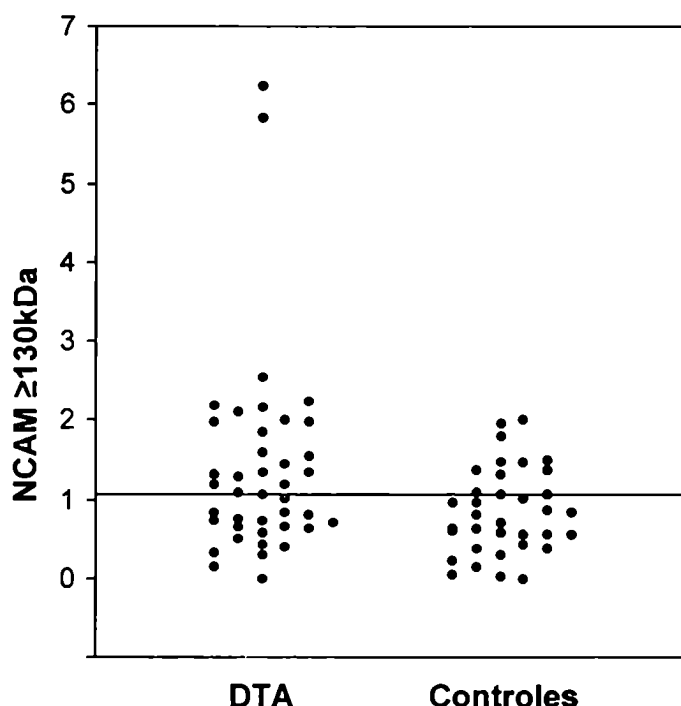


**Valores elevados/ total (%) 22/43 (51,2)\* 10/35 (28,6)**

*El punto de corte de estas isoformas es de 0,63 unidades arbitrarias*

*(UA). \*p<0,05, X<sup>2</sup> Test.*

**Figura 9.III. Distribución de NCAM  $\geq 130$ kDa en el suero de pacientes con DTA y en controles.**



**Valores elevados/ total (%)**    23/43 (53,5)\*    10/35 (28,6)

El punto de corte corresponde a 1,06 UA, \* $p < 0,05$ ,  $\chi^2$  Test.

Como se indica en las figuras 9.II y 9.III, sobre la base del punto de corte óptimo, el número de pacientes con demencia con valores elevados de NCAM sérica,  $\geq$  o  $<$  130kDa, es mayor que en los controles, siendo esas diferencias estadísticamente significativas. Además el porcentaje de pacientes con valores elevados de NCAM es idéntico para ambas isoformas de bajo y alto PM. Un análisis posterior indicó que 18 pacientes presentan ambas isoformas elevadas, 4 muestran aumentadas sólo las de bajo PM y 5 pacientes sólo las de alto PM. Los pacientes con valores muy elevados de NCAM para cualquiera de las isoformas corresponden a individuos con alto deterioro cognitivo o con un largo período de evolución de la enfermedad.

La determinación de los niveles de NCAM en la población de pacientes estudiados, mostró una Sensibilidad del 51,2% para las isoformas de bajo PM y del 53.5% para las de alto PM y una Especificidad del 71,4% para ambas. El VP+ fue del 70% y el VP- del 54,3% para ambas isoformas.

Para dilucidar el rol de NCAM sobre la patogénesis de la enfermedad, se analizó si la severidad del deterioro cognitivo del paciente DTA, medido con la escala GDS, se asocia con los niveles de NCAM sérica. No se encontró asociación entre el deterioro cognitivo y los niveles de NCAM de alto PM. Sin embargo, se encontró un porcentaje menor de pacientes con GDS moderado con valores elevados de NCAM de bajo peso molecular (33,0%), respecto del observado en pacientes con GDS avanzado (55,6%).

### Discusión

Como se detalló previamente las moléculas de adhesión celular (CAMs), como la NCAM, son macromoléculas de superficie que controlan las interacciones célula-célula durante el desarrollo del sistema nervioso, regulando procesos como la adhesión neuronal, la migración, el crecimiento de las neuritas, la sinaptogénesis y la señalización intracelular (Hampel H et al). Se han encontrado varias CAMs en la membrana pre y postsináptica de las neuronas del hipocampo (Schuster, et al). Además, se ha implicado a la NCAM, especialmente a las isoformas de alto peso molecular, en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Lüthi et al; Solomonía et al). En este sentido, Rusakov y colaboradores describieron una alta inmunopositividad para la NCAM de alto peso molecular en una región relacionada con la memoria del cerebro anterior en pollos, y el equipo de Shuster observó un incremento de la NCAM de 180 kDa asociada con el tiempo de potenciación (un modelo muy usado para estudiar plasticidad sináptica) en ratas adiestradas.

El tratamiento con anticuerpos contra NCAM o la modificación de esta molécula por remoción enzimática de sus cadenas de ácido siálico, sobre cortes de hipocampo o cultivo de sus células, resultaron en un decaimiento del tiempo de potenciación en la respuesta sináptica y en el aprendizaje (Becker et al, Kramer et al). Tomando en cuenta estas evidencias, no es sorprendente que esta molécula presente alteraciones relacionadas con la edad o las enfermedades de déficit cognitivo.

La mayoría de los análisis en NCAM en relación a diversos procesos fisiológicos o patológicos, fueron realizados sobre las isoformas ancladas a membrana. Sin embargo, estudios recientes muestran que también existe una forma soluble liberada de la superficie celular (Bock E et al; Lynch et al). Y como ya se mencionó no se han realizado estudios sistemáticos de las isoformas solubles de NCAM en la población sana. En el capítulo anterior (Capítulo 8), describimos que mientras la isoforma de NCAM 80 kDa, detectada con un anticuerpo policlonal en condiciones reductoras, no mostró variación con la edad ni el sexo en individuos de la población sana, las isoformas de bajo peso molecular de NCAM (de 100-130 kDa) disminuyeron significativamente con la edad y estas diferencias fueron más marcadas después de los 55 años.

Uno de los objetivos de esta tesis consistió en determinar si los niveles de NCAM circulantes se modifican en enfermedades asociadas al deterioro cognitivo como la DTA. Debido a que las neuronas son una fuente de NCAM importante, no es sorprendente que los sueros provenientes de individuos con pérdida neuronal severa posean niveles alterados de esta molécula. En los últimos años, algunos trabajos indicaron que conjuntamente con la neuropatología progresiva observada en los pacientes DTA también se detectan cambios en el cerebro asociados a la plasticidad. Se cree que estos cambios forman parte de un intento del cerebro por restaurar su estructura y funcionamiento y para compensar el daño causado por la

enfermedad. Sin embargo, no se puede descartar que estos cambios se deban al desarrollo patológico de la enfermedad (Mikkonen et al a y b).

Actualmente no se dispone de marcadores moleculares capaces de detectar tempranamente la DTA y ésta es diagnosticada usualmente en estadios avanzados. Nosotros encontramos un incremento significativo en los niveles de NCAM circulante en un grupo de 43 pacientes con DTA comparados con individuos mayores de 55 años neurológicamente sanos. Los aumentos séricos de NCAM podrían deberse a una alteración de su expresión en el tejido cerebral. En este sentido otros autores determinaron que aún cuando las diferencias en la expresión de NCAM en la corteza occipital y en el hipocampo de individuos DTA fueron mínimas comparadas con individuos sanos de la misma edad, la presencia de neuronas positivas para NCAM en la corteza frontal fue significativamente menor (Yew et al). Por otro lado, se determinaron alteraciones de la PSA NCAM en el giro dentado de individuos DTA (Mikkonen et al).

Hasta el momento, el diagnóstico neuropatológico de la DTA está basado en identificar una serie de cambios en el cerebro. Mediante estudios generalmente realizados sobre tejidos obtenidos de autopsias. Sin embargo, tienen limitaciones ya que muchas moléculas y procesos no son estables en la agonía o postmortem. Así, por ejemplo, la medicación utilizada en estos pacientes podría estar enmascarando efectos sobre el cerebro postmortem. Algunos autores han sugerido que las manifestaciones fuera el sistema nervioso central de los pacientes DTA podría ser biológicamente relevante y

clínicamente útiles (Nordenson et al). Hasta el momento, ninguna de las alteraciones estudiadas en tejidos no neuronales de los pacientes con DTA, como fosforilaciones del precursor amiloide (APP), manifestaciones sistémicas de mecanismos inmunológicos e inflamatorios, proteasas como las hidrolasas lisosomales y sustratos como espectrina o anomalías en el metabolismo energético mitocondrial fueron útiles como marcadores de diagnóstico de la enfermedad (Blass et al).

En un trabajo reciente, Merche y colaboradores reportaron que los niveles de apolipoproteína E, en el líquido cefalorraquídeo se encuentran incrementados, pero sólo en las etapas más avanzadas de la enfermedad de Alzheimer. Además, los procedimientos para obtener esas muestras son invasivos y poco prácticos para ser implementados como rutina.

Es una hipótesis atractiva pensar que las alteraciones de los niveles de NCAM sérica podrían servir para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Nosotros encontramos que tanto las isoformas de bajo como las de alto peso molecular están aumentadas en el suero de más del 50% de los pacientes con DTA. Ambas isoformas demostraron tener la misma utilidad para el diagnóstico de esta demencia, a pesar de que existen algunos solapamientos entre los valores encontrados en los individuos sanos y los pacientes. Aunque el criterio para establecer la línea de corte empleada muestra una buena especificidad (71,4 %), aproximadamente la mitad de los pacientes DTA tienen niveles de NCAM por debajo de esta línea (falsos negativos), por lo que la sensibilidad es pobre (aprox. 50%). Aunque la utilidad de la NCAM sérica es limitada para poder distinguir entre pacientes



DTA de individuos de avanzada edad, su potencial utilidad clínica es importante dado que no existen marcadores solubles disponibles para esta patología.

En relación al diagnóstico diferencial con otras enfermedades del sistema nervioso, nosotros hemos encontrado que los valores de NCAM circulante son similares a los hallados en la población control en unos pocos pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica, un proceso neurodegenerativo sin déficit cognitivo (resultado no publicado). Además otros autores encontraron niveles elevados de NCAM tanto en el suero como en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia (Poltorak et al; Lyons et al). Dado que se hipotetiza que esta enfermedad se genera a partir de anomalías durante el desarrollo del cerebro, es interesante observar que un incremento de células polisialiladas en el hilio, asociado a una disminución de la expresión de neuronas polisialiladas en la placa de células granulares en un período que precede a la adolescencia, cuando la enfermedad es observada en la mayoría de los individuos afectados. La modulación defectiva de la NCAM polisialilada tendría futuras implicancias para el procesamiento de la conducción de la información censada por la corteza prefrontal, la cual se cree tiene una deficiencia de la memoria de trabajo en la esquizofrenia. La evaluación de fragmentos de NCAM en el suero o líquido cefalorraquídeo de esquizofrénicos fue propuesto como factor etiológico de este síndrome (Ni Dhuill et al).

Es interesante recalcar que las isoformas de bajo peso molecular de NCAM parecen estar relacionadas a la severidad del deterioro cognitivo. Más aún, nosotros observamos que aquellos pacientes DTA con los valores más elevados de NCAM sérico de bajo peso molecular tienen GDS avanzado y/o tienen una larga evolución de su enfermedad. Quizá, estas isoformas (<130 kDa) podrían ser útiles para identificar biológica y clínicamente subgrupos de pacientes y así ayudar a la detección temprana, seguimiento y eventualmente tratamiento de la enfermedad.

Desconocemos cual es el origen de la NCAM circulante, aunque es probable que provenga de la masa cerebral. Es nuestra intención estudiar si las neuronas o células gliales puestas en condiciones que imiten procesos neurotóxicos degenerativos como en el Alzheimer muestren cambios en la NCAM a nivel de membrana o soluble. Como un primer acercamiento determinamos en forma preliminar y en colaboración con la Dra Mónica Kotler del departamento de Química Biológica de la FCEyN de la UBA, que el tratamiento de astrocitos de rata con un inductor de stress celular como es el Mn (1mM), induce la pérdida de la NCAM de 180 kDa tisular, no habiendo cambios en las NCAM de 120 kDa. Estamos estudiando si la pérdida de NCAM de 180 kDa se debe a una menor síntesis de la molécula o a la acción de enzimas proteolíticas que degraden sus dominios extracelulares.

En conclusión, hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo que describe niveles séricos alterados de NCAM en pacientes DTA tanto de las isoformas de alto como de bajo peso molecular. Dado que se observó un incremento en el número de pacientes con valores elevados de las NCAM de

bajo peso molecular relacionado a la evolución de la enfermedad, esta molécula de adhesión podría estar implicada en la patogénesis del desorden neurodegenerativo y podría dar información acerca de la evolución de este proceso y ser potencialmente útil como nueva marcadora de diagnóstico y evolución de la enfermedad.

## **Capítulo 10**

### **Conclusiones finales**

### **Conclusiones finales**

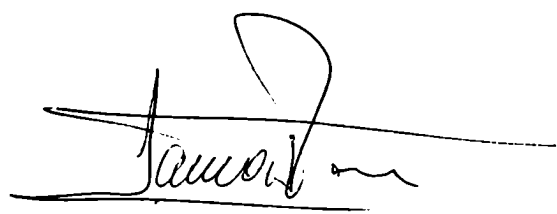
Este trabajo aporta nuevas evidencias sobre el papel de la molécula de adhesión NCAM en diferentes patologías neurodegenerativas y neuroproliferativas.

Así, el hecho de revertir en parte el fenotipo tumoral y de reducir el número y el tamaño de las metástasis pulmonares con el tratamiento con anticuerpos específicos anti NCAM, del adenocarcinoma de pulmón con componente neuroendócrino LP07, abre la posibilidad de utilizar esta molécula como blanco terapéutico ya sea directa o indirectamente.

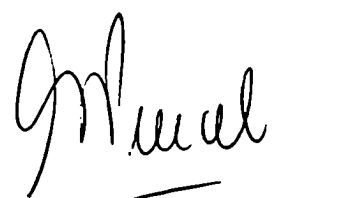
Por otro lado, hemos descrito por primera vez la presencia de distintas isoformas de NCAM en el suero de individuos sanos y en relación con la edad y el sexo de los individuos.

Además, demostramos que los valores de NCAM  $\geq 130$  kDa están elevados en el suero de los pacientes con tumores cerebrales, marcando la presencia tumoral aunque no discrimina entre patología benigna de maligna. NCAM sérica parece no ser útil como marcador pronóstico en pacientes con gliomas. Sin embargo, el hecho de que los valores bajan luego de la cirugía, propone a la NCAM como un posible marcador útil de seguimiento en esta enfermedad. Otra utilidad posible sería su empleo en la detección de metástasis cerebrales en pacientes con otros tumores primarios. Cabe destacar que los tumores cerebrales tienen baja incidencia, por lo que estudios en este tipo de patologías son muy difíciles.

En cuanto al estudio sobre patología neurodegenerativa como la Demencia tipo Alzheimer, demostramos que todas las isoformas de NCAM sérica están aumentadas. Si bien la especificidad es alta la sensibilidad es aproximadamente cercana al 50%, por lo tanto su aplicación es limitada. Sin embargo este hallazgo es relevante ya que no se conocen otros marcadores circulantes no invasivos para la detección de la enfermedad de Alzheimer. Dado que observamos que existe una asociación de la expresión de NCAM circulante con el grado de deterioro cognitivo se la podría utilizar como marcador de seguimiento.



L. TOBARO



Puricelli LYDIA

## Capítulo 11

### Bibliografía

- Aguirre Ghiso Julio, Daniel Alonso, Eduardo Farías and Elisa Bal de Kier Joffé. Overproduction of urokinase-type plasminogen activator is regulated by phospholipase D and protein kinase C-dependent pathway in murine mammary adenocarcinoma cell. *Biochim Biophys Acta* 1356: 171-184, 1997. a
- Aguirre Ghiso Julio, Daniel Alonso, Eduardo Farías, Daniel Gómez and Elisa Bal de Kier Joffé. Minireview: Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *European Journal of Biochemistry* 263:295-304, 1999.b
- Aletsee-Ufrecht M, Langley K, Rotsch M, Havemann K, Gratzl M. NCAM: a surface marker for human small cell lung cancer cell lines. *FEBS lett*; 267: 295-300, 1990.
- Aoki J, Umeda M, Takio K, Titani K, Utsumi H, Sasaki M, Inoue K. Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M. *J Cell Biol.* 115(6):1751-61, 1991.
- Becker, C.G, Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welz, H. and Schachner, M. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45, 143-152, 1996.
- Berger MS. Malignant astrocytoma: surgical aspects. *Seminars in Oncology* 21: 172-185, 1994.
- Blass, J.P. and Gibson,G.E. Nonneural markers in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and Associated disorders* 6: 205-224,1993.
- Bock E, Edvardsen JC, Gibson A, Linneman D, Lyles JM, Nybroe O. Characterization of soluble forms of N-CAM. *FEBS lett*; 225:33-6, 1987.
- Boyer MJ, Tannock IF. Lysosomes, lysosomal enzymes, and cancer. *Adv Cancer Res Review* 60:269-91, 1993.
- Brady-Kalnay SM, Boghaert ER, Zimmer S, Brackenbury R. Increasing N-CAM-mediated cell-cell adhesion does not reduce invasion of RSV-transformed WC5 rat cerebellar cells. *Clin Exp Metastasis*, 11(4):313-24, 1993.
- Brocks CS, Bower M. Current perspectives in gliomas. *Med Oncol*, 14:103-120, 1997.



- Chim C, Lam C, Nicholls J, Ooi G, and Kwong Y. Unusual Hematologic Malignancies: Case 3. CNS Involvement in CD56-Positive Intestinal Gamma/Delta T-Cell Lymphoma *JCO* 1: 3742-3744, 2002.
- Casasnovas JM, Springer TA, Liu JH, Harrison SC, Wang JH. Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature*. 15; 387(6630):312-5, 1997.
- Cavalla P. Schiffer D. Cell cycle and proliferation markers in neuroepithelial tumors. *Anticancer Res*, 17:4135-4144, 1997.
- Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 1260-1270, 1997.
- Cole G, Loewy A, Cross NV, Akeson R, Glaser L. Topographic localization of the heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Cell Biol*; 103:1739-44, 1986.
- Costa, José and Cordon – Cardo, Carlos. Cancer diagnosis molecular pathology in *Principles of Oncology* Edited by Vincent T. De Vita, Jr, Samuel Hellman and Steven A. Rosenberg, published in USA by Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.- 6 edition, Vol 1 Chapter 26 –641-657, 2001.
- Cotman, C.W., Hailer, N.P., Pfester, K.K., Soltesz, I., Schachner, M. Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations?. *Prog. Neurobiol* 55:659-669, 1998.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, 3;367(6462):455-9, 1994.
- Crossin KL, Krushel LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn. Review*, 218(2):260-79. 2000.
- De Ridder L. Autologous confrontation of brain tumor derived spheroids with human dermal spheroids. *Anticancer Res*, 17:4119-4120, 1997.
- De Wit PE, Van Muijen GN, De Waal RM, Ruiters DJ. Pathology of malignant melanoma, including new markers and techniques in diagnosis and prognosis. *Curr Opin Oncol. Review*; 8(2):143-51, 1996.

- Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle. A review. *Neurosurgery*, 40:1000-1013, 1997.
- Doyle, E., Nolan, P.M., Bell, R., Regan, C.M. Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in rats. *J. Neurochem*, 59: 1570-1573, 1992.
- Edvardsen K, Pedersen PH, Bjerkvig R, Hermann GG, Zeuthen J, Laerum OD, Walsh FS, Bock E. Transfection of glioma cells with the neural-cell adhesion molecule NCAM: effect on glioma-cell invasion and growth in vivo. *Int J Cancer*. 1;58(1):116-22, 1994.
- Ewing J. A treatise on tumors, 3rd edn. W. B saunders, Philadelphia, 1928.
- Fantini F, Pincelli C, Seignani C, Baraldi A, Giannetti A. Langerhans cells can express neuron-specific enolase immunoreactivity. *Arch Dermatol Res.*;283(1):10-2, 1991.
- Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 19: 473-483. 1996
- Finn PE, Bjerkvig R, Pilkington GJ. The role of growth factors in the malignant and invasive progression of intrinsic brain tumours. *Anticancer Res*, 17:4163-4172, 1997.
- Fletcher, R.H, Fletcher, SW and Wagner EH. *Clinical epidemiology. The essentials. Second edition.* Edited by Fletcher RH et al published in USA by Williams and Wilkins, baltimor. Chapter 3, 42-75, 1998.
- Fox, G.B., Auerbach, B., Gerardy-Schahn, R., Eckhardt, M., Jaques, G. and Madry, N. Polysialylated neural cell adhesion molecule expression by neurons and astroglial processes in the rat dentate gyrus declines dramatically with increasing age. *Ont. J. Dev. Neurisci*. 13 : 663-672, 1995.
- Gallagher HC, Odumeru OA, Regan CM. Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation state by cell-cell contact and protein kinase C delta. *J Neurosci Res*. 15;61(6):636-45, 2000.
- Gallagher HC, Murphy KJ, Foley AG, Regan CM. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem.*, 77(2):425-34. 2001.

- Garbisa S, Scagliotti G et al. Correlation of Serum Metalloproteases levels with Lung Cancer matastasis and Response to therapy. *Cancer Research* 52: 4548-4549, 1992.
- Gómez DE, Alonso, DF, Yoshiji, H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Europ. J cell biol.* 2:111-122, 1997.
- Gómez, DE y Alonso DF. Introducción a la oncología molecular. (Universidad Nacional de Quilmes). Primera edición. Capítulo 9, 147-160, 1998.
- Goridis C, Brunet JF. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Semin Cell Biol,* 3:189-197. 1992
- Gower H, Barton CH, Elsom VL, Thompson J, Moore S, Dickson G, Walsh FS. Alternative splicing generates a secreted form of NCAM in muscle and brain. *Cell;* 55:955-64, 1988.
- Gower HJ, Barton CH, Elsom VL, Thompson J, Moore SE, Dickson G, Walsh FS. Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell.,* 23;55(6):955-64 1988.
- Gratsa A, Rooprai HK, Rogers JP y col. Correlation of expression of NCAM and GD3 ganglioside to motile behaviour in neoplastic glia. *Anticancer Res,* 17:4111-4118, 1997.
- Grem, Jean. The prognostic importance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Oncology* 9: 380-387, 1997.
- Hampel H, Korschenhausen DA, Schwarz MJ, Frenzel KH et al. *Neuroimmunomodulation,* 4:57-61, 1997.
- Hampel, H., Schwarz, M.J., Kötter, H.U., Schneider, C. and Müller. Cell Adhesion molecule in central nervous system. *DN&P* 9: 69-81, 1996.
- Humphries M.J. and Newham P. The structure of cell-adhesion molecules. *ReviewsTrends in Cell biology Review,* 8: 78-83, 1998.
- Ibsen S, Berezin V, Norgard-Petersen, Bock E. Quantification of the D2 glycoprotein in amniotic fluid and serum from pregnancies with foetal neural tube defects. *J Neurochem;* 41:363-6, 1983
- James CD, Olson JJ. Molecular genetics and molecular biology advances in brain tumors. *Current Opinion in Oncology,* 8:188-195, 1996.

- Jaques G, Auerbach B, Pristich M, Wolf M, Madry N, Havemann K. Evaluation of serum adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer*, 72:418-25, 1993.
- Jones EY, Harlos K, Bottomley MJ, Robinson RC, Driscoll PC, Edwards RM, Clements JM, Dudgeon TJ, Stuart DI. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature*. 9;373(6514):539-44, 1995
- Kadono Y, Okada Y, Namiki M, Seiki M, Sato H. Transformation of epithelial madin-darby canine kidney cells with p60v-src induces expression of membrane type I matrix metalloproteinase and invasiveness. *Cancer Research* 58: 2240-2244, 1998.
- Kaiser U, Oldenburg M, Jaques G, Auerbach B, Havemann K. Soluble CD56 (NCAM): a new differential-diagnostic and prognostic marker in multiple myeloma. *Ann Hematol.*, 73(3):121-6 1996.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Orr EA, Savelieva E, Owens GC, Kruse CA. Paucity of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) nuclear immunostaining in gliomas and inability of retinoic acid to influence neural cell adhesion molecule (NCAM) expression. *J Neurooncol.*, 41(1):31-42, 1999.
- Kramer, L., Hall, H., Bleistein, U. and Schachner, M. Developmentally regulated masking of an intracellular epitope of the 180 kDa isoform of the neural cell adhesion molecule NCAM. *J. Neurosci. Res.* 49, 161-175, 1997.
- Krushel LA, Tai MH, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3;95(5):2592-6, 1998.
- Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227, 680-689, 1970.
- Langley O, Aletsee MC, Grant NJ, Gratzl M. Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J Histochem Cytochem*; 37:781-91, 1989.
- Langley O, Aletsee MC, Gratzl M. Endocrine cells share expression of NCAM with neurones. *FEBS Lett*; 220:108-12, 1987.

- Langley O, Aunis D. Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2 protein in adrenal medulla. *Cell Tissue Res*; 238:497-502, 1984
- Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol.*, 22(10):1267-76, 1998
- Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 410: 24-25, 2001.
- Livingstone B, Jacobs J, Glick M, Troy F. Extended polysialic acid chain (n>55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*; 263:9443-8, 1988.
- Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *TIG*, 11, 1995.
- Lüthi, A., Laurent, J.P., Figurov, A., Müller, D., Schachner, M. Hippocampal long term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372, 777-779, 1994
- Lynch, D.F., Hassen, W., Clements, M.A., Schellhammer, P.F. and Wright Jr., G.L. Serum levels of endothelial and neural cell adhesion molecules in prostate cancer. *The Prostate* 32, 214-220, 1997
- Lyons, F., Martin, M.I., Maguire, C., Jackson, A., Regan, C.M., Shelley, R.K. The expression of a NCAM serum fragment is positively correlated with severity of negative features in Type II schizophrenia. *Biol. Psychiat.* 23: 769-775., 1988.
- Maidment SL, Rucklidge GJ, Rooprai HK, Pilkington GJ. An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.*, 3;116(1):71-7, 1997.
- Margolis RK, Margolis RU. Distribution and characteristics of polysialosyl oligosaccharides in nervous tissue glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*; 116:889-94., 1983.
- Massova I et al. Matrix metalloproteinases: Structures, evolution and diversification *FASEB J* 12 : 1075-1095, 1998.
- Matos E, Loria D, Vilensky M, García C. Atlas de mortalidad por cáncer. Argentina 1997-2001. Ed Comisión Argentina de Coordinación. Programa Latinoamericano contra el cáncer, 2002.

- Matrisian LM, Crawford HC, Fingleton B. Matrix metalloproteinases in tumor progression. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 40: 769-770, 1999.
- Merched, A., Blain, H., Visvikis, S., Hebeth, B., Jeandel, C., Siest, G. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E level is increased in late-onset Alzheimer's disease. *J. of Neurosurgical Science* 145, 33-39, 1977
- Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer* 2:214-221, 1998.
- Mikkonen, M. , Soininen, H., Alafuzoff, I., Miettinen, R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 12, 311-325, 2001
- Mikkonen, M., Soininen, H., Tapiola, T., Alafuzoff, I., Miettinen, R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1754-1764, 1999
- Moolenaar C, Muller EJ, Schol DJ, Figdor CG, Bock E, Bitter Suermann D et al. Expression of neural cell adhesion molecule related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. *Cancer Res*; 50:1102-6, 1990
- Moore S, Walsh F. Specific regulation of NCAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J.*; 4:623-30, 1985.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature.* 28;380(6572):360-4, 1996.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 18: 1135-1149, 2000.
- Newham P, Humphries MJ. Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today Review.*; 2(7):304-13, 1996.
- Ng HK, Lam PY. The molecular genetics of central nervous system tumors. *Pathology*, 30:196-202, 1998
- Ni Dhuill, C.M., Fox, G.B., Pittock, S.J., O'Connell, A.W., Murphy, K.J. and Regan, C.M. Polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the dentate gyrus of the human hippocampal formation from infancy to old age. *J. Neurosci. Res.* 55, 99-106, 1999

- Nicolson GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochem Biophys Acta* 948: 175-224, 1998.
- Nordenson, I., Adolfson, R., Beckman, G., Bucht, G., Winblad, G. Chromosomal abnormality in senile dementia of Alzheimer type: evidence of suppressor cell activity. *Lancet* 1, 481-482., 1980
- Nybroe O, Linnemann D, Bock E. Heterogeneity of soluble cell adhesion molecules. *J. Neurochem*; 53:1372-8, 1989
- Ong F, Kaiser U, Seelen PJ, Hermans J, Wijermans PW, de Kieviet W, Jaques G, Kluin-Nelemans JC. Serum neural cell adhesion molecule differentiates multiple myeloma from paraproteinemias due to other causes. *Blood*. 15;87(2):712-6, 1996.
- Ossowski L. and Aguirre-Ghiso J.A., Urokinase receptor and integrin patnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 2000.
- Paget S. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573, 1889.
- Pilkington GJ, Bjerkgvig R, De Ridder L, Kaaijk P. In vitro and in vivo models for the study of brain tumor invasion. *Anticancer Res*, 17:4107-4110, 1997.
- Pilkington GJ. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Brazilian J Med Biol Research* 29:1159-1172, 1996.
- Poltorak, M., Khoja, I., Hemperley, J.J., Williams, J.R., El-Mallakh, R., Freed, W.J. Disturbances in cell recognition molecules (NCAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 131: 266-272, 1995.
- Porter-Jordan K and Lippman ME. Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematology/Oncology clinics of North America*, 8:73-100, 1994.
- Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 32: 175-253, 1997.
- Ranheim, T.S., Edelman G.M. and Cunningham, B.A. Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4071-4075, 1996.

- Ranuncolo SM, et al. CD44 Expression in human gliomas. *J. Surgical Oncology* 79 (1):30-35, 2002.
- Reisberg, B., Ferris, S.H., De León, M.J., Crook, T. The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am. J. Psych.* 139: 1136-1139, 1982.
- Rempel SA. Molecular biology of central nervous system tumors. *Current Opinion in Oncology*, 10:179-185, 1998
- Retzler C, Gohring W, Rauch U. Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Biol Chem.* 1;271(44):27304-10, 1996.
- Ricard, C.S., Kobayashi, S., Pena, J.D.O., Salvador-Silva, M., Agapova, O., Hernandez, R. Selective expression of neural cell adhesion molecule (NCAM)-180 in optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure in vitro. *Molecular Brain Research* 81, 62-79, 2000.
- Roche P H, Figarella-Branger D, Daniel L, Bianco N et al. Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumors. *J Neurol Sci*, 151:127-133, 1997.
- Roche, P.H., Figarella-Branger, D., Daniel, L., Bianco, N., Pellet, W., Pellissier, J.F. Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumor. *J. Neurol. Sci.* 151:127-133, 1997
- Rønn, L.C.B, Berezin, V, Bock, E.). The neural cell adhesion Molecule in synaptic plasticity and aging. *Int. Devl. Neuroscience* 18, 193-199, 2000.
- Roopral HK, McCormic D. Proteases and their inhibitors in human brain tumors: a review. *Anticancer Res*, 17:4151-4162, 1997.
- Rose S. P. R. Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends in Neurosci.* 18: 502-506, 1995.
- Roth J, Taatjes DJ, Bitter-Suermann D, Finne J. Polysialic acid units are spatially and temporally expressed in developing post-natal rat kidney, *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1969-73, 1987.
- Roth J, Zuber C, Wagner P, Taatjes DJ, Weisgerber C, Heitz PU et al. Reexpression of polysialic acid units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:2999-3003, 1988.



- Rusakov, D.A., Davies, H.A., Stewart, M.G. and Shachner, M. Clustering and co-localization of immunogold double labelled neural cell adhesion molecule isoforms in chick forebrain. *Neurosci.Lett.* 183: 50-53, 1995.
- Rusciano D, and burger M. Mechanisms of metastasis. *Molecular Genetics of Nervous System Tumors*, 357-369, 1993.
- Rustin, GJS 1<sup>a</sup>. Bence Jones H. *Philosophical transaction of the Royal Society of London.* 138: 55-62, 1848
- Rustin, GJS 2<sup>a</sup>. Ascheim, S. Early diagnosis of pregnancy, chorionepithelioma and hudatidiform mole by the Aschim –Zondek test. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 19: 335, 1930.
- Rustin, GJS. *Circulating tumor markers in Oxford textbook of Oncology* (Edited by Robert L. Souhami, Ian Tannock, Peter Hohenberger and Jean-Claude Horiot, published in the United States by Oxford University Press Inc, New York). Second edition. Volume I- Chapter 3.4- 303-314, 2002.
- Rutishauer U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman G. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA;* 73:577-581, 1976.
- Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer.* 15;82(10):1921-31, 1998.
- Sacerdote de Lustig, E., Kohan, S., Famulari, A.L., Dominguez, R.O. and Serra, J.A. Periferal markers and diagnostic criteria in Alzheimer's Disease: critical evaluations. *Rev. in the Neuroscience* 5: 213-225, 1994
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., et al. Genetic linkage evidence for familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258: 68-70, 1992.
- Schirrmacher V, *Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies.* *Adv Cancer Research* 43: 1-73, 1985.
- Scholey, A.B., Rose, S.P.R., Zamani, M.R, Bock, E., Schachner, M. A role for the neural cell adhesion molecule(NCAM) in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis 6h following passive avoidance training of the young chick.. *Neuroscience* 55: 499-509, 1993

- Schuster, T., Krug, M., Hassan, H., Schachner, M. Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J. Neurobiol.* 37:359-372, 1998
- Schuster, T., Krug, M., Stalder, M., Hackel, N., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M. Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta 1 integrin and the extracellular matrix molecule Tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J. Neurobiol.* 49: 142-158, 2001.
- Sehgal A. Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin Srg Oncol*, 14:3-12, 1998
- Seki, T. and Arai, Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.* 17: 265-290, 1993.
- Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA. Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18:92(15):6793-7, 1995.
- Solomonias, S.O., McCabe, R.O., Horn, G. Neural cell adhesion molecules, learning and memory in the domestic chick. *Behav. Neurosci.* 112:646-655, 1998.
- Stetler-Stevenson WC, Aznavoorian S et al. *Rev Cell Biol* 9: 541-573, 1993.
- Stiles CD. Cancer of the central nervous system. Review of an AACR special conference in cancer research with the joint section on tumors of the AANS/CNS. *BBA*, 1377:R1-R10, 1998.
- Sy MS, Mori H, Liu D. CD44 as a marker in human cancers. *Curr Opin Oncol. Review* ;9(1):108-12., 1997.
- Takamatsu K, Aurerbach B, Gerardy-Schahn R, Eckhardt M, Jaques G, Madry N. Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res.*, 54(10):2598-603, 1994.
- Tews DS, Nissen A. Expression of adhesion factors and degrading proteins in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *Invasion Metastasis*;18(5-6):271-84, 1998-99.

- Thomaidou, D., Coquillat, D., Meintanis, S., Noda, M., Rougon, G. and Matsas, R. Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promotes Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases  $\delta/\beta$  as the putative F3 receptors on Schwann cells. *Journal of Neurochemistry* 78, :767-778, 2001
- Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez D. Tumor invasion, proteolysis and angiogenesis. *J Neuro-Oncology* 18:89-103, 1994.
- Todaro Laura B., Ladeda Virginia, Bal de Kier Joffé Elisa, and. Farias Eduardo F "The combined treatment with Verapamil, a calcium channel blocker, and B428, a synthetic uPA inhibitor, impairs the metastatic ability of a murine mammary carcinoma". *Oncology Reports* 10: 335-340, 2003.
- Todd SR. Effects of high hydrostatic pressure on transformation in *Naegleria gruberi*. *Symp Soc Exp Biol.*; 26:485-6, 1972.
- Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Young VW. Mechanisms of glioma invasion: role of matrix-metalloproteinases. *Can J Neurol Sci* 24: 3-15, 1997.
- Urtreger A. M. Diament, S Ranuncolo, S. Klein, M. Vidal, L. Puricelli, and E. Bal de Kier Joffé - "A New Murine Cell Line Derived From A Spontaneous Lung Tumor Induces Paraneoplastic Syndromes".. *International Journal of Oncology* 18(3):639-647, 2001.
- Van Hal NL, Van Dongen GA, Ten Brink CB, Heider KH, Rech-Weichselbraun I, Snow GB, Brakenhoff RH. Evaluation of soluble CD44v6 as a potential serum marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* ;5(11):3534-41, 1999.
- Varela MS, Ciralo C, Knezevich et al. Evolución de 157 pacientes con gliomas de diferente grado de malignidad sometidos a tratamiento multidisciplinario. *Oncología Clínica* 3: 84-90, 1998.b)
- Varela MS, Ciralo C, Knezevich F. Radioterapia estereotáxica en el tratamiento de los gliomas de alto grado. *Oncología Clínica* 2: 22, 1998 a)
- Varela MS, Ranuncolo SM, Lastiri J et al. Biología molecular de los gliomas. *Oncología Clínica* 7:782-786, 2002.
- Wei, X., Zhang Y., Zhou, J. Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 268:139-142. 1999

## Bibliografia

---

- Werb Z, Yan Y. A cellular striptease act. *Science* 282: 1279-1280, 1998.
- Whitehouse PJ. Genesis of Alzheimer's disease. *Neurology Review*, 48(5 Suppl 7):S2-7. 1997.
- Yew, D.T., Li, W.P., Webb, S.E., Lai, H.W., Zhang, L. Neurotransmitters, peptides nad neural cell adhesion molecules in thje cortices of normal elderly humans and Alzheimer patients: a comparison. *Exp. Gerontol.* 34:117-133, 1999.

## Abreviaturas

## Abreviaturas

---

### Abreviaturas más utilizadas:

AH	ácido hialurónico
Apo E	apolipoproteína E
CAMs	moléculas de adhesión celular
CDKs	quinasas dependientes de ciclina
DTA	Demencia Tipo Alzheimer
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
GBM	glioblastoma multiforme
GFs	factores de crecimiento
GPI	glicosilfosfatidilinositol
ICAM	molécula de adhesión intercelular
Ig	inmunoglobulina
IHQ	inmunohistoquímica
LMC	leucemia mieloide crónica
Md	mediana
ME	matriz extracelular
MMPs	metaloproteasas
MTS	metástasis
MW	Mann Whitney test
NCAM	molécula de adhesión neural
PDGF	GF derivado de plaquetas
PSA	Ácido Siálico
Rb	Retinoblastoma
SCLC	cáncer de pulmón a células pequeñas
SNC	sistema nervioso central
UA	Unidades arbitrarias
uPA	activador de plasminógeno tipo uroquinasa
VCAM	molécula de adhesión vascular
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VP-	valor predictivo negativo
VP+	valor predictivo positivo
WB	Western Blot

## Agradecimientos

## Agradecimientos

---

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron a mi lado en esta etapa de mi carrera.

En primer lugar al Instituto de Oncología Angel H. Roffo en sus autoridades y personal, por haberme brindado su atención y lugar de trabajo para la realización de esta tesis. Así como el aporte económico, en forma de Beca otorgado por CONICET y la Fundación Antorchas para la realización de este trabajo.

A quienes estuvieron directamente vinculados a este trabajo: a los Dres. Mirta Varela, Guadalupe Pallota, Emilia López y Hernán Gioseffi del servicio de Oncología Clínica del Hospital Italiano de Buenos Aires, a la Dra Liliana Adam del Servicio de Hemoterapia del Instituto Roffo, a la Dra. Rosa Rottemberg por colaborar en la recolección de muestras de suero y a la Dra Mónica Kotler de la FCEyN de la UBA quien realizó el cultivo de astrocitos de rata.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, por quien siento un profundo cariño y mucho más que admiración. Desde un primer momento la doctora me brindó un lugar en su grupo de trabajo así como tiempo y dedicación, aportando ideas originales y escuchando todos y cada uno de mis resultados, siempre con entusiasmo.

Quiero agradecer a las Dras. Lydia Puricelli y Elisa Bal de Kier Joffé por haber contribuido en mi formación transmitiéndome sus conocimientos, experiencias y guiándome en cada punto de mi tesis. En especial por que más allá de lo profesional supieron aconsejarme y contenerme como a una hija en los momentos más difíciles con muchísimo cariño.

A mi consejera de estudios, la Dra Lilia Lauría porque además de sus valiosas observaciones sobre mi trabajo es un ser maravilloso y de una gran calidez humana.

A la Dra. Elena Matos, por su valiosas observaciones sobre algunos de los resultados de este trabajo y porque además me brindó cálidas conversaciones y consejos.

A mis primeros amigos del Roffo: de quienes aprendí muchísimo profesionalmente, son excelentes personas y guardo los mejores recuerdos: los Dres. Eduardo Farías y Julio Aguirre.

A los doctores María Adela Jasniz, Lilia Davel, Silvia Kohan, María Elena Sales, Ana María Eiján, Slodobanka Klein, Miriam Diamant, Eduardo Sandes, Gabriel Fishman, Dora Loria. Al Dr. Lucas Colombo, quien colaboró en la inoculación de animales para este trabajo y a Ernesto Dorio quien realizó la obtención de IgG pre inmune utilizada en todos los ensayos y varios de mis



## Agradecimientos

---

geles. También agradezco el valioso trabajo de Alicia, Leo, Antonia, Cata y Mirta.

En forma especial como “amigas del Roffo” por su comprensión y cariño a Marta, María José y a Gloria (quien también participó en este trabajo realizando la extracción de gran parte de las muestras de suero).

A las chicas de becariato por ser excelentes compañeras: Giselle, Valeria, Laura, Cecilia y Stella. A los chicos: Nicolás, Esteban (aunque lejos) y Martín quien con mucha paciencia y en forma desinteresada siempre está dispuesto a ayudar. Especialmente a Alejandro Urtreger por “cosmetizar” todas mis figuras y presentaciones (siempre a pesar de...él mismo) y quien también ha colaborado en parte de este trabajo. A mi amigo Alejandro Adam por sus consejos y por compartir el entusiasmo de “arreglar al mundo” junto a un rico café (como debe ser).

Al Profesor Jorge Baldoni por su constante apoyo e interés en mi carrera.

A mis amigos: María Laura, Guille, Andrea, Alejandro, Sergio, Paula, Ramiro y Karin, por estar siempre!!

A mis padres por su gran apoyo y por malcriar a Ariel.

A Mary y Enrique, otros “malcriadores” .

Y especialmente a Ariel y a Alexis por su gran paciencia y tanto Amor.

A todos muchas gracias