

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**PAPEL DEL GLIPICANO-3 EN LA TRANSFORMACIÓN  
MALIGNA Y EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DE LA  
GLÁNDULA MAMARIA**

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

**María Giselle Peters**

**Directores de tesis: Dra. Elisa Bal de Kier Joffé  
Dr. Eduardo Charreau**

**Lugar de trabajo: Departamento de Biología Celular  
Área Investigación  
Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”**

**Buenos Aires, 2005**

# PAPEL DEL GLIPICANO-3 EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA Y EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA

## RESUMEN

Aunque algunos estudios han involucrado a GPC3 en el control de la proliferación y la apoptosis de células tumorales, no existe información acerca de su participación en otros aspectos del fenotipo maligno. Como la pérdida de la expresión de GPC3 parece ser un evento clave en el desarrollo de los tumores de mama, en este trabajo de tesis se planteó como hipótesis que la reexpresión de GPC3 en las células tumorales mamarias murinas LM3 induciría cambios tendientes a un fenotipo menos agresivo. Se concluyó que GPC3 estaría actuando como un **supresor de metástasis** en el modelo presentado, ya que fue capaz de disminuir la invasión y la metástasis de las células LM3, sin modificar la tasa de crecimiento tumoral. Mediante estudios *in vitro* se determinó que esta inhibición podría ser ejercida a través de la modulación del crecimiento clonogénico, de las propiedades de adhesión, migración y spreading, o a cambios en la organización del citoesqueleto de actina, y en la susceptibilidad a la muerte celular inducida por condiciones de estrés.

En la segunda parte del trabajo se evaluó la utilidad de GPC3, y de las moléculas reguladoras del ciclo celular: ciclinas D1, E y B1 y CDKIs p16 y p21, como marcadores de pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Se concluyó que, a pesar de haberse encontrado alteraciones en la expresión de las proteínas analizadas, ninguna de ellas parece ser capaz de predecir la supervivencia de pacientes con cáncer de mama de bajo estadio.

**Palabras claves:** Glipicano-3, gen supresor de metástasis, progresión tumoral, ciclinas, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, marcador tumoral.

# ROLE OF THE GLYPICAN-3 IN THE MALIGNANT TRANSFORMATION AND IN THE TUMORAL PROGRESSION OF THE MAMMARY GLAND

## SUMMARY

Although some studies have involved GPC3 in the control of proliferation and apoptosis of tumor cells, there is no information about its participation in other aspects of the malignant phenotype. Since the loss of GPC3 expression seems to be a key event in the development of mammary tumors, this thesis has as hypothesis that the reexpression of GPC3 in the murine mammary tumor cells LM3 would induce changes to a less aggressive phenotype. It was concluded that GPC3 would be acting as a **metastasis suppressor** in the presented model, since it was capable to reduce invasiveness and metastazing capacities of LM3 cells, without modifying its rate of tumoral growth. By means of *in vitro* studies it was determined that this inhibition could be exercised through the modulation of the properties of growth at low density, adhesion, migration, spreading, organization of the actin cytoskeleton and susceptibility to cellular death induced by stress conditions.

In the second part of this work the utility of GPC3, as well as that cell cycle regulating molecules: cyclins D1, E and B1 and CDKIs p26 and p21, were evaluated as prognostic markers in breast cancer patients. It was concluded that, in spite of having found alterations in the expression of the analyzed proteins, none of them seems to be able to predict the survival of patients with low stage breast cancer.

**Key words:** Glypican-3, suppressor metastasis, tumor progression, cyclins, cyclin-dependent kinases inhibitors (CDKIs), tumoral marker.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Durante todos estos años ella me ha enseñado mucho más que ciencia. Además de su implacable espíritu científico, con ese entusiasmo siempre presente por conocer y aprender cosas nuevas, posee la invaluable cualidad de priorizar las relaciones humanas y el cuidado del becario. Gracias por haberme apoyado durante mi embarazo, enseñándome que se puede ser investigadora y madre al mismo tiempo.

Muchas gracias a la Dra. Lydia Puricelli, quien si bien no figura como directora de este trabajo de tesis (porque ya tenía dos directores!) formó una parte importantísima de él. Ella me acompañó durante mis primeros pasos en el Área de Investigación del Hospital, enseñándome técnicas de cultivo celular y también muchas otras. Siempre, desde una posición sumamente afectiva, supo contribuir a lo largo de estos años en mi desarrollo profesional y personal. Gracias Lydia por poner siempre tu cuota de cariño (en mí y en mis chicas).

Un gracias muy especial al Dr. Eduardo Charreau, con quien me inicié en el camino de la ciencia. Él me recibió en su laboratorio, hace ya 8 años, cuando recién llegué de Mar del Plata. Además de haber tenido la oportunidad de aprender junto a un “grande”, tuve la suerte de recibir su apoyo durante todo este tiempo. Gracias Jefe por el afecto y la confianza en mí depositados.

Es imposible no mencionar a la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, quien es un ejemplo para todos los que tenemos el honor de conocerla. Con ella aprendí lo que significa la frase “la humildad de los grandes”. Una única palabra basta para definirla: sabia.

Muchas gracias al Dr. Jorge Filmus y a su becaria post-doctoral Dra. Mariana Capurro por haber contribuido de manera desinteresada, a veces con ideas y otras con reactivos, al desarrollo de este trabajo de tesis.

Gracias al Dr. Eduardo Farías por iniciar el proyecto del glipicano y a la Dra. María del Carmen Vidal por haber formado parte activa de la segunda parte de este trabajo de tesis. Muchas gracias al Dr. Lucas Colombo, por haber colaborado en la parte experimental *in vivo*.

Gracias al Dr. Eduardo Armanasco y a la gente del Servicio de Patología Mamaria, por brindarme las biopsias con las que realicé la segunda parte de este trabajo. Si bien las visitas al quirófano no me resultaban muy gratas, si lo fue el poder conocer a una persona amable y siempre dispuesta como lo es el Dr. Armanasco.

Obviamente, dedico un GRACIAS con mayúscula a mis compañeros de “becariato”, a los de antes y a los de ahora. Estoy convencida que de cada uno de ellos pude aprender algo, y no sólo hablo de ciencia. Gracias a Stella Maris Ranuncolo, Marina Simian, Alejandro Urtreger, Alejandro Adam, Martín Krasnapolski, María José Velloso, Laura Mauro, Laura Todaro, Valeria Grossoni, Carina Falbo, Cecilia Daroqui, Bibiana Iglesias, Paula Vazquez, Osvaldo Pontiggia. Gracias especiales a Valeria, por ser mi amiga y haber estado en el momento justo.

Un gracias generalizado, pero no por eso menos importante, a toda la gente del Área de Investigación. Creo que todos de alguna u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis, pero también en mi desarrollo personal. Gracias a la Dra. María Adela Jasnís, Dra. Dora Loria, Dra. Marta Vilensky, Dra. María Elena Sales, Dra. Ana María Eijan y sus chicas, Dra. Lilia Lauría, Dr. Eduardo Sandes, Dr. Gabriel Fiszman, Dra. Silvia Cohan, Dra. Gabriela Magenta, Lic. Nicolás Zengarini. Agradezco a la gente de Bioterio, donde realicé mis experiencias *in vivo*. Gracias a la Dra. Slobodanka Klein, Dra. Miriam Diamente, Dra. Liliana Vauthay y especialmente al Lic. Guillermo Peluffo por los buenos ratos.

Gracias a la gente de la Unidad de Transferencia Génica, especialmente al Dr. Armando Karara que siempre estuvo dispuesto a ayudarme ante cada mangazo. Gracias también a las técnicas: Alicia Rivelli, Gloria Solarz, Catalina Sasko y Gabriela Sobrido; al personal de limpieza: Leonardo Tello y Antonia Gómez; y a

Mirta Carnero, la secretaria. Gracias a la Lic. Fernanda Roca, por el tiempo que dedicó en ayudarme con unos preparados congelados que, aunque fracasó el experimento, me sirvió como aprendizaje además de diversión.

Mi vida científica la inicié en el IBYME, donde recibí la ayuda y la amistad de muchas personas. Quiero mencionar especialmente a mi amiga la Dra. Mariana Salatino que, como me dijiste el otro día, ya hace 8 años que nos conocemos!. Un agradecimiento especial a las personas de este Instituto que siguen formando parte de mi vida: Ana Rosa Charreau, Dra. Leticia Labriola, Dra. Mercedes Goin, Lic. Cecilia Proietti, Lic. Romina Carnevale, Bioq. Violeta Chauzzi. Un gracias súper especial al Dr. Juan Carlos Calvo, que con su tranquilidad y hombría de bien pudo ayudarme y aconsejarme cuando más lo necesitaba.

Gracias CONICET por otorgarme la beca con la que pude “financiarme” mientras realizaba este trabajo de tesis. Gracias a la Fundación Aragón y a FOSDIC, porque también me brindaron su apoyo durante la primera etapa.

Gracias a la Fundación AVON y a la American Association for Cancer Research (AACR) por brindarme en dos oportunidades consecutivas una beca de viaje, con la que pude asistir a las reuniones anuales de esa Asociación y presentar así parte de los resultados de este trabajo de tesis.

Agradezco a los docentes de la Universidad Nacional de Mar del Plata, donde obtuve mi título de grado. Gracias por sentar las bases de mi formación.

Un gracias súper especial a mis amigas de toda la vida, que aunque no tienen ni idea de que se trata todo esto, siempre me apoyan: María Fernanda García, Daniela Molé, Florencia González Orozco, Carina Iturria, María Elena Fernández, Fanny Grappasonno y Giselle Martínez Noel.

Gracias al grupo “FyB”, por adoptarme como un integrante más: Esteban Rosique, José María Polo, Rocío Guasco Anselmi, Marina Caligiuri, Mariano Dalvarade, Paola Chabay, María Eugenia Guerrero, Ana García Rubio, Agustina

Moglia Claps, José Luis Carbajales, Santiago Isolabella, Vroni Riehn. Y también a las posteriores incorporaciones al grupo: Sebastián Torres, Federico Aragón, Sergio Kulesnik, Ana y Claudia Rodríguez (por los partidos de Burako). Gracias Esteban, por estar siempre y querer mucho a mis hijas. Gracias Paola por acordarte constantemente de nosotros (Mili agradece las “faturas” de la tarde).

Gracias Pepe por haberme transferido el cariño y la amistad que tenés con Martín. Gracias por preocuparte por nosotros, ayudarnos y tenernos siempre presentes. El gracias más actual te lo debo por haber aceptado a Valentina como tu ahijada. Gracias también a Loles, por querer a mi compadre y cuidarlo todos los días.

Gracias a los parisinos Elena Avale y Juan Ferrario, que desde la distancia siguen el avance de este trabajo de tesis. Te agradezco Juan por los esfuerzos invertidos en las hibridaciones in situ, que como verás no están incluidas en el manuscrito porque nunca salieron!! Igual fue muy divertido trabajar en tu laboratorio.

Gracias a Mauricia Mendoza, por cuidar a mis hijas y tratarlas con amor. Tu paciencia y dedicación ganaron mi confianza, y puedo irme a trabajar tranquila sabiendo que mis chicas están en buenas manos.

Gracias a mis suegros, Patricia Rossi y Luis María Orcoyen, que más que suegros se transformaron en mis segundos padres. Agradezco el apoyo que nos dieron desde un principio para que Martín y yo pudiéramos formar la hermosa familia que hoy somos. Gracias por ser tan buenos abuelos, eso para mi es lo más importante. Gracias a mis cuñados Mariana Orcoyen y Gabriel Salvatierra, Luis Fernando Orcoyen y Soledad Andrés, y a mi sobrino Tobías Orcoyen que nos alegra los días.

Agradezco a mi tía Cecilia González porque desde que nací forma una parte fundamental en mi vida. Gracias por todas las cosas que compartiste conmigo...y gracias porque ahora también lo hacés con mis hijas. A pesar de la distancia te tengo siempre presente.

Un gracias enorme a mi papá Juan Carlos Peters... porque me dio la vida. Además de eso, siempre creyó en mi y se sintió orgulloso de cada uno de mis logros. Gracias por querer tanto a mis hijas y aceptar, aunque sea a regañadientes, ser el abuelo Chu-Chú!

Qué puedo decir de mi mamá, Mabel López. Creo que básicamente le debo lo que hoy soy. Gracias porque fuiste una parte fundamental de mi formación académica. Primero, estudiando juntas la lección de ciencias naturales, practicando cuentas, repasando dictado... Después acompañándome en el secundario, y también en la universidad. Y hoy, estando orgullosa y feliz por cada uno de mis logros, pero principalmente siendo la abuelita más amorosa del mundo. Gracias mami!

Gracias a mi hermana María Solange Peters, porque a pesar de lo tirones de pelo de cuando éramos chicas, te quiero mucho y valoro que estés con nosotros. Gracias, en nombre de mis hijas, por la buena tía que sos (aunque te pido que aflojes con los regalos porque me vas a llenar la casa!).

Y bueno, el agradecimiento más importante quedó para el final. Es para mi marido Martín Orcoyen y mis hijas Milagros y Valentina. Martín, vos sabés lo importante que sos en este trabajo de tesis, pero fundamentalmente en mi vida. Me emociona mucho cuando veo que te sentís orgulloso de mis alcances, porque yo estoy orgullosa de vos todo el tiempo: como profesional, como padre, como marido, como PERSONA. Gracias por haberme elegido para compartir tu vida.

Gracias a Mili y a Valen porque son la razón de mi vida. Esta tesis también la hicieron ellas, primero desde la panza, y después aceptando que mamá se vaya a trabajar todos los días. Perdón chicas por el tiempo que les robo, y gracias por ser mis hijas.



***A Martín, Milagros y Valentina***  
*Mis tres grandes amores*

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AH: ácido hialurónico.

ANOVA: análisis de la varianza estadística.

ARN/ARNm: ácido ribonucleico/mensajero.

BWS: síndrome de Beckwith Wiedemann.

CAM: molécula de adhesión celular.

CDK: quinasas dependientes de ciclinas.

CDKI: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.

DO: densidad óptica.

ECL: *enhanced chemiluminescence reagent*.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

GF: factor de crecimiento.

GPC3: glipicano-3.

GPI: glicosilfosfatidilinositol.

HRP: *horseradish peroxidase*.

HS: heparán sulfato.

HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato unidos a la membrana celular.

IG: inmunoglobulina.

ICQ: inmunocitoquímica.

IF: inmunofluorescencia.

IGF: factor de crecimiento tipo insulínico.

IHQ: inmunohistoquímica.

i.v.: intravenoso.

kDa: kilodalton.

LC: lisado celular.

MB: membrana basal.

MC: medio condicionado.

MD: mediana.

ME: matriz extracelular.

MMP: metaloproteasa.  
MTs: metástasis.  
MW: Mann Whitney test.  
RB: retinoblastoma.  
RE: receptor de estrógeno.  
RT-PCR: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*.  
s.c.: subcutáneo.  
SFB: suero fetal bovino.  
SGBS: síndrome Simpson-Golabi-Behmel.  
SLE: supervivencia libre de enfermedad.  
TEM: transición epitelio-mesenquimática.  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante tipo beta.  
TIMP: inhibidor de metaloproteasas.  
tPA: activador del plasminógeno tipo tisular.  
TRITC/FITC: isotiocianato de tetrametilrhodamina.  
UA: unidades arbitrarias.  
UI: unidades internacionales.  
uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa.  
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.  
VP -: valor predictivo negativo.  
VP +: valor predictivo positivo.  
WB: western blot.

## INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	1
I. CÁNCER DE MAMA.....	2
Aspectos generales .....	2
Histogénesis .....	2
1. Desarrollo normal de la glándula mamaria .....	2
2. Desarrollo neoplásico de la glándula mamaria.....	4
Clasificación histopatológica .....	5
1. No invasor (no infiltrante) .....	6
2. Invasor (infiltrante).....	7
Etiología y epidemiología del cáncer de mama.....	8
1. Factores Hormonales .....	8
2. Factores genéticos .....	10
3. Factores ambientales .....	11
II. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.....	12
Aspectos generales .....	12
Mecanismos de la progresión tumoral.....	12
1. La cascada metastásica .....	13
2. Invasión tumoral .....	16
3. Angiogénesis.....	17
Matriz extracelular (ME) .....	18
Moléculas de adhesión.....	20
1. Cadherinas .....	21
2. Selectinas.....	24
3. Integrinas.....	24
4. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig-CAM) .....	25
Producción de enzimas proteolíticas.....	25
III. CRECIMIENTO TUMORAL.....	30
Aspectos generales .....	30
Control de la proliferación: Ciclo Celular .....	31
1. Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) .....	32
2. Ciclinas.....	32
3. Regulación de los complejos ciclina-CDK .....	35
4. Proteínas reguladoras del ciclo celular y su relación con cáncer .....	37
Muerte celular .....	40
1. Necrosis .....	40
2. Apoptosis.....	41
IV- PAPEL DE LOS PROTEOGLICANOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL .....	51

Aspectos generales .....	51
Proteoglicanos de Heparán sulfato unidos a la membrana celular (HSPGs) .....	52
1. La familia de los glipicanos.....	52
2. Los glipicanos en Drosophila.....	54
3. Glipicano 3 (GPC3) y el síndrome Simpson-Golabi-Behmel .....	55
4. Glipicanos y cáncer .....	58
V- MARCADORES TUMORALES.....	61
Aspectos generales .....	61
Clasificación.....	62
1. De acuerdo con sus propiedades .....	62
2. Según cuál sea el problema a resolver .....	65
Nuevas tecnologías para el estudio de marcadores tumorales .....	66
1. Microarrays.....	66
2. Análisis serial de la expresión génica (SAGE) .....	67
3. Identificación de un perfil proteico (proteómica).....	67
4. Tissue arrays.....	67
Propiedades de los marcadores.....	68
1. Especificidad .....	68
2. Sensibilidad .....	68
3. Valor predictivo positivo (VP+) .....	68
4. Valor predictivo negativo (VP-).....	69
Marcadores tumorales tisulares y circulantes en cáncer de mama .....	70
1. Marcadores tisulares .....	70
2. Marcadores circulantes .....	70
OBJETIVOS .....	72
I. OBJETIVO GENERAL .....	73
II. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	73
MATERIALES Y METODOS.....	76
PARTE I: PAPEL DE GPC3 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. ESTUDIOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3 .....	77
Línea celular .....	77
Análisis de la expresión de GPC3 en la línea LM3 mediante Northern blot .....	79
Transfección de la línea celular LM3 con el gen de GPC3 .....	79
Selección de los clones que expresan GPC3 mediante WB .....	80
Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento in vivo de las células LM3.....	81
a. Animales.....	81
b. Tumorigenicidad, invasión y metástasis.....	81
Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento in vitro de las células LM3 ....	82
a- Propiedades de crecimiento.....	82

Proliferación celular .....	82
Eficiencia de plaqueo.....	83
Colonias en agar .....	83
b- Susceptibilidad a la muerte celular.....	83
Respuesta a agentes citotóxicos .....	83
Muerte celular inducida por privación de nutrientes.....	84
c y d- Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular. Análisis mediante WB, IF e ICQ.....	84
e- Propiedades de adhesión y expresión de moléculas relevantes en la adhesión celular .....	86
Adhesión a Fibronectina (FN).....	86
Adhesión homotípica .....	87
Expresión de moléculas de adhesión .....	87
f- Ensayo de spreading celular .....	88
g- Ensayo de migración celular .....	88
h- Organización del citoesqueleto .....	88
i- Ensayos de invasión .....	89
Ensayo de invasión en cámaras Transwell.....	89
Ensayo de invasión en geles de colágeno.....	90
j- Secreción de proteasas y su modulación por factores de crecimiento.....	90
Preparación de Medios Condicionados (MC) .....	90
Detección de la actividad de MMPs.....	91
Cuantificación de la actividad de uPA .....	91
k- Análisis estadísticos .....	92
<b>PARTE II: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GPC3 Y DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. UTILIDAD COMO MARCADORES TUMORALES.....</b>	<b>93</b>
Pacientes .....	93
Criterios para la inclusión de pacientes.....	95
Revisión de Historias Clínicas .....	96
A- Estudio de la expresión de GPC3 mediante IHQ .....	96
B- Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular.....	98
IHQ.....	98
WB .....	99
Análisis estadístico de los resultados.....	99
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>101</b>
<b>PARTE I: PAPEL DE GPC3 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL ESTUDIOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3 .....</b>	<b>102</b>
Expresión de GPC3 en la línea celular LM3 .....	102
Transfección de la línea celular LM3 con el gen de GPC3 .....	103
Obtención de las colonias que expresan GPC3.....	103
Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento in vivo de las células LM3...	104

a- Crecimiento tumoral subcutáneo.....	104
b- Capacidad invasiva y metastásica .....	105
Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento in vitro de las células LM3 ..	110
a- Propiedades de crecimiento.....	110
Morfología y proliferación celular.....	110
Eficiencia de plaqueo.....	110
Colonias en agar .....	111
b- Susceptibilidad a la muerte celular.....	113
Respuesta a agentes citotóxicos .....	113
Muerte celular inducida por privación de nutrientes.....	114
c- Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis.....	116
d- Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular .....	117
e- Propiedades de adhesión y expresión de moléculas de adhesión relevantes .....	120
Adhesión a Fibronectina .....	121
Adhesión homotípica .....	122
Expresión de moléculas de adhesión .....	124
f- Ensayo de spreading celular .....	126
g- Ensayo de migración celular .....	127
h- Organización del citoesqueleto .....	128
i- Ensayos de invasión .....	130
j- Secreción de proteasas y su modulación por factores de crecimiento .....	131
<b>PARTE II: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GPC3 Y DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA UTILIDAD COMO MARCADORES TUMORALES.....</b>	<b>135</b>
<b>A- Estudio de la expresión de GPC3.....</b>	<b>135</b>
Expresión de GPC3 por IHQ .....	135
Asociación entre la expresión de GPC3 y los parámetros clínico-patológicos .....	137
Relación entre la expresión de GPC3, HER-2 y Ki-67 .....	140
Evaluación de la expresión de GPC3 como factor de pronóstico en pacientes con cáncer de mama .....	140
<b>B- Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular.....</b>	<b>142</b>
Expresión de las ciclinas D1, E y B1 por IHQ.....	142
Asociación entre la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y los parámetros clínico-patológicos.....	144
Expresión de p21 y p16 por IHQ .....	147
Asociación entre la expresión de los CDKIs p16 y p21 y los parámetros clínico patológicos .....	149
Relación entre las ciclinas, los CDKIs, HER-2 y Ki-67 .....	151
Evaluación de la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y de los CDKIs p16 y p21 como factores de pronóstico en pacientes con cáncer de mama .....	152
Expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16 por WB. Asociación con los parámetros clínico-patológicos y el tiempo de SLE .....	154
<b>C- Relación entre la expresión de GPC3 y de proteínas reguladoras del ciclo celular, medida por IHQ .....</b>	<b>156</b>

DISCUSIÓN.....	158
PARTE I: PAPEL DE GPC3 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL ESTUDIOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3 .....	159
A. Invasión de los tejidos y metástasis.....	160
B. Alteración en las propiedades de proliferación: Autosuficiencia en señales de crecimiento e Insensibilidad a señales inhibitorias .....	169
C. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis) .....	173
CONCLUSION GENERAL PARTE I .....	176
PARTE II: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GPC3 Y DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA UTILIDAD COMO MARCADORES TUMORALES.....	177
A. Estudio de la expresión de GPC3 en pacientes con cáncer de mama. Utilidad como marcador tumoral.....	177
B. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en pacientes con cáncer de mama. Utilidad como marcador tumoral.....	182
C. Relación entre la expresión de GPC3 y proteínas reguladoras del ciclo celular.....	188
CONCLUSION GENERAL PARTE II .....	189
REFERENCIAS .....	190



## INDICE DE TABLAS

TABLA I. TUMORES DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	6
TABLA II. GENES SUPRESORES DE METÁSTASIS.....	15
TABLA III. COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA ME.....	19
TABLA IV. FAMILIA DE PROTEASAS PARTICIPANTES EN LA INVASIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS.....	26
TABLA V. NECROSIS VERSUS APOPTOSIS.....	44
TABLA VI. TIPOS DE GLIPICANOS Y SU PATRÓN DE EXPRESIÓN.....	53
TABLA VII. GENES SUPRESORES DE TUMOR Y TIPOS DE CÁNCER RELACIONADOS CON SU ALTERACIÓN..	62
TABLA VIII. ALGUNOS EJEMPLOS DE ANTÍGENOS ANALIZADOS MEDIANTE IHQ EN EL DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN TUMORAL.....	64
TABLA IX. RELACIÓN ENTRE EL RESULTADO DE UN TEST DIAGNÓSTICO Y LA PRESENCIA DE LA ENFERMEDAD EN EL PACIENTE.....	69
TABLA X. PARÁMETROS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAR A UN MARCADOR BIOLÓGICO.....	69
TABLA XI. COMPORTAMIENTO <i>IN VIVO</i> DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO M3 Y DE SU LÍNEA DERIVADA LM3.....	78
TABLA XII. CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS CON PATOLOGÍAS MAMARIAS.	93
TABLA XIII. DISTRIBUCIÓN DE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA SEGÚN EDADES Y CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL TUMOR.....	94
TABLA XIV. COLONIAS RESISTENTES A G418 OBTENIDAS LUEGO DE LA TRANSFECCIÓN DE LA LÍNEA LM3 .....	103
TABLA XV. COMPORTAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE LAS CÉLULAS LM3-GPC3 Y LM3-VECTOR.....	109
TABLA XVI. EXPRESIÓN DE GPC3 EN LAS PATOLOGÍAS MAMARIAS TUMORALES MALIGNAS Y BENIGNAS .....	137
TABLA XVII. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE GPC3.....	138
TABLA XVIII. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE GPC3 Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO- PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	139
TABLA XIX. EXPRESIÓN DE LAS CICLINAS D1, E Y B1 EN LAS PATOLOGÍAS BENIGNAS Y EN LOS TUMORES MAMARIOS MALIGNOS.....	144
TABLA XX. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LAS CICLINAS D1, E Y B1.....	145
TABLA XXI. FACTORES DE PRONÓSTICO Y EXPRESIÓN DE LAS CICLINAS D1 Y E. ESTUDIO MULTIVARIADO .....	147
TABLA XXII. EXPRESIÓN DE LOS CDKs P16 Y P21 EN LAS PATOLOGÍAS MALIGNAS Y BENIGNAS.....	149
TABLA XXIII. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LOS CDKs P21 Y P16.....	149
TABLA XXIV. FACTORES DE PRONÓSTICO Y EXPRESIÓN DE P21. ESTUDIO MULTIVARIADO.....	151
TABLA XXV. ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPC3 Y EL DE LAS CICLINAS D1, E Y B1 Y EL DE LOS CDKs P21 Y P16.....	156
TABLA XXVI. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPC3 Y EL DE LAS CICLINAS D1, E Y B1 Y EL DE LOS CDKs P21 Y P16.....	157

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTADÍOS DE DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA DEL RATÓN.....	3
FIGURA 2. ETAPAS DE LA CASCADA METASTÁSICA .....	14
FIGURA 3. PROCESO DE INVASIÓN TUMORAL .....	16
FIGURA 4. ESTRUCTURA DE LA ME.....	19
FIGURA 5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (CAMs).....	21
FIGURA 6. INTERACCIONES DE LA E-CADHERINA.....	23
FIGURA 7. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS INVOLUCRADAS EN LA CASCADA METASTÁSICA .....	27
FIGURA 8. COMPORTAMIENTO DE LAS POBLACIONES CELULARES .....	30
FIGURA 9. ETAPAS DEL CICLO CELULAR. COMPLEJOS DE CICLINAS Y QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS.....	31
FIGURA 10. INTERACCIONES MOLECULARES DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA FASE G1 .....	33
FIGURA 11. CONTROL DE LA PROGRESIÓN DE LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR.....	37
FIGURA 12. CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA NECRÓTICA.....	40
FIGURA 13. CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA APOPTÓTICA .....	43
FIGURA 14. FRAGMENTACIÓN DEL ADN POR NUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	45
FIGURA 15. ETAPAS DE LA APOPTOSIS .....	46
FIGURA 16. EL APOPTOSOMA, LA “RUEDA DE LA MUERTE” .....	49
FIGURA 17. PRINCIPALES TIPOS DE PROTEOGLICANOS.....	51
FIGURA 18. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LOS GLIPLICANOS .....	53
FIGURA 19. CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR M3 Y DE LA LÍNEA LM3 .....	78
FIGURA 20. ESTRUCTURA DE PEF-BOS .....	79
FIGURA 21. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GPC3 POR NORTHERN BLOT .....	102
FIGURA 22. EXPRESIÓN DE GPC3 EN LAS CÉLULAS LM3 TRANSFECTADAS CON PEF OCI5 Y PEF VECTOR.....	104
FIGURA 23. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE EL CRECIMIENTO <i>IN VIVO</i> DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3.....	105
FIGURA 24. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA DE LAS CÉLULAS LM3.....	106
FIGURA 25. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE LAS CÉLULAS LM3.....	108
FIGURA 26. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE EL CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS LM3.....	112
FIGURA 27. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS LM3 AL AGENTE CITOTÓXICO DOXORUBICINA .....	114
FIGURA 28. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE NUTRIENTES DE LAS CÉLULAS LM3 .....	115
FIGURA 29. EXPRESIÓN MOLÉCULAS REGULADORAS DE LA APOPTOSIS.....	117
FIGURA 30. EXPRESIÓN MOLÉCULAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR .....	120
FIGURA 31. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS LM3 DE ADHERIRSE A FN.....	121
FIGURA 32. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA ADHESIÓN HOMOTÍPICA DE LAS CÉLULAS LM3.....	123
FIGURA 33. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ESFEROIDES LM3 .....	123
FIGURA 34. EFECTO DE GPC3 SOBRE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LAS CÉLULAS LM3.....	125
FIGURA 35. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE EL <i>SPREADING</i> DE LAS CÉLULAS LM3.....	126

FIGURA 36. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS LM3.....	127
FIGURA 37. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA DE LAS CÉLULAS LM3 .....	129
FIGURA 38. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS LM3.....	130
FIGURA 39. EFECTO DE LA REEXPRESIÓN DE GPC3 SOBRE LA SECRECIÓN DE PROTEASAS DE LAS CÉLULAS LM3. REGULACIÓN POR DIFERENTES FACTORES DE CRECIMIENTO.....	134
FIGURA 40. EXPRESIÓN DE GPC3 EN TUMORES DE MAMA HUMANOS Y PATOLOGÍAS MAMARIAS BENIGNAS, MEDIDA POR IHQ .....	136
FIGURA 41. CURVA DE KAPLAN Y MEIER PARA EL ANÁLISIS DE SLE SEGÚN LA EXPRESIÓN DE GPC3 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	141
FIGURA 42. EXPRESIÓN DE LAS CICLINAS D1, E Y B1 POR IHQ .....	143
FIGURA 43. EXPRESIÓN DE LOS CDKIS P16 Y P21 POR IHQ.....	148
FIGURA 44. CURVA DE KAPLAN Y MEIER PARA EL ANÁLISIS DE LA SLE DE ACUERDO A LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE LA CICLINA E EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	152
FIGURA 45. CURVA DE KAPLAN Y MEIER PARA EL ANÁLISIS DE LA SLE DE ACUERDO A LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE LA CICLINA D1 EN PACIENTES CON TUMORES DE MAMA NEGATIVOS (A) Y POSITIVOS (B) PARA LA PRESENCIA DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS.....	154
FIGURA 46. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA CICLINA D1 Y DEL CDKI P16 POR WB .....	155

# **INTRODUCCIÓN**

## I. CÁNCER DE MAMA

### Aspectos generales

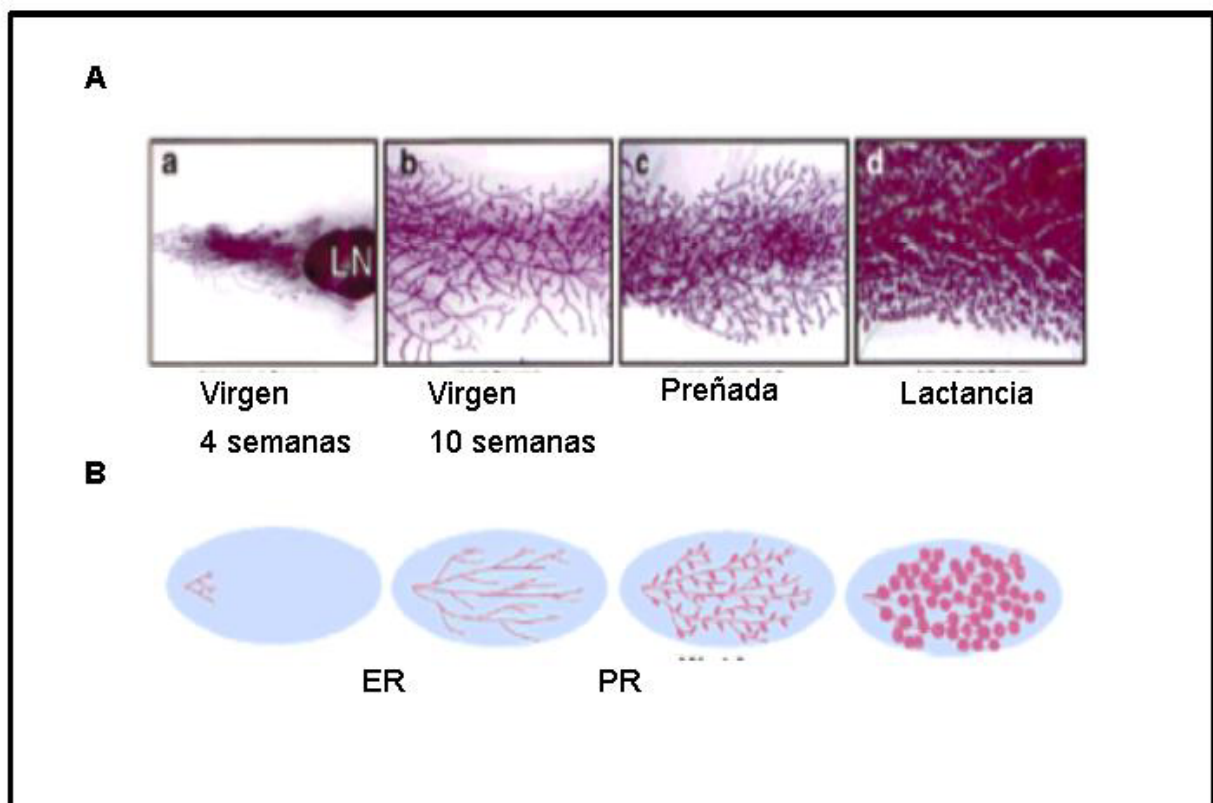
Dentro de la patología tumoral, el cáncer de mama es la neoplasia maligna con mayor incidencia en la población femenina y con la mayor tasa de mortalidad en los países occidentales. Las estadísticas demuestran que 1 de cada 8 mujeres puede, en algún momento de su vida, padecer dicha enfermedad [1]. En Argentina constituye la primer causa de muerte por cáncer dentro de la población femenina, mientras que en la población general ocupa el segundo lugar después del cáncer de pulmón. La tasa de mortalidad (expresada como el número de muertes por año cada 100000 habitantes) reportada para el período 1989-1992 fue 21,2 [2], mientras que para el período 1997-2001 fue de 20,4 [3]. Debido a esto ha sido y continúa siendo motivo de numerosos estudios que incluyen etiología, diagnóstico y tratamiento.

### Histogénesis

#### **1. Desarrollo normal de la glándula mamaria**

El desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria normal es mayormente post-natal. Estas transformaciones progresan a través de estadios definidos, comenzando en la pubertad y continuando durante la preñez. En el ratón, al momento del nacimiento la glándula mamaria está compuesta por un sistema muy rudimentario de tubos que se ramifican mínimamente abriéndose desde el pezón. Durante la pubertad el árbol mamario epitelial se establece dentro del estroma adiposo conocido como **almohadilla grasa** (*fat pad*). Este período de crecimiento se caracteriza por la formación de una unidad morfológica especializada denominada **brote terminal** (*terminal end-bud* TEB). La misma es una estructura multicelular organizada en multicapas, cuya función es extender los ductos epiteliales hacia las almohadillas grasas. Durante la preñez, bajo los efectos de las hormonas, comienza una rápida proliferación y diferenciación a nivel del epitelio lobular secretor, formándose las unidades secretorias lóbulo alveolares. Al término de la lactancia, la glándula mamaria atraviesa una masiva apoptosis y reestructuración, período conocido como

involución mamaria. Finalizado este período, desaparece la mayor parte del epitelio secretor, dejando a los ductos preparados para ciclos repetidos de crecimiento y diferenciación [4]. El desarrollo de la glándula mamaria normal desde la pubertad a la madurez se muestra en la Figura 1 [5]. Procesos similares a estos ocurren durante el embarazo y el ciclo menstrual humanos, aunque existen algunas diferencias en la proliferación *de novo* [6]. En la mama normal adulta se identifican tres tipos lobulares pero su contenido varía con la paridad. Así, los lóbulos tipo 1 son las estructuras menos diferenciadas y predominan en las mujeres nulíparas y en las paríparas menopáusicas. Los lóbulos más diferenciados tipo 3 predominan en las mujeres paríparas [7].



**Figura 1. Estadíos de desarrollo de la glándula mamaria del ratón**

**A-** Montajes totales de los distintos estadios de desarrollo post-natal de la glándula mamaria del ratón.

**B-** Representación esquemática de los estadios de desarrollo. La fase de elongación ductal está regulada por vía del receptor de estrógeno (RE) y la ramificación lateral y diferenciación lóbulo alveolar por la del receptor de progesterona (RP).

## 2. Desarrollo neoplásico de la glándula mamaria

Según James Ewing [8], el término neoplasia se refiere al “crecimiento relativamente autónomo de un tejido”. Las neoplasias pueden ser clasificadas como benignas o malignas:

- **Neoplasias benignas:** Son aquellas que se extienden pero no invaden tejidos adyacentes ni se dispersan hacia otros sitios. Generalmente están asociadas con un buen pronóstico.
- **Neoplasias malignas:** Son aquellas que pueden invadir tejidos adyacentes, infiltrándolos y destruyéndolos como consecuencia directa de su crecimiento dentro del tejido invadido y no por la compresión tisular. Además, son potencialmente capaces de diseminarse y colonizar a distancia, originando nuevos tumores que se conocen como metástasis. Generalmente se asocian a mal pronóstico.

El término genérico de **cáncer de mama** se refiere a la proliferación neoplásica originada en el compartimiento epitelial ya sea de estructuras ductales o lobulares de la glándula mamaria.

Con la excepción del papiloma y del carcinoma papilar de los grandes conductos galactóforos, se postula que el cáncer de mama se origina a partir de estructuras terminales del árbol epitelial mamario [9]. Las evidencias morfológicas surgidas del trabajo de Wellings apoyan la hipótesis de que el carcinoma de mama se origina a partir de la unidad dútulo-lobular terminal y que, por vías histogénicas divergentes, da lugar al tipo ductal o lobular. Entre el lumen y el estroma mamario se encuentran localizadas las células mioepiteliales. Recientemente ha sido descrita la contribución de estas células en el desarrollo de las patologías malignas. Sin embargo, el papel de la célula mioepitelial maligna permanece siendo uno de los mayores enigmas en la biología del cáncer de mama [10].

Las **células madre** (*stem cells*) han sido objeto de múltiples estudios en los últimos años. Se caracterizan por su capacidad de autorrenovarse y de dar lugar a una progenie diferenciada [11-14], así como por ser capaces de regenerar clonalmente el tejido adulto entero del cual derivan [15]. Existen

fuertes evidencias de que las células madre se mantienen en su estado natural no diferenciado y totipotente debido la represión activa de genes necesarios para su diferenciación, sin influenciar su estado proliferativo [11].

Varios trabajos sugieren la importancia de las células madre en la tumorigénesis [6, 16]. Las características de falta de diferenciación y capacidad proliferativa de las células madre se asemeja a la mostrada por las células neoplásicas, por lo que se ha sugerido que las primeras podrían ser blanco preferencial de mutaciones oncogénicas. Estas alteraciones serían a su vez propagadas a la progenie, lo que hace que muchos autores sugieran que el cáncer sería una enfermedad de las células madre [17]. Los tumores de mama se producirían en tal caso por un arresto madurativo de células pluripotentes indiferenciadas. Las neoplasias surgirían como poblaciones clonales originadas por una célula madre mutada y su progenie incapaz de completar el proceso de diferenciación y morir. Esto ha sido demostrado en teratocarcinomas, tumores hematopoyéticos (leucemias o linfomas) y también existen evidencias de que los adenocarcinomas, como los tumores de mama, se iniciarían del mismo modo [18, 19].

### **Clasificación histopatológica**

Las neoplasias malignas y benignas de la glándula mamaria se originan a partir del tejido epitelial parenquimatoso, y alternativamente del tejido conectivo estromal, o de la combinación de ambos componentes. En la Tabla I se muestran los distintos tipos de neoplasias:



**Tabla I. Tumores de la glándula mamaria**

TEJIDO DE ORIGEN	TIPO DE TUMOR
<b>CONECTIVO</b>	
Estroma intralobulillar (tejido conectivo laxo)	Fibroadenoma Tumor filoides
Estroma interlobulillar (tejido conectivo denso)	Benignos: angioma, lipoma, etc.
<b>EPITELIAL</b>	
Carcinoma <i>in situ</i>	Ductal Lobulillar
Carcinoma infiltrante	Ductal Lobulillar Ductolobulillar Especiales: tubular, cribiforme, coloide o mucinoso, medular, secretor, mixtos (túbulocribiforme) Metaplásico

El carcinoma de mama, como otros, es inicialmente una enfermedad local que se extiende luego por vía linfática a los ganglios vecinos, para diseminarse a partir de allí, por vía hemática, a otros órganos [20]. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud [21], los carcinomas mamarios se clasifican en:

### **1. No invasor (no infiltrante)**

**1.1. Carcinoma intraductal:** Aproximadamente el 90% de los carcinomas de mama se originan dentro de los conductos. El crecimiento neoplásico está confinado al epitelio ductal que eventualmente rellena la luz pero no compromete la membrana basal (MB). Las células se pueden disponer en un patrón sólido o cribiforme formando estructuras similares a conductos.

Las neoplasias formadas por células anaplásicas grandes con extensa necrosis central constituyen el comedo-carcinoma.

**1.2. Carcinoma papilar intraductal:** Estos carcinomas intraductales tienen un patrón predominantemente papilar.

**1.3. Carcinoma lobular *in situ*:** Es una proliferación de células uniformes, redondas, relativamente pequeñas, con mínima actividad mitótica y necrosis que ocupa y distiende los acinos.

## **2. Invasor (infiltrante)**

**2.1. Carcinoma ductal invasor-NOS (no especificado):** Es el tipo más común y representa el 52% de los carcinomas mamarios. Suele presentarse como un nódulo retráctil e histológicamente está formado por conductos atípicos, cordones o nidos celulares.

**2.2. Carcinoma lobular invasor:** Constituye del 5 al 10% de los carcinomas de mama y se caracteriza por ser bilateral y multicéntrico. Son tumores pobremente circunscriptos. El patrón infiltrante típico consiste en hileras de una célula o “fila india”.

**2.3. Carcinoma medular:** Su incidencia es baja. Es el tipo de los carcinomas hereditarios por mutación de los genes *Brca1* y *2*. Forma masas tumorales grandes y blandas con extensa necrosis y hemorragias.

**2.4. Carcinoma tubular:** También se lo denomina carcinoma bien diferenciado por su morfología. En su forma pura es una variante poco frecuente que se caracteriza por tener excelente pronóstico dada su baja agresividad.

Otros tumores malignos menos frecuentes son los carcinomas coloides, adenoide-quístico y carcinoma apócrino.

## **Etiología y epidemiología del cáncer de mama**

La identificación de los numerosos factores de riesgo resulta fundamental para entender la variación de la incidencia del cáncer de mama dentro y entre los distintos países, así como también para identificar a las mujeres que podrían beneficiarse con un tratamiento preventivo o un control intensivo, y modificar factores para poder reducir así el riesgo de contraer la enfermedad [20].

Los factores de riesgo identificados hasta el momento se clasifican en:

### **1. Factores Hormonales**

La regulación del crecimiento y desarrollo de la mayoría de los órganos sexuales femeninos involucra un balance entre las acciones de las dos hormonas sexuales esteroideas principales: estradiol y progesterona.

Es sabido que el crecimiento de las células tumorales de mama depende de las hormonas estrogénicas en aproximadamente un tercio de los casos clínicos y que puede ser inhibido por antagonistas estrogénicos [22]. La importancia de los estrógenos está sustentada por estudios realizados en la población femenina mundial, y por numerosas evidencias experimentales que los implican en distintas etapas de la transformación tumoral [23, 24]. Estudios recientes han implicado no sólo a los estrógenos sino también a la progesterona en la génesis del cáncer de mama. Entre los factores de riesgo relacionados con hormonas, que se asocian a mayor incidencia tumoral, se pueden mencionar:

#### **1.1. Historia menstrual y reproductiva: incluye**

**1.1.1. Menarca temprana.**

**1.1.2. Menopausia tardía.**

**1.1.3. Primer embarazo tardío.**

**1.1.4. Nuliparidad y/o fallas en la ovulación.**

**1.1.5. Obesidad en mujeres post-menopáusicas.**

El efecto protector de una menopausia temprana, así como también una menarca tardía, demuestra que la exposición durante los ciclos menstruales normales a estradiol y/o progesterona aumenta el riesgo de contraer cáncer de

mama, probablemente debido a que las hormonas ováricas estimulan directa o indirectamente la proliferación de las células mamarias.

La nuliparidad, un primer embarazo tardío implican una exposición prolongada a picos de estrógeno durante el ciclo menstrual, el cual aumentaría el riesgo de contraer la enfermedad.

La obesidad y el consumo de dietas ricas en grasas y proteínas aumentan el riesgo de contraer la enfermedad. Se ha postulado que esto estaría asociado a altos niveles de estrógeno circulantes formados a partir de la aromatización de la androtenediona en el tejido adiposo [25].

En modelos murinos de cáncer de mama se ha demostrado que tanto los progestágenos como los estrógenos son capaces de inducir la formación del tumor y de estimular su crecimiento en etapas tempranas [26-29]. Así, quedó eliminado el concepto primitivo que consideraba a los estrógenos inductores y a la progesterona como protectora en el carcinoma mamario [30]. Otras evidencias en favor de la participación de los progestágenos en la transformación neoplásica del epitelio mamario surgen de los estudios de proliferación y desarrollo de la glándula mamaria normal durante el ciclo menstrual. La actividad mitótica del epitelio mamario humano es máxima en la segunda fase del ciclo menstrual, cuando las concentraciones séricas de progesterona son máximas. Sin embargo, el pico mayor de concentración de estrógenos se produce en la fase temprana del ciclo menstrual, cuando la actividad mitótica del epitelio mamario es mínima. En el endometrio ocurre lo contrario, ya que la progesterona inhibe la proliferación del epitelio. Por lo tanto, los datos obtenidos en este tejido, no son relevantes para la mama [30].

**1.2. Lactancia:** Newcomb y colaboradores encontraron una reducción en el riesgo de cáncer mamario en mujeres premenopáusicas que habían amamantado, pero dicha reducción no ocurrió en las mujeres postmenopáusicas con historia de lactancia [31].

**1.3. Lesiones benignas de la mama e hiperplasia epitelial:** Las lesiones benignas epiteliales de la mama se clasifican en no-proliferativas y proliferativas. Las primeras no se asocian con un riesgo aumentado de cáncer de mama. Las

enfermedades epiteliales proliferativas típicas resultan en un pequeño aumento del riesgo (riesgo relativo 1,5 a 2), pero el riesgo relativo aumenta 4,3 veces en las mujeres con hiperplasia atípica con respecto a la población control [32].

#### **1.4. Tratamientos hormonales:**

**1.4.1. Estrógenos:** Datos epidemiológicos de los últimos 15 a 20 años señalan que los estrógenos exógenos, solos o combinados con progestágenos, elevan el riesgo de cáncer de mama [33].

**1.4.2. Progestágenos:** Para los compuestos con progestágenos el riesgo relativo estimado fue de 1,1 para los anticonceptivos orales y 1,09 para los inyectables, según el meta-análisis de datos [34].

**1.4.3. Combinaciones:** Recientemente se observó que el riesgo de cáncer de mama es mayor con el uso de progestágenos combinados con estrógenos, que con el uso de estrógenos solos [35].

**1.4.4. Agentes anticonceptivos:** Si bien algunos estudios epidemiológicos mostraron que el riesgo no aumenta, otros comunicaron un leve incremento en las mujeres jóvenes con consumo prolongado [36].

**1.4.5. Terapia de reemplazo hormonal:** En un estudio epidemiológico de la relación entre riesgo de cáncer de mama y terapia de reemplazo estrogénico durante la menopausia, se observó que el riesgo aumenta con el uso prolongado de la terapia [37].

## **2. Factores genéticos**

Los antecedentes familiares con cáncer de mama constituyen un factor de riesgo importante, especialmente cuando una madre o hermana a edad temprana han sido portadoras de la enfermedad [38]. Aproximadamente, el 5% de los casos de cáncer de mama presenta un patrón de ocurrencia familiar. Se han asociado mutaciones de la línea germinal del gen supresor p53 [39] con el síndrome de Li Fraumeni, que también presenta un aumento de cáncer de mama [40]. Más recientemente, se identificó un grupo de genes mutados en familias con susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, denominados *brca1* (*BReast*

*Cancer susceptibility gene 1*) y *brca2* [41, 42]. Las proteínas BRCA están involucradas en múltiples procesos celulares. En particular, los productos de ambos genes contribuyen a la regulación transcripcional en respuesta a daños del ADN y a su reparación [43].

### **3. Factores ambientales**

Entre los factores de riesgo ambiental se encuentran: la exposición a radiaciones ionizantes, los factores dietarios y los factores sociales/costumbres.

La exposición a radiaciones ionizantes puede aumentar significativamente el riesgo de contraer cáncer de mama, especialmente si la exposición ocurre entre la pubertad y los 30 años [20].

Respecto de la dieta, la mayoría de los estudios muestran que la obesidad está asociada con el riesgo de tener cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas [44, 45]. En particular, el elevado consumo de grasas podría explicar los patrones internacionales de ocurrencia de cáncer de mama así como también los cambios en las tasas de esta patología ocurridos con la migración [46]. Se ha prestado mucha atención a la presencia de productos con actividad estrogénica, por ejemplo selladores dentales, plásticos de mamaderas, etc., como así también a la presencia de productos naturales con actividad estrogénica, como la soja [47].

Los factores sociales/costumbres explicarían las importantes diferencias en la incidencia de cáncer de mama en los distintos países. Las tasas de incidencia son seis veces más altas en EEUU, Canadá o el Norte de Europa que en Asia o África negra [48]. Estas diferencias no parecen estar determinadas por una distinta susceptibilidad genética ya que la incidencia de cáncer de mama de las norteamericanas de raza negra y blanca es muy similar, y a su vez diferente de la raza negra africana [20].

## II. BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

### Aspectos generales

El cáncer es un proceso de múltiples etapas en el cual los controles normales de proliferación celular y de interacción célula a célula se encuentran alterados. Se postulan distintos momentos evolutivos o etapas biológicas en el cáncer de mama. Estas etapas, cuya expresión fundamental es un incremento progresivo de la agresividad clínica, se asocian a patrones histológicos y biológicos específicos. Los mecanismos que disparan la progresión a través de las distintas etapas y que culminan con la adquisición de un crecimiento autónomo no se conocen totalmente, pero su estudio es de fundamental importancia.

Entre los factores que regulan el comportamiento de una célula tumoral se reconocen aquellos producidos por la propia célula maligna y/o los producidos por las células del microambiente. Estos factores interactúan con receptores específicos de la célula tumoral, los activan e inducen respuestas que van desde la inducción de la expresión de proteínas relacionadas con el control de la proliferación hasta la modulación de la expresión de componentes de la matriz extracelular (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 [49].

### Mecanismos de la progresión tumoral

La capacidad de las células neoplásicas de desprenderse del 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. Este proceso, conocido como **diseminación metastásica** provoca en el

paciente un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que ensombrece el pronóstico del paciente oncológico.

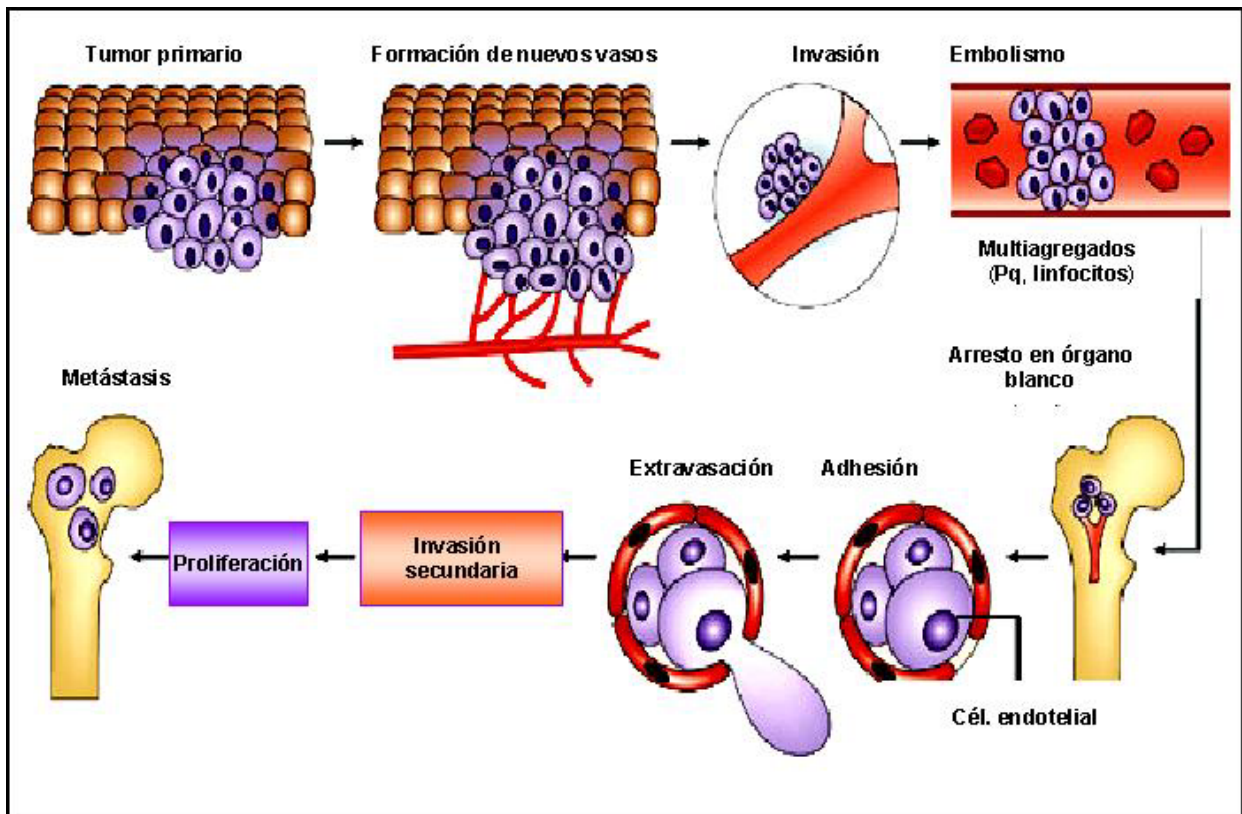
Tanto la invasión como la metástasis representan dos enormes obstáculos para el tratamiento de las neoplasias. La metástasis es un proceso ineficiente si consideramos que son pocas las células malignas que logran sobrevivir una vez que han alcanzado la circulación. Este proceso dinámico, complejo y selectivo, es también resultante de una sucesión de etapas múltiples y dependiente de la interacción entre factores producidos tanto por el huésped como por el tumor [50].

### **1. La cascada metastásica**

En 1889 Stephen Paget propuso, luego de una detallada revisión del historial de la distribución metastásica en pacientes con cáncer de mama y otros tumores, una novedosa teoría para explicar la razón de la especificidad del órgano huésped de las metástasis. 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 metástasis no se distribuyen al azar, cumpliendo el órgano blanco un papel activo en su formación [51].

Más tarde, hacia el año 1928, Ewing formuló la llamada teoría “anatómo-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 [52]. Actualmente se acepta que ambas teorías no son mutuamente excluyentes y que contribuyen a explicar la forma de colonización de un tumor [53] (Figura 2).





**Figura 2. Etapas de la cascada metastásica**

Para generar metástasis las células tumorales deben desprenderse del tumor primario, invadir la ME y entrar en la circulación, detenerse en los lechos capilares, adherirse al endotelio y a la MB subendotelial, entrar en el parénquima del órgano blanco, responder a factores de crecimiento autócrinos o parácrinos y proliferar.

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las bases moleculares de la progresión tumoral, lo cual permitirá mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. Se ha demostrado que el establecimiento de un foco tumoral primario es el resultado de múltiples alteraciones genéticas, que llevan al crecimiento celular descontrolado. Estas alteraciones pueden involucrar tanto la activación de oncogenes como la inactivación de genes supresores de tumor. Para el desarrollo de metástasis se necesita de la expresión coordinada de muchos genes, pero se requiere un solo gen para bloquearlas, ya que la incapacidad de completar algún paso de la cascada impide a la célula metastatizar [54]. Se conocen ahora genes promotores de metástasis o **metastogenes**, que contribuyen a la formación de focos metastásicos a partir de un tumor en crecimiento [55, 56]. Por otra parte,

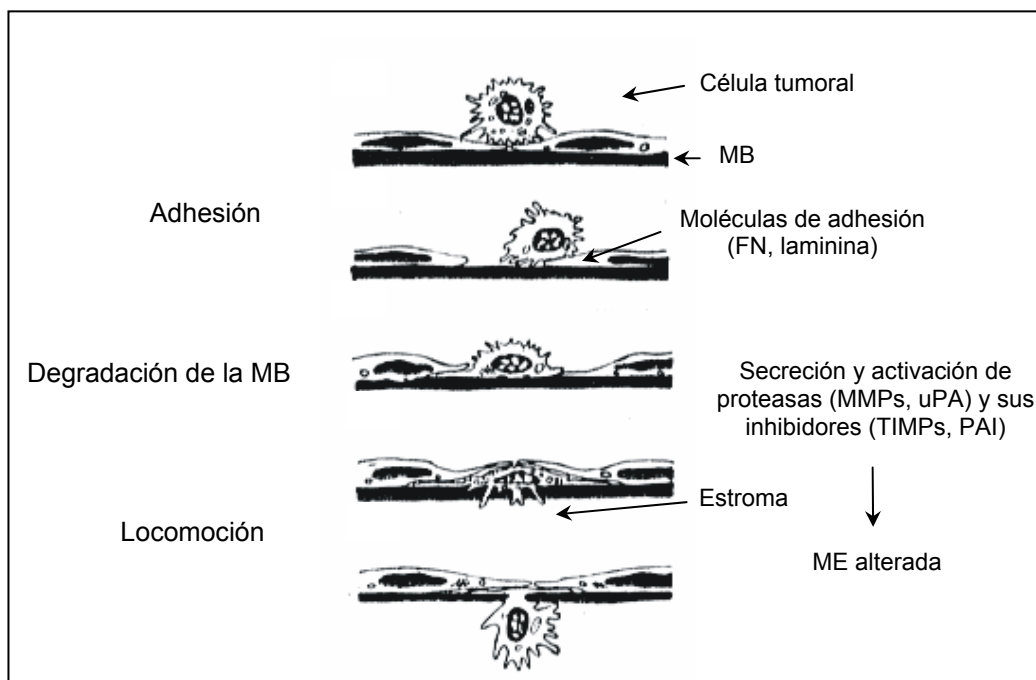
se ha definido también una nueva clase de genes denominados **genes supresores de metástasis** [57, 58], identificados por su expresión reducida en las células tumorales metastásicas, comparado con lo encontrado en las células tumorigénicas no metastásicas [59, 60]. Teóricamente la definición de genes supresores de metástasis implica que pueden suprimir o inhibir la formación de metástasis espontáneas macroscópicas, sin afectar el crecimiento del tumor primario, diferenciándose así de los genes supresores de tumor, capaces de suprimir el crecimiento del tumor primario. Los genes supresores de metástasis parecen operar en distintas fases del proceso metastásico. Además, se cree que la pérdida de función de estos genes tiene un papel importante en la adquisición de la capacidad metastásica. Debido a todo esto, se los considera potenciales blancos terapéuticos [61, 62]. Entre ellos se encuentra *kiss1*, cuyo producto inhibe la metástasis tanto de células de melanoma como de carcinoma de mama [63], y el gen *brms1* (*BReast Metastasis Suppressor 1*) [59, 64-66] (Tabla II).

**Tabla II. Genes supresores de metástasis**

<b>GEN SUPRESOR DE METÁSTASIS</b>	<b>AÑO EN QUE SE DESCUBRIÓ</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b><i>Nm23</i></b>	1988	Histidina quinasa
<b><i>Kai1</i></b>	1995	Interacción de integrinas y desensibilización del EGFR
<b><i>Kiss1</i></b>	1996	Hormona derivada de placenta, ligando del receptor acoplado a proteína Gq
<b><i>Mkk4</i></b>	1999	Ser-Treo quinasa
<b><i>Brms1</i></b>	2000	Comunicador de las uniones Gap
<b><i>Crsp3</i></b>	2002	Coactivador transcripcional
<b><i>Rhogdl2</i></b>	2002	Regulador de Rho y Rac
<b><i>Vdup1</i></b>	2003	Inhibidor de la tioredoxina

## 2. Invasión tumoral

La invasión es un fenómeno multifacético que involucra interacciones célula a célula y célula-ME. 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 (Figura 3). En este complejo proceso participan numerosas moléculas con actividades específicas como moléculas de adhesión y sus receptores (integrinas y proteoglicanos de membrana), factores promotores de la motilidad, componentes estructurales de la ME (laminina, fibronectina), enzimas proteolíticas como las serino, cisteíno y metalo-proteasas [67] y diversas citoquinas y factores de crecimiento [68].



**Figura 3. Proceso de invasión tumoral**

- A- Adhesión de la célula tumoral a las células endoteliales.
- B- Retracción de las células endoteliales.
- C- Migración de la célula tumoral, adhesión a la ME subyacente y solapamiento con las células endoteliales próximas.
- D- Destrucción de la MB endotelial y reestablecimiento de las uniones intercelulares endoteliales.
- E- Invasión de los tejidos circundantes.

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) podría 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. La **migración celular** es una propiedad importante también en condiciones normales, por ejemplo durante la embriogénesis, la implantación del trofoblasto, el desarrollo o la organización del sistema nervioso central, 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 los procesos inflamatorios y en la reparación de heridas, entre muchos otros [69-71].

El proceso de migración celular es un ciclo de múltiples pasos, que incluye la extensión de protusiones, la pérdida de la adhesión celular, y la polimerización del citoesqueleto de actina [72, 73]. Entre los factores que estimulan la capacidad migratoria, se encuentran los factores secretados por la propia célula tumoral, los factores de crecimiento y los componentes de la ME [74]. Se ha observado en muchos modelos experimentales y en tumores humanos que las células tumorales más invasivas y metastásicas presentan un mayor grado de motilidad [74, 75]. 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).

### **3. Angiogénesis**

Se ha postulado que la formación del tumor primario consta en principio de una etapa avascular, donde las primeras células transformadas deben proliferar en condiciones nutricionales de gran deficiencia. Pero para que un tumor pueda nutrirse y continuar creciendo más allá de unos pocos milímetros de diámetro, debe ser vascularizado [76, 77]. La neovascularización de un tumor

se denomina **angiogénesis** y consiste en el desarrollo de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes [78]. Este proceso es complejo y consiste típicamente en los siguientes pasos: disolución de la MB de los vasos, usualmente en una vénula post-capilar; migración de células endoteliales hacia el tumor; proliferación de estas células; canalización, ramificación y formación de lazos vasculares; y por último formación de nuevas MB [79]. Se cree que la neovascularización es un requisito para la expansión clonal rápida asociada con la formación de tumores macroscópicos y es crítica para la supervivencia de las células tumorales [80]. El proceso de angiogénesis es regulado por múltiples factores, que se clasifican como pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Estos factores pueden ser liberados y/o inducidos por las células tumorales y pueden actuar directamente sobre las células endoteliales o indirectamente a través de la activación de células inflamatorias locales [81].

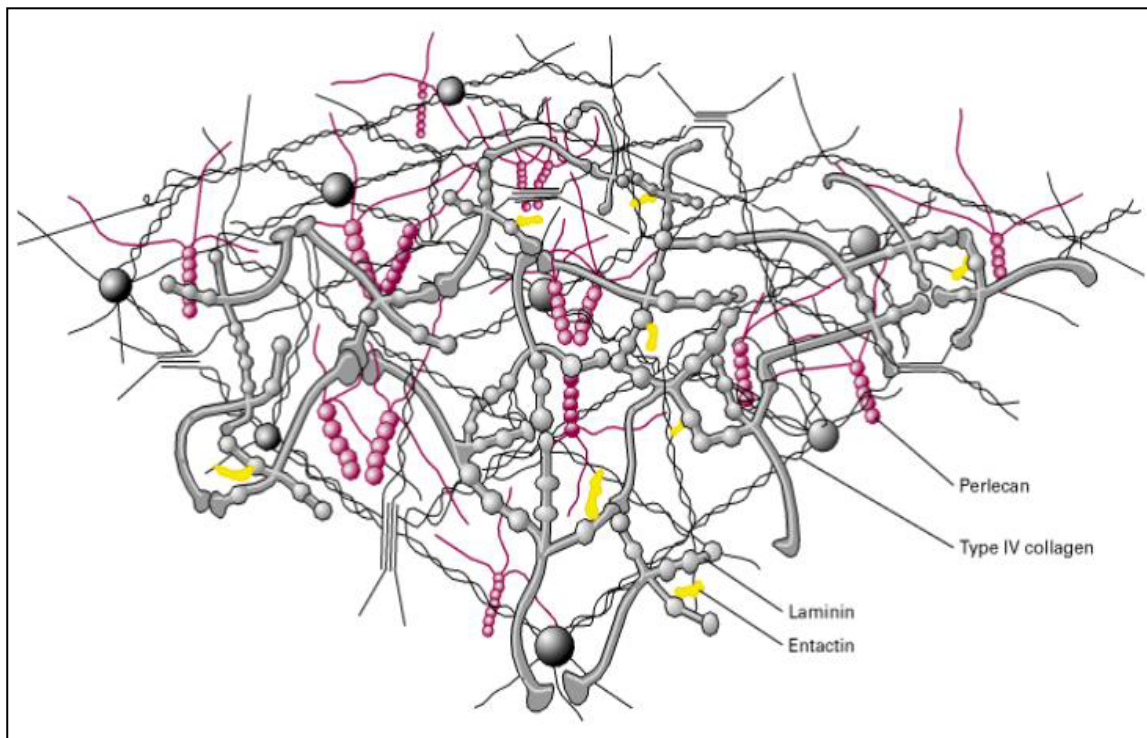
### **Matriz extracelular (ME)**

Tanto la invasión local de un tumor primario, como la invasión denominada “secundaria” a nivel del órgano blanco, dependen de 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 [82, 83].

La ME es una red tridimensional compleja en remodelación constante constituida por macromoléculas de gran tamaño y que provee información contextual y un sostén para la adhesión celular y la migración. Está compuesta principalmente por colágeno y glicosaminoglicanos, pudiendo presentar además laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina [84] (Tabla III, Figura 4). Los componentes de la ME además de ser un soporte para las células, pueden tener otras funciones, como la de activar vías de señalización intracelulares mediante su unión a moléculas de adhesión en la membrana celular; o bien pueden secuestrar factores de crecimiento o presentarlos a las células, modulando así la transducción de señales.

**Tabla III. Composición proteica de la ME**

TIPO	COMPONENTE	FUNCIÓN
<b>COLÁGENO</b>	Colágenos tipo I, III, IV y V	Estructura de sostén de las MB y matrices intersticiales
<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	Laminina	Adhesión entre células epiteliales y endoteliales
	Fibronectina	Interacción ME-célula a través de la unión a integrinas
	Vitronectina	Regulación de la migración de células normales y transformadas
	Entactina	Estabilización de los distintos componentes de la ME



**Figura 4. Estructura de la ME**

En esta representación esquemática puede verse la densa red de fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos que componen la ME.

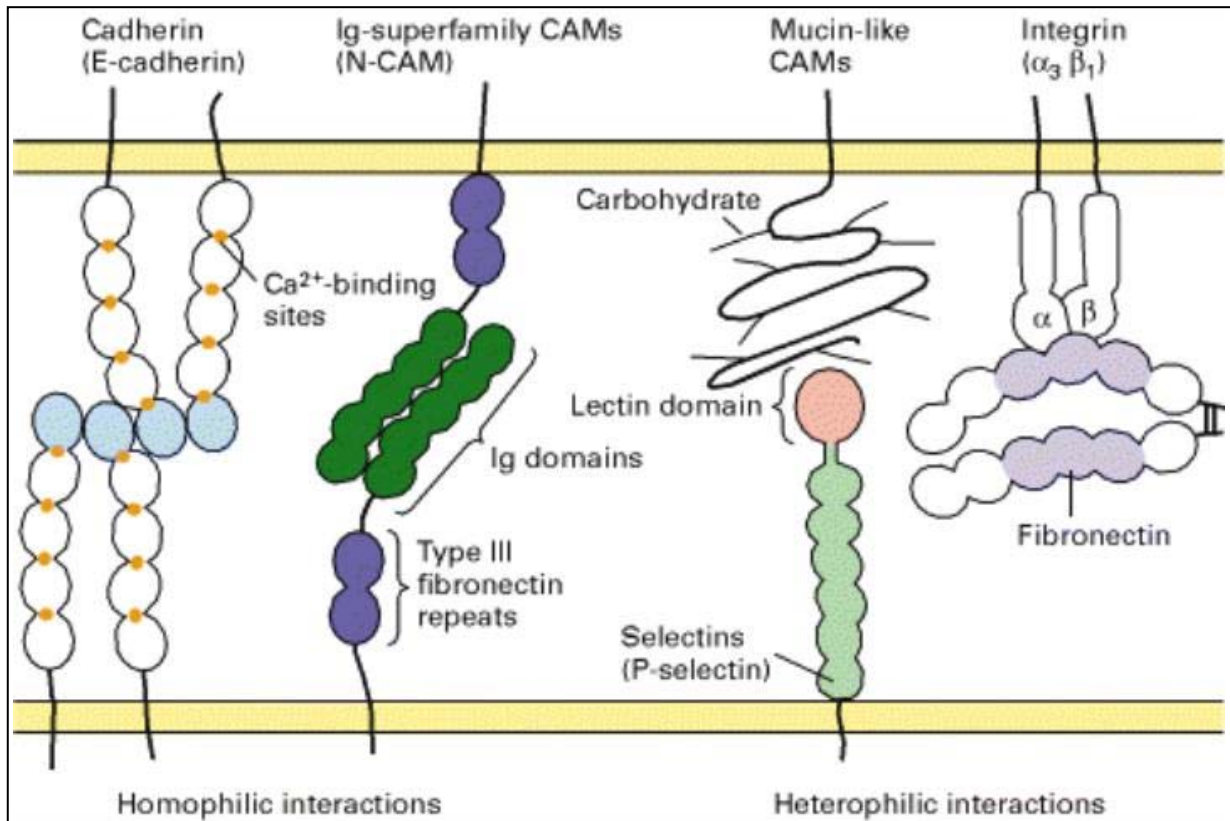
Las ME pueden formar estructuras altamente especializadas, como las **membranas basales** (MB) donde se apoyan los epitelios. La MB está compuesta mayoritariamente por colágeno IV, si bien otras moléculas como laminina también se encuentran presentes [85]. Es sintetizada por las células que soporta, por lo que su composición es variable de acuerdo a los distintos tejidos [86]. Durante la transición desde un carcinoma no invasor a uno invasivo se producen cambios en la organización de la MB, que involucran pérdida de parte de sus componentes. Esto puede deberse a una síntesis alterada, a un incorrecto ensamblaje, o a un incremento en la degradación de la MB causado por proteasas inducidas por las células tumorales [87].

Normalmente, las células se unen a la ME para mantener la integridad tisular. La adhesión célula a célula determina la polaridad de las células y participa en el mantenimiento de los tejidos. Su disminución permite a las células tumorales desobedecer el orden tisular, lo que resulta en la destrucción de la estructura, marca morfológica de los tumores malignos. Durante la progresión del cáncer, se reduce la adhesión intercelular, las células se vuelven más móviles y adquieren capacidad invasiva.

### **Moléculas de adhesión**

Bajo el nombre de moléculas de adhesión celular (CAMs) se incluye a una gran cantidad de proteínas que intervienen en las interacciones celulares de tejidos embrionarios y adultos, normales y patológicos.

Hasta la fecha las CAMs se han agrupado en cuatro clases principales: las **cadherinas**, las **selectinas**, las **integrinas** y la **superfamilia de las inmunoglobulinas** (Figura 5) [88].



### Figura 5. Moléculas de adhesión celular (CAMs)

Según el tipo de unión en la intervienen, las CAMs se dividen en molécula de interacción homofílica (como las cadherinas y las proteínas de la superfamilia de las Ig) y moléculas de interacción heterofílica (como las integrinas y las selectinas).

#### 1. Cadherinas

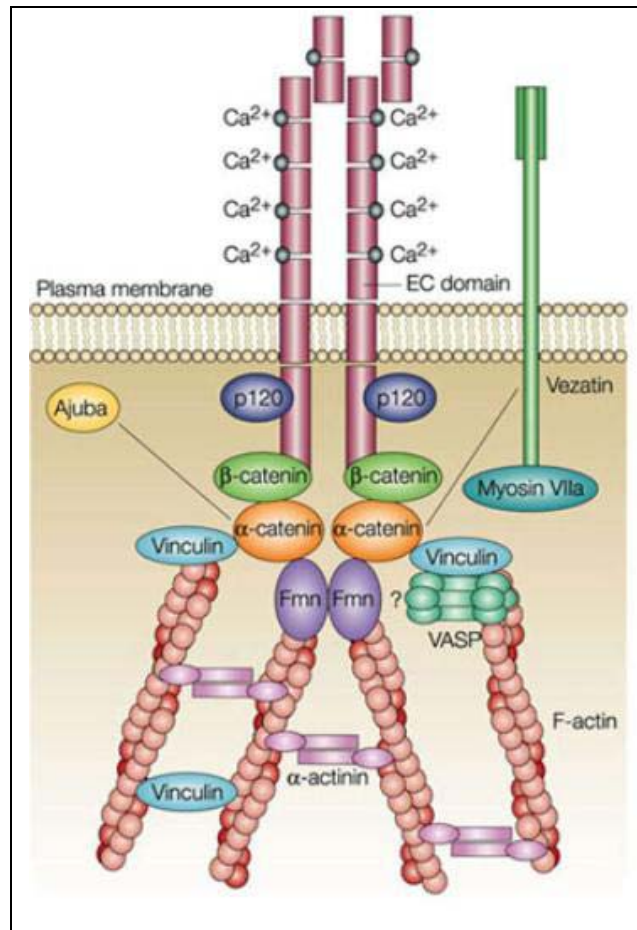
Bajo este nombre se agrupa a una serie de glicoproteínas de superficie cuya función es mediar la adhesión célula a célula a través de uniones homofílicas. De esta manera, las cadherinas organizan *in vivo* la formación de tejidos sólidos, participando en la morfogénesis, en etapas tempranas del desarrollo del embrión, y manteniendo la integridad del tejido [89].

La superfamilia de las cadherinas está compuesta por las **cadherinas clásicas**, que son las principales mediadoras de la interacción célula a célula calcio dependiente, las **no clásicas**, que incluyen a las cadherinas desmosomales, y las **protocadherinas**. Este último grupo, recientemente descubierto, engloba a las cadherinas involucradas en la plasticidad neuronal [90].



La **E-cadherina** es el principal miembro de la familia de cadherinas clásicas. Su función es clave en la inducción de la polaridad celular y en la organización del epitelio [91]. Tienen un largo dominio extracelular, un segmento transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático, que interactúa con el citoesqueleto a través de moléculas especializadas, las **cateninas**. El dominio extracelular contiene cinco módulos de alrededor de 100 aminoácidos dispuestos en tándem, en cuyos extremos amino se encuentran tanto la actividad adhesiva de la molécula como el sitio de unión a calcio. Las cadherinas presentan un tipo de unión homofílica, aunque recientemente se ha encontrado que también pueden unirse a dos integrinas, las  $\alpha E\beta 7$  y la  $\alpha 2\beta 1$  [92].

Aunque el dominio citoplasmático de la E-cadherina no posee ninguna actividad enzimática, se ha postulado que esta molécula podría estar indirectamente involucrada en transducción de señales. La  **$\beta$ -catenina**, molécula de unión a la E-cadherina, forma un complejo con la  $\alpha$ -catenina y la actina que estabiliza la arquitectura del citoesqueleto (Figura 6). La  $\beta$ -catenina que no se asocia con la E-cadherina se une a la proteína APC y a GSK-3 $\beta$  [93]. La formación de este complejo resulta en la fosforilación de  $\beta$ -catenina y APC, induciéndose su ubiquitinación y degradación por el proteosoma [94-96]. Si  $\beta$ -catenina o APC están mutadas de manera tal que se impide su degradación, la  $\beta$ -catenina se acumula en el núcleo [97, 98] donde forma complejos heterodiméricos y activa la transcripción de genes [99-101]. Además de estas posibles mutaciones, la  $\beta$ -catenina es también estabilizada por la cascada de señalización de Wnt. La proteína Wnt se une a su correspondiente receptor de la superficie celular, Frizzled (FZ), e induce la inhibición de GSK-3 $\beta$ . De esta manera, previene la fosforilación de  $\beta$ -catenina y/o APC, frenando su ubiquitinación y degradación. Las cadherinas pueden influir sobre la señalización Wnt interactuando y secuestrando  $\beta$ -catenina, de manera tal que la cantidad de  $\beta$ -catenina libre que se transloca al núcleo es mínima [96]. La sobreexpresión de cadherinas ha demostrado ser antagonista de las funciones de señalización de la  $\beta$ -catenina.



### Figura 6. Interacciones de la E-cadherina

Dentro de la célula, la E-cadherina interactúa con la β-catenina. Esta molécula forma un complejo con la α-catenina y la actina que estabiliza la arquitectura del citoesqueleto.

La E-cadherina es considerada un gen supresor de tumor. Existe evidencia de la inactivación del sistema de adhesión mediado por E-cadherina por diversos mecanismos durante la carcinogénesis humana [102, 103]. Basados en los datos descriptivos y funcionales, ha sido propuesto que la pérdida de la adhesión célula a célula mediada por la E-cadherina es un prerrequisito para la invasión tumoral y la formación de metástasis [104]. La reexpresión de la E-cadherina en células tumorales indujo una disminución en la invasión [105], supresión del crecimiento [106] y diferenciación terminal [107]. En el caso particular de cáncer de mama, se ha demostrado el potencial uso de la E-cadherina como marcador tumoral, ya que su baja expresión se relaciona con el grado de agresividad del tumor [108].

## 2. Selectinas

Esta familia presenta tres miembros homólogos tipo I: las L, en los leucocitos, las E en el endotelio y las P en las plaquetas. Estas moléculas participan en la migración leucocitaria y en el proceso inflamatorio [109]. Contienen un módulo tipo lectina en el extremo amino terminal 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 [89]. Se ha postulado que las selectinas intervienen en la adhesión de la célula tumoral durante la progresión maligna, facilitando el desarrollo de metástasis [110].

## 3. Integrinas

Constituyen la principal familia de receptores que median tanto interacciones célula a célula como célula-ME. Las funciones biológicas de las integrinas son muy diversas, desde anclar a los queratinocitos a la MB 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 reguladas dinámicamente a través de la membrana plasmática, por combinación de cambios conformacionales y formación de clusters.

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. Por ejemplo, la fibronectina 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, también sirve como sitio activo para la unión con las integrinas. Otros ligandos de las integrinas son las VCAM (moléculas de adhesión vascular), proteínas endoteliales sustrato para la extravasación de los leucocitos y las ICAM (moléculas de adhesión intercelular), que participarían en la recirculación de los linfocitos [111-113].

Descubrimientos recientes involucran a las integrinas con la progresión del carcinoma de mama. Aparentemente, algunas integrinas serían capaces de favorecer la supervivencia de células de carcinoma mamario, especialmente en condiciones de estrés, tales como las que existen en el microambiente tumoral [114, 115].

#### **4. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig-CAM)**

Estas moléculas median interacciones homofílicas y heterofílicas, presentando dominios característicos Ig en la zona extracelular. 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 [116]. Este complejo grupo de moléculas de adhesión participa en diversos procesos biológicos, tales como el desarrollo del cerebro, la respuesta inmune, la morfogénesis epitelial y el desarrollo de la red vascular [117].

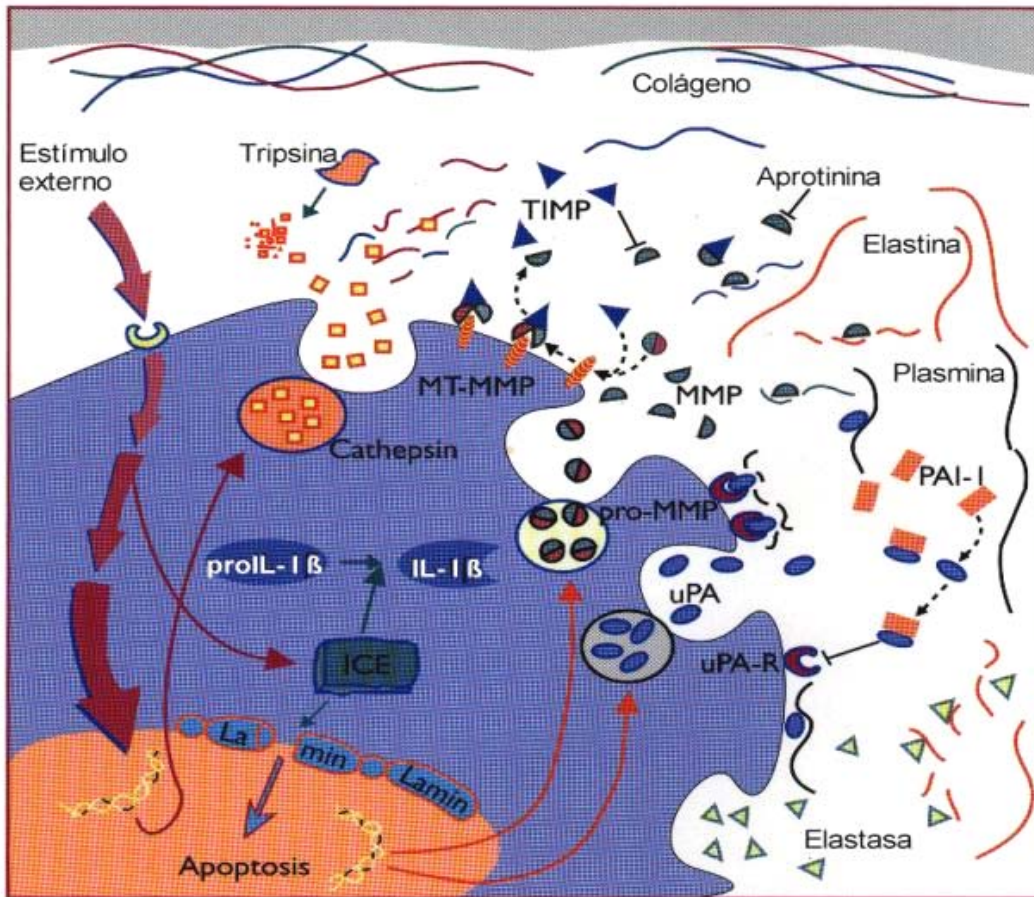
Uno de los miembros mejor estudiados de esta superfamilia es NCAM. Además de tener funciones en el desarrollo neuronal, su patrón de expresión sufre diversos cambios durante el crecimiento de ciertos tumores epiteliales [90]. En varios tipos tumorales, la pérdida de expresión de NCAM se correlaciona con mal pronóstico [118]. Además de la NCAM, muchos otros miembros de esta superfamilia presentan una expresión y/o función desregulada en varios tipos de cáncer. La evidencia experimental indica que al menos una Ig-CAM está involucrada en cada paso de la progresión tumoral [90].

#### **Producción de enzimas proteolíticas**

En las distintas etapas de la cascada metastásica están involucradas diversas clases de enzimas proteolíticas (Tabla IV, Figura 7). Se conoce que las células tumorales producen mayor cantidad de estas enzimas que las células normales de igual estirpe [119-121].

**Tabla IV. Familia de proteasas participantes en la invasión tumoral y la metástasis**

<b>FAMILIA DE PROTEASAS</b>	<b>ENZIMAS</b>	<b>SUSTRATOS / ACTIVIDAD</b>
Serino	Activadores de Plasminógeno tPA (tipo tisular) uPA (tipo uroquinasa)  Plasmina	Activa plasminógeno a plasmina. Tiene acción proteolítica directa sobre algunos componentes de ME, como FN Activa proMMPs, Laminina
Cisteíno o Tiol	Catepsina B	Activa uPA y proMMPs
Aspártico o ácidas	Catepsina D	Variedad de proteínas endocitadas
Metalo	Colagenasa intersticial	Colágeno tipo I
	Gelatinasas	Colágeno tipo IV, gelatina
	Matrilisinas	Caseína, elastina
	Estromelisininas	Glicosaminoglicanos, proteoglicanos
	MT-MMPs	Proteólisis pericelular Activación de proMMP-2
	Heparanasas	Heparán sulfato, heparinas
ADAMs	ADAM -1 -2, etc. (20 isoformas)	Proteólisis pericelular Adhesión Señalización intracelular



**Figura 7. Enzimas proteolíticas involucradas en la cascada metastásica**

Distintas proteasas son liberadas al espacio pericelular a partir de las células tumorales. Las líneas llenas indican los efectos directos e indirectos de las enzimas asociadas a tumores sobre los sustratos biológicos que forman parte de las barreras que obstaculizan la invasión. Las líneas punteadas representan las posibles retroalimentaciones inhibitorias o mecanismos de autólisis.

Las **metaloproteasas (MMPs)** son sintetizadas en forma de pre-pro-enzimas y la mayoría de las mismas son secretadas en forma de pro-enzimas o zimógenos [82, 122]. Para lograr que la enzima pueda desarrollar su actividad es imprescindible la eliminación completa del pro-dominio, que puede realizarse de manera autoproteolítica [123] o con la participación de otras enzimas proteolíticas, como por ejemplo el sistema activador de plasminógeno [82] o la acción de la furina, una serino endopeptidasa [123]. La actividad de las MMPs está regulada por distintos tipos de inhibidores. Los mismos pueden ser clasificados como específicos (**TIMPs**) y no-específicos ( $\alpha_2$ -macroglobulina, por ejemplo). Los inhibidores endógenos mejor estudiados son los TIMPs, moléculas

producidas por las mismas células que sintetizan a las MMPs o por las células vecinas, hecho que permite controlar la proteólisis pericelular en situaciones normales [124]. Estas enzimas participan en procesos normales, como la morfogénesis mamaria [125].

En los últimos años se ha acumulado evidencia suficiente que permite asociar a las 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 en numerosos ensayos clínicos [69, 126, 127].

Las MMPs se han encontrado sobreexpresadas en diversos tumores humanos como carcinoma de cabeza y cuello, carcinomas del tracto gastrointestinal, tumores de vejiga, pulmón, mama y próstata; mostrando correlación con invasividad, MTS y recurrencia local [128]. 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 facilite la proliferación, la angiogénesis y la invasión en el lugar de desarrollo del tumor primario.
- Favorecer la intravasación, ya sea como célula aislada o en clusters.
- La extravasación a partir de la microvasculatura y la repetición, una vez alcanzado el parénquima del órgano blanco, de los mecanismos antes descritos para lograr la invasión y el crecimiento de tumores secundarios [129-132].

El **activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)**, es una serino proteasa que participa junto con las MMPs en la degradación de la ME. Por la activación del plasminógeno a plasmina, permite el pasaje de pro-MMPs a MMPs activas. El precursor inactivo del uPA es secretado como una proteína soluble y se une con mucha afinidad a su receptor de la membrana celular (uPAR). El sistema uPA-uPAR también está asociado con la proliferación, la

adhesión, la migración y la diferenciación celular, independientemente de su actividad catalítica, probablemente por interacciones del uPAR con el citoesqueleto mediadas por las integrinas [133].

Alteraciones en la expresión y/o actividad de este sistema proteolítico han sido encontradas en varios tipos tumorales. Por ejemplo, ha sido demostrado que la rápida diseminación metastásica de células de un carcinoma humano (Hep3) está regulada por la expresión aumentada de uPAR que, mediante la interacción y activación de integrinas, inicia la cascada de señalización que culmina en la activación de ERK. Esta activación es adicionalmente amplificada por la interacción del uPA con su receptor uPAR y por la unión de la célula a FN. La disminución de la expresión de este receptor de superficie altera las interacciones entre la célula tumoral y la ME, induciendo *dormancy in vivo* [134].

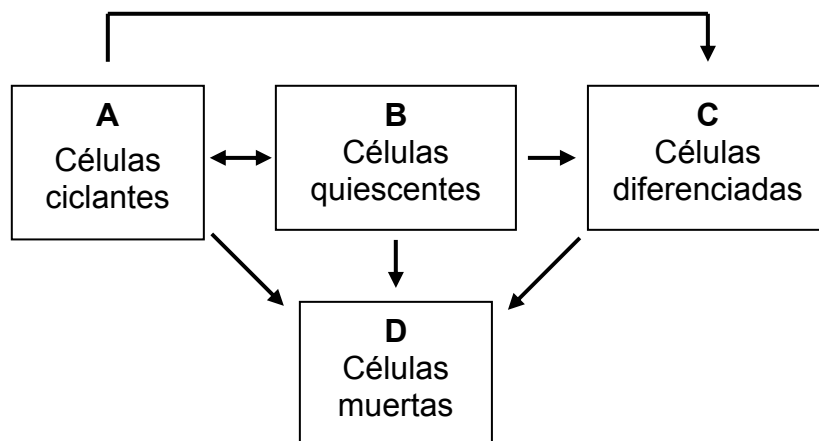
En conclusión, tanto el uPA como las MMPs tienen un papel importante en la diseminación metastásica, compartiendo algunas vías de señalización que regulan su producción [135].



### III. CRECIMIENTO TUMORAL

#### Aspectos generales

Un tumor crece porque la producción celular excede la pérdida de células. La pérdida celular puede ser física, debida a la muerte celular o a la metástasis, o funcional, ocasionada por un estadio diferenciado en el cual un número significativo de células no entran en ciclo replicativo. El crecimiento tumoral depende de un balance entre la proliferación y la muerte celular. En términos de replicación, se pueden considerar cuatro poblaciones dentro del tumor, como se muestra en la Figura 8.



#### **Figura 8. Comportamiento de las poblaciones celulares**

En términos replicativos, se describen cuatro poblaciones celulares: **A**- células en división activa, **B**- células temporalmente no ciclantes, **C**- células permanentemente fuera de ciclo o diferenciadas, **D**- células muertas.

La existencia de las diferentes poblaciones de células tumorales es clave en la decisión terapéutica ya que representan blancos preferenciales para los distintos tratamientos antitumorales. Así, la población A es la más sensible al efecto citotóxico y es el principal blanco de la quimioterapia. Los agentes inductores de diferenciación (retinoides, calcitrol) reclutarían células en la población C, y los agentes antiproliferativos actuarían disminuyendo la población A [136].

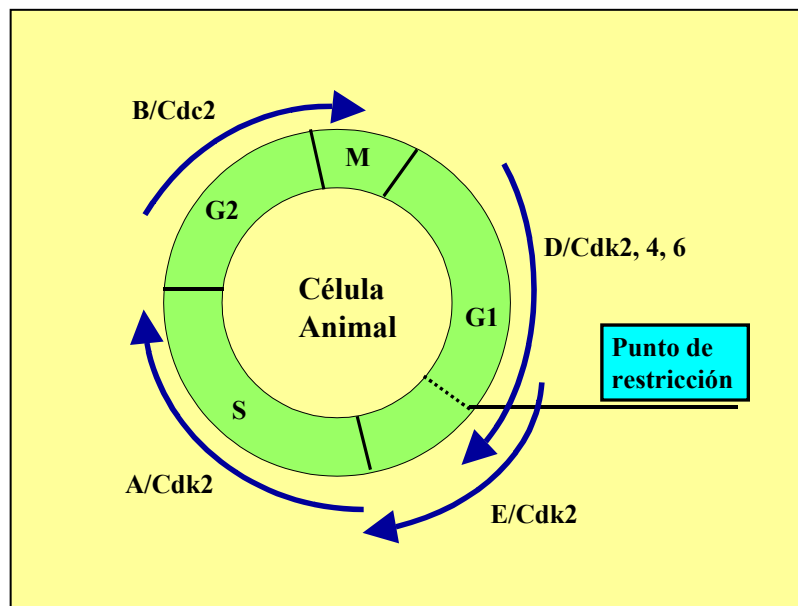
## Control de la proliferación: Ciclo Celular

Las células que se dividen pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división celular, conocida como *ciclo celular*. Los trabajos pioneros de Howard y Pelc demostraron que el ciclo celular consta de 2 fases funcionales [137]:

Fase S o Replicación: Destinada a la copia precisa y completa del ADN.

Fase M o Mitosis y Citoquinesis: Los cromosomas duplicados son igualmente distribuidos entre las células hijas.

Previo a cada fase funcional existe una fase preparatoria. La célula se prepara bioquímicamente para la síntesis del ADN en la fase Gap 1 (G1) y para la mitosis en la fase Gap 2 (G2). En conjunto las fases G1, S y G2 reciben el nombre de **interfase**. En la Figura 9 se muestran las diferentes etapas del ciclo celular.



**Figura 9. Etapas del ciclo celular. Complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas**

En células animales, la progresión a través del punto de restricción de G1 está controlada por los complejos de CDK2, CDK4 y CDK6 con las ciclinas del tipo D. El complejo E/CDK2 funciona posteriormente en G1, y es requerido para la transición de G1 a S. El complejo A/CDK2 es necesario para la progresión a través de la fase S, mientras que el complejo B/CDK1 (Cdc2) conduce el pasaje a través de la fase M.

La duración total del ciclo celular varía en los diferentes tejidos. Estas diferencias en la duración del ciclo son a expensas de G1, que es la fase de duración más variable, mientras que los estadios S, G2 y M son relativamente constantes [138].

## 1. Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

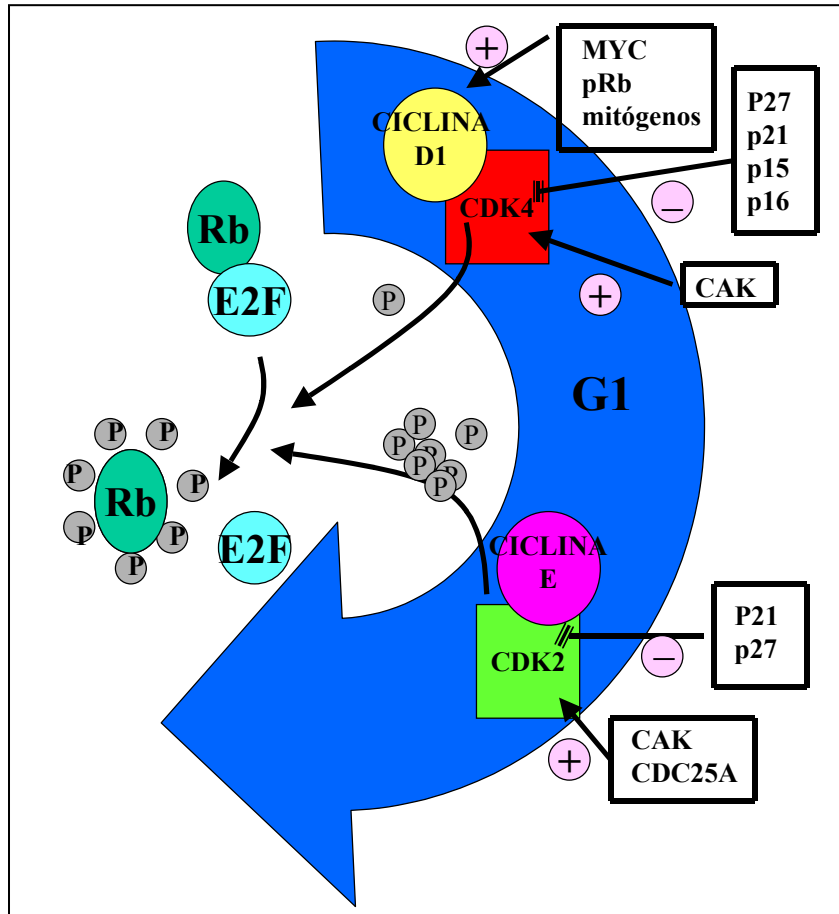
Uno de los avances más importantes para el entendimiento de los mecanismos que controlan la proliferación celular ha sido la identificación, en organismos multicelulares, de una familia de quinasas de proteínas involucradas en la regulación de distintos puntos del ciclo celular. Estas quinasas están relacionadas no sólo por su estructura primaria sino también porque se unen y a la vez son activadas por las proteínas llamadas **ciclinas**. Debido a esta última propiedad dicha familia de quinasas ha sido denominada **quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)** [139]. Las CDKs son reguladas por varios mecanismos, reflejando la diversidad de señales que integran y el papel central que juegan en el control del ciclo celular [140].

Dentro de esta familia de quinasas se encuentran: CDK1 (Cdc2), CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6 y CDK7.

## 2. Ciclinas

Las ciclinas componen una familia de proteínas relacionadas entre sí por su estructura, cuyo contenido varía en forma característica y programada a lo largo del ciclo celular [141]. Se las puede agrupar en 3 categorías: **tipo A**, **tipo B** y **ciclinas de G1** (ciclinas D1-D3 y E). Las mismas pueden diferenciarse sobre la base de secuencias conservadas, patrones de aparición y papeles funcionales durante fases específicas y puntos de control del ciclo celular de distintas especies [141] (Figura 9).

**2.1. Ciclinas de G1:** En mamíferos, la fase G1 del ciclo celular es la etapa primaria de acción de los factores reguladores del crecimiento. En la Figura 10 se ilustran los caminos de regulación de la fase G1.



**Figura 10. Interacciones moleculares durante la progresión de la fase G1**

Las ciclinas D son inducidas en respuesta a mitógenos, como así también por Myc y Rb, en las células que están entrando en la fase G1. pRb está inicialmente presente en su forma inhibitoria hipofosforilada, secuestrando factores de transcripción como el E2F. La ciclina D unida a CDK4 o CDK6 puede ser fosforilada por CAK para tornarse enzimáticamente activa. La actividad quinasa de estos complejos ciclina/CDK es negativamente regulada por los inhibidores, p15, p16, p21 y p27. La ciclina E se expresa en la fase G1 tardía y se une a CDK2. Su actividad quinasa se regula de manera similar a la de los complejos ciclina D/CDK4, mediante CAK, CDC25A, y los inhibidores p21 y p27. La activación de los complejos de G1 resulta en la acumulación de pRb hiperfosforilado inactivo, y consecuentemente la liberación del factor de transcripción E2F [142].

**2.1.1. Ciclina E:** La ciclina E tiene como función principal controlar la transición G1/S. La expresión del gen de la ciclina E aumenta en la mitad de la fase G1, siendo el nivel de proteína máximo en G1 tardía [143, 144]. La actividad quinasa asociada a ciclina E es regulada tanto por la fosforilación de la subunidad CDK2 como por la acumulación de ciclina E.

**2.1.2. Ciclinas D:** Los tres tipos de ciclinas D -D1, D2 y D3- son diferencialmente expresados en varias clases de células. La síntesis de ciclinas tipo D es inducida en respuesta a la estimulación producida por los factores de crecimiento, siendo sintetizadas mientras estos factores están presentes. Sin embargo, las ciclinas D son inmediatamente degradadas, de forma tal que su concentración intracelular baja rápidamente cuando los factores de crecimiento son eliminados. La inducción y rápido recambio de las ciclinas D integran a la señalización de los factores de crecimiento con la maquinaria del ciclo celular, brindando la posibilidad de que factores extracelulares controlen la progresión de las células a través de G1 [145]. Los complejos de CDK4 y CDK6 con las ciclinas del tipo D, juegan un papel fundamental en la progresión a través del punto de restricción en G1.

La ciclina D1 ha sido el foco de mayor atención. Su sobreexpresión causa el acortamiento de la fase G1 [146-148]. El ensamblaje de la holoenzima ciclina D1/CDK4 es limitante de la velocidad de progresión a través de G1 [149].

**2.1.3. Interacción de las ciclinas de G1 y el supresor de tumor pRb:** Las ciclinas y CDKs interactúan con proteínas celulares. Éstas incluyen al producto del gen responsable del retinoblastoma, pRb. En su estado hipofosforilado, pRb se une e inhibe a un gran número de factores de transcripción, como el E2F. La hiperfosforilación y consecuente inactivación de la proteína pRb, resulta en la liberación de los factores de transcripción unidos. Esto ocurre en la fase G1 tardía y es necesario para la progresión del ciclo celular. Los complejos ciclinas D/CDKs y ciclina E/CDK2 tienen actividad quinasa de Rb *in vivo* [141] (Figura 10).

Las ciclinas D pueden unirse directamente a la proteína pRb, sugiriendo que estas ciclinas no sólo regulan la actividad de las CDKs, sino que también tienen un efecto directo sobre el sustrato pRb [150]. Se hipotetiza, por otro lado, que la ciclina D1 es también objeto de regulación de pRb [151]. De esta manera, después de que la inactivación de pRb es iniciada, se liberan los factores de transcripción y, al mismo tiempo, se estimula al promotor de la ciclina D1 [152].

**2.2. Ciclina A:** La ciclina A se sintetiza en G1 tardía. Se le asignan dos papeles fundamentales en el ciclo celular: uno en G2 uniéndose a CDK1 y el otro en fase S formando complejos con CDK2. El complejo formado por CDK2 y la ciclina A interviene en la iniciación de la síntesis de ADN, y además permite el pasaje de las células a través de la fase S [153, 154].

**2.3. Ciclina B:** La ciclina B, involucrada en el control de G2 y Mitosis, es sintetizada en las fases S y G2 del ciclo celular, durante las cuáles se une a CDK1. El complejo ciclina B/CDK1, inicialmente llamado "*Factor Promotor de Maduración*", hoy conocido como "*Factor promotor de Mitosis*" (MPF), promueve la transición G2/M y el paso a través de la fase M en todos los eucariotas estudiados [155].

La expresión ectópica de ciclina B en fibroblastos de rata resulta en un incremento de la actividad quinasa de CDK1, pero no produce cambios en la velocidad de progresión del ciclo celular [146]. La activación de CDK1 juega un papel clave en el rearrreglo de estructuras celulares asociado a la mitosis de células de mamíferos [156].

### **3. Regulación de los complejos ciclina-CDK**

La actividad de los complejos ciclina/CDK está sujeta a varios niveles de control. Primero, las ciclinas sólo están disponibles en el momento apropiado del ciclo celular debido a un proceso de control de su abundancia. Segundo, las CDKs son reguladas post-transcripcionalmente mediante fosforilación reversible por fosfatasas y quinasas activadoras de CDKs (como CAK, que es en sí misma un complejo ciclina H/CDK7 regulado por fosforilación). Finalmente, los complejos ciclina/CDK pueden interactuar con pequeñas proteínas **inhibidoras de la actividad quinasa** (CKIs).

**3.1. Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKIs):** Teniendo en cuenta la homología de secuencia, los CKIs de mamíferos pueden ser agrupados en 2 categorías: Ink 4 y Cip/Kip.

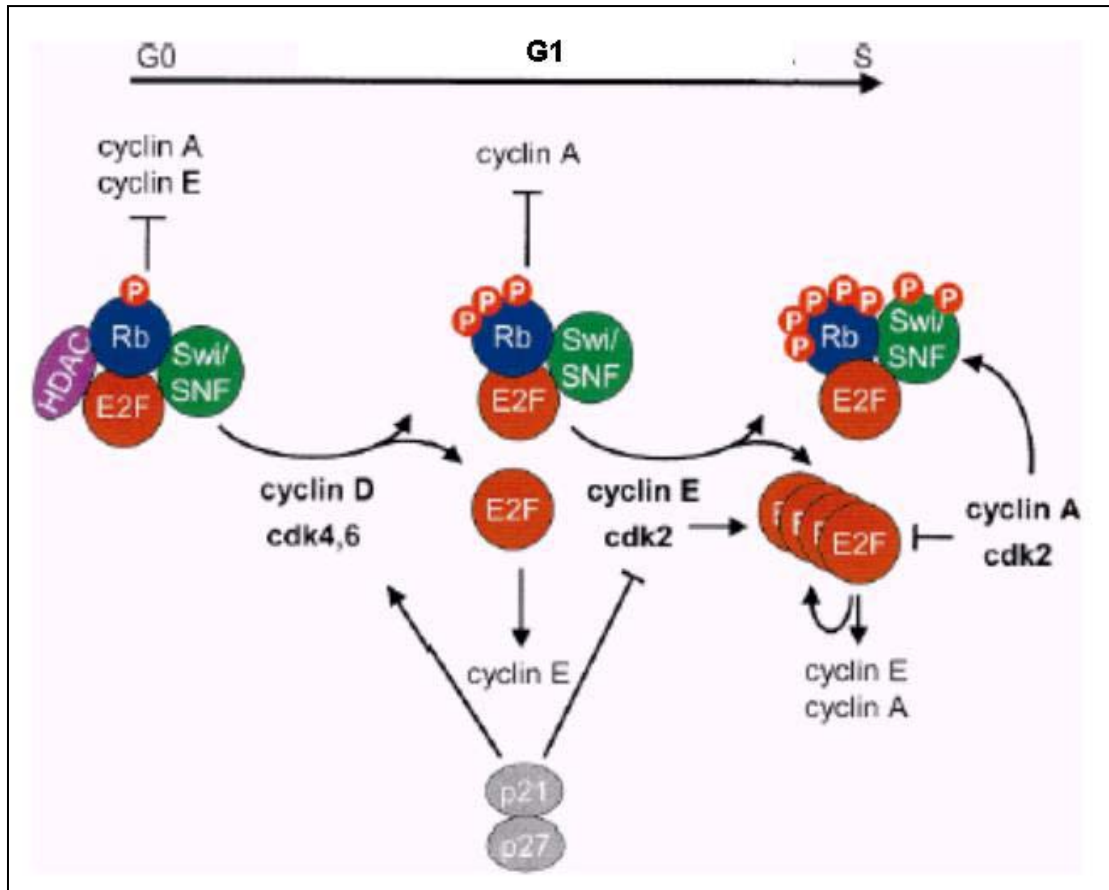
**3.1.1. Familia Ink 4:** Está constituida por cuatro proteínas: p16, p15, p18 y p19 [157-159] que forman complejos sólo con CDK4 y/o CDK6 y ciclinas tipo D [157]. Los miembros de la familia Ink 4 se unen a las CDKs e impiden su activación. Particularmente, los sitios de unión a p16 y a las ciclinas sobre las CDKs no se superponen, por lo tanto p16 puede unirse a los complejos ciclina/CDK preformados [160]. El desplazamiento de la unión de la ciclina es indirecto y debido a cambio alostéricos que alteran el sitio de unión, introducidos por la interacción de los CDKIs con las CDKs [161].

**3.1.2. Familia CIP/Kip:** Incluye tres proteínas: p21 (WAF1/Cip1/SDI1), p27 (Kip1) y p57 (Kip2). Poseen un espectro más amplio de acción, ya que interactúan con los complejos de ciclinas D, A y E, por lo que se las denominó “inhibidores universales”. Estas proteínas actúan a tres niveles: a- Inhiben complejos ciclina/CDK preformados; b- Impiden la fosforilación activante por CAK; c- Se unen e inhiben complejos ciclina-CDK activos (por cambios conformacionales de la hendidura catalítica) [162, 163].

Estudios más recientes demostraron que los miembros de esta familia son potentes inhibidores de CDK2 dependiente de ciclina A y E, pero serían reguladores positivos de quinasas dependientes de ciclina D [164]. Cuando se forman los complejos ciclina D-CDK4/6 se produce la redistribución de los CDKIs p21 y p27, desplazándose desde los complejos ciclina E-CDK2 hacia ciclina D-CDK4/6 (Figura 11) [165]. Se ha sugerido que la principal función de la ciclina D1 en el control del ciclo celular sería precisamente la redistribución de los CDKIs [166, 167].

p21 fue descubierto independientemente como una proteína inducida por el supresor de tumor p53 (WAF 1) [168], como un inhibidor de las CDKs (CIP 1) [169], y como una proteína inducida en células senescentes (SDI 1) [170].

p27 tiene 42% de identidad con p21 en su región amino terminal [171]. Se estableció que este inhibidor cumpliría un papel en el arresto del crecimiento producido por contacto célula a célula, o por el tratamiento con TGF- $\beta$  o AMPc [171, 172].



**Figura 11. Control de la progresión de la fase G1 del ciclo celular**

El complejo ciclina D1/CDK4,6 funciona secuestrando a los inhibidores de ciclina E/CDK2 (p21 y p27), permitiendo así que ciclina E/CDK2 continúe fosforilando a Rb. Esto resulta en la acumulación del E2F libre en G1 tardía, desreprimiéndose el gen de la ciclina A e iniciándose la fase S.

#### 4. Proteínas reguladoras del ciclo celular y su relación con cáncer

El cáncer es una enfermedad resultante de la alteración de determinados genes. Debido a que los mayores eventos regulatorios que conducen a la proliferación en células animales ocurren en la fase G1 del ciclo celular, la alteración de la expresión de las ciclinas y de la activación de las CDKs en esta fase, sería un proceso clave en la oncogénesis [173].

**4.1. Ciclinas:** El nexo entre el cáncer y las ciclinas surge del descubrimiento de la expresión alterada de dos ciclinas en tumores [158]: a- El gen de la ciclina A es el sitio de integración de un fragmento del genoma del virus de la hepatitis B en un carcinoma hepatocelular [174]; b- En algunos tumores de paratiroides la



ciclina D1 está sobreexpresada debido a rearrreglos cromosómicos, al translocarse el gen de la ciclina al *enhancer* del gen de la hormona paratiroidea [175]. Numerosos trabajos muestran alteraciones de las ciclinas asociadas con cáncer. Así, los genes de las ciclinas se encuentran amplificados, involucrados en translocaciones cromosómicas asociadas a neoplasias, localizados en sitios adyacentes a los de integración viral, o cooperando con oncogenes conocidos para promover la tumorigénesis [176].

El gen de la ciclina D1 se encuentra amplificado aproximadamente en un 15% y sobreexpresado en el 50% de los carcinomas mamarios primarios humanos [177]. Wang y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de la ciclina D1 en células mamarias de ratones transgénicos resulta en la proliferación anormal de dichas células y en el desarrollo de adenocarcinomas [178]. Según Musgrove y colaboradores la ciclina D1 es necesaria, limitante de la velocidad y suficiente para la progresión de G1 en células de cáncer mamario [179]. Otros trabajos correlacionan la expresión aumentada o la aparición de formas aberrantes de ciclina E con cáncer mamario, tanto humano como murino [179, 180]. Se ha sugerido que la determinación de la expresión de la ciclina E serviría como marcador de pronóstico en cáncer de mama [181].

En células de cáncer mamario no sólo se ha detectado la expresión aumentada o aberrante de las ciclinas, sino también fuera de término. Estudios comparativos demostraron que los niveles basales de las ciclinas A y B en la fase G1 eran significativamente mayores en las células tumorales que en las células normales, donde prácticamente eran indetectables. Por lo tanto, se propuso que la aparición de estas ciclinas en G1 podría contribuir a la pérdida del control del crecimiento en cáncer de mama [182]. Otros estudios confirmaron que en algunas líneas celulares de cáncer mamario las ciclinas E y B también se encuentran expresadas durante fases del ciclo celular en las que deberían estar ausentes [183, 184].

**4.2. CDKs:** Si bien existen algunas evidencias de alteraciones en la expresión de las CDKs en líneas celulares de cáncer, los resultados son contradictorios, y las consecuencias funcionales de estos cambios aún no fueron completamente definidas [185].

En el caso particular de CDK4, Miliani de Marval y colaboradores demostraron que la expresión forzada de esta quinasa en la epidermis de ratones transgénicos da por resultado la hiperproliferación de las células de la capa basal, y la hipertrofia e incremento del grosor de la epidermis [186]. Además, cuando se realizó una inducción tumoral por métodos químicos, estos ratones presentaron una alta tasa de progresión maligna [187]. Por otro lado, la expresión de una forma mutante de CDK4 insensible a la inhibición de p16 generó un amplio espectro de tumores, siendo los más comunes los linfomas, los tumores endocrinos y los hemangiosarcomas [188, 189]. Otra serie de estudios indicaron que la pérdida de la expresión de CDK4 en ratones transgénicos Myc genera una completa inhibición del desarrollo tumoral [190]. El papel de CDK4 en el proceso neoplásico fue también sugerido por el hecho de que esta quinasa se encuentra amplificada y/o sobreexpresada en glioblastomas humanos [191], como así también en carcinomas de mama esporádicos [192] y en sarcomas [193]. Sumado a esto, mutaciones en CDK4 fueron encontradas en pacientes con melanoma familiar [194, 195].

**4.3. CDKIs:** Estas proteínas son consideradas posibles **supresores de tumores**. La inactivación de las mismas podría tener consecuencias similares a la sobreexpresión de las ciclinas [185].

p16 es uno de los supresores tumorales mejor caracterizados, particularmente asociado al melanoma familiar. Además de encontrarse alterado en esta patología, el gen de p16 sólo, o junto al de p15, apareció deletado en un importante número de líneas celulares, incluyendo células de cáncer mamario [196-198] y en baja pero significativa frecuencia en tumores primarios [173].

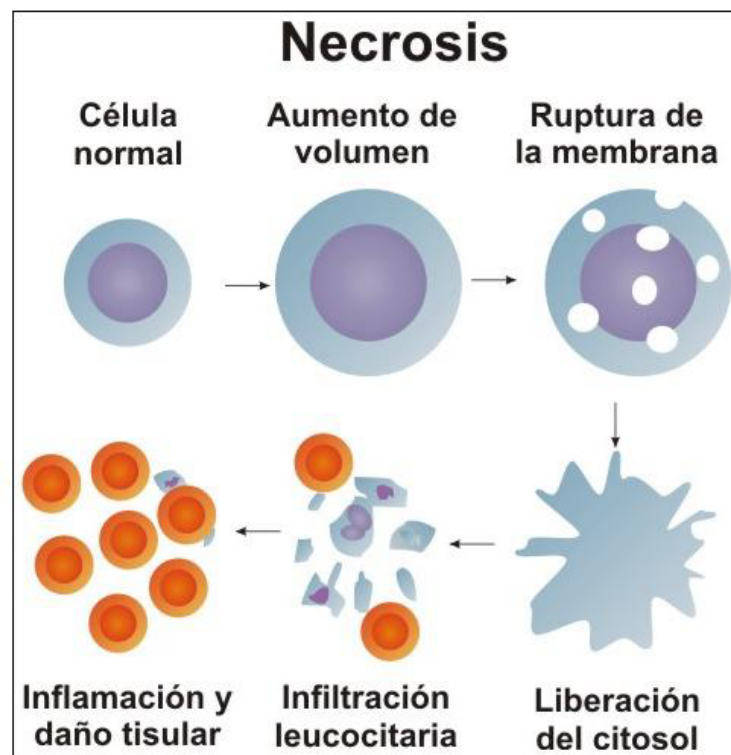
Por otro lado, se han observado niveles bajos de p21 en muchas células transformadas, sin embargo no hay evidencias hasta el momento de mutaciones en el locus correspondiente al gen humano.

## Muerte celular

Existen dos patrones principales de muerte celular según sea la causa y el contexto en el que ésta acontece: **necrosis** y **apoptosis**.

### 1. Necrosis

Es el resultado final del daño celular extenso causado por estímulos nocivos, tales como la isquemia, infecciones, toxinas, agentes físicos y químicos y reacciones inmunológicas. Los cambios morfológicos de la necrosis afectan a grupos de células e incluyen hinchazón y lisis celular, coagulación de proteínas citoplasmáticas y ruptura de organelas, acompañados de una reacción inflamatoria por liberación al medio intercelular del contenido citoplasmático y nuclear (Figura 12). Estos cambios resultan de dos procesos recurrentes: 1. La degradación enzimática progresiva; 2. La desnaturalización de proteínas, consecuencia del disturbio irreversible de mecanismos homeostáticos celulares.



### Figura 12. Características de la célula necrótica

La figura esquematiza la serie de modificaciones celulares que sufre la célula durante la necrosis. Las mismas incluyen: hinchazón, ruptura de membranas, liberación del citosol y reacción inflamatoria.

## 2. Apoptosis

El término, del griego apo=hoja, ptosis=caída, fue introducido por Kerr en sus trabajos pioneros [199], y se refiere a una forma de muerte celular activa y genéticamente programada, que evoluciona a través de una secuencia de eventos coordinados con características morfológicas y bioquímicas definidas. Este mecanismo de autodestrucción celular ocurre en procesos fisiológicos normales tales como la embriogénesis, la involución de los tejidos hormono-dependientes (atresia folicular, involución de la mama lactante, atrofia prostática siguiente a la castración), la homeostasis en el control de poblaciones celulares (recambio celular del intestino, tejidos linfoides), la delección de células T autorreactivas y el envejecimiento.

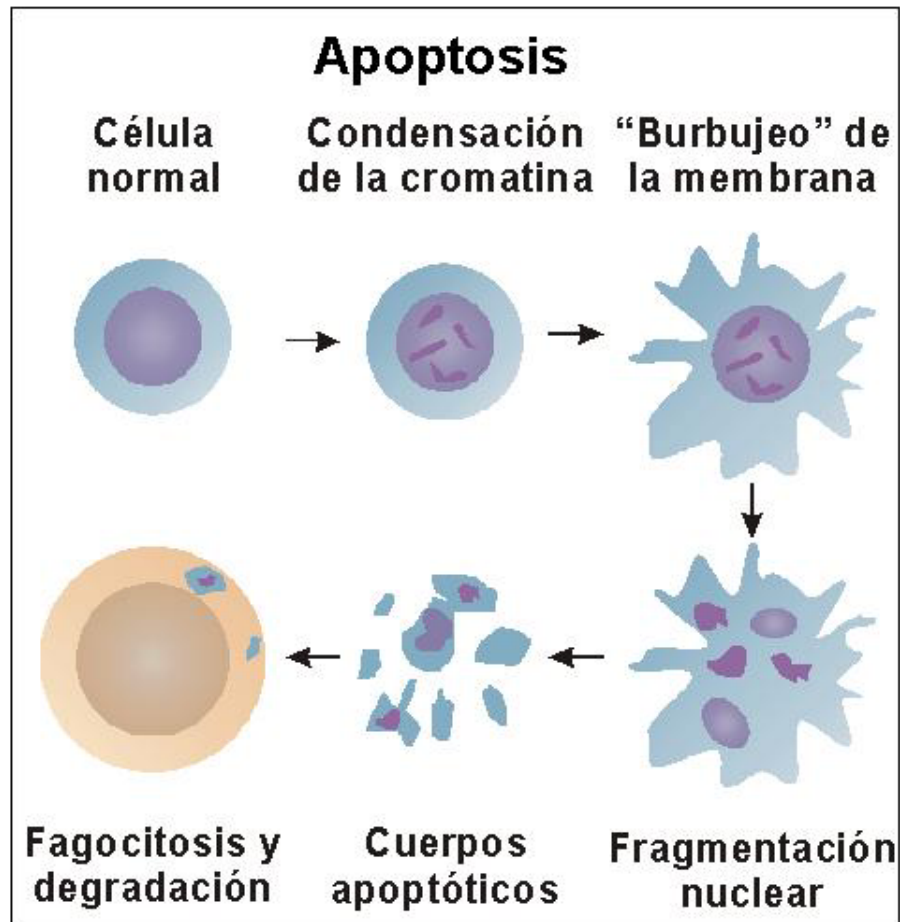
Sin embargo, no sólo los estímulos fisiológicos sino también los patológicos pueden iniciar o inhibir la apoptosis. Algunos estímulos nocivos (calor, radiación, drogas citotóxicas, hipoxia) son capaces de producir necrosis a altas dosis o de inducir apoptosis si la agresión es menos intensa. Por lo tanto, la apoptosis también participa como un evento crítico en respuesta al daño celular y se la observa en:

- Daño al ADN: La formación de brechas en la doble cadena del ADN puede inducir apoptosis por un mecanismo dependiente de la fosfoproteína nuclear p53.
- Daño de las membranas celulares: Particularmente la membrana plasmática con activación de esfingomiosina ácida y generación de ceramida, un segundo mensajero que altera la susceptibilidad a la apoptosis.
- Daño mitocondrial: La despolarización de la membrana mitocondrial se asocia a la liberación de factores pro-apoptóticos (factor activador de proteasas apoptóticas -Apaf 1 y citocromo c).
- Infecciones virales: Muchos virus interactúan con las vías de la apoptosis de las células infectadas mediante la producción de proteínas anti-apoptóticas.

**2.1. Características morfológicas:** Las características morfológicas de la apoptosis, que fueron extensamente descritas por Kerr [199, 200], incluyen (Figura 13):

- Separación de las células adyacentes y condensación del citoplasma.
- Disminución del volumen.
- Condensación de la cromatina nuclear (pyknosis).
- Fragmentación nuclear (cariorrhexis).
- “Burbujeo” de la membrana plasmática (*membrane blebbing*).
- Redondeamiento celular.
- Fragmentación del citoplasma en múltiples y pequeños cuerpos apoptóticos, constituidos por cromatina condensada, organelas citoplasmáticas, mitocondrias y lisosomas intactos, rodeados por membranas íntegras.
- Endocitosis y degradación de los cuerpos apoptóticos por células vecinas o por fagocitos profesionales.

La muerte celular por apoptosis transcurre con conservación de las membranas y los lisosomas, sin la liberación del contenido citoplasmático ni de las enzimas lisosomales, a diferencia de la necrosis, evitando así la respuesta inflamatoria [199]. En la Tabla V se muestran algunas de las diferencias entre necrosis y apoptosis.



**Figura 13. Características de la célula apoptótica**

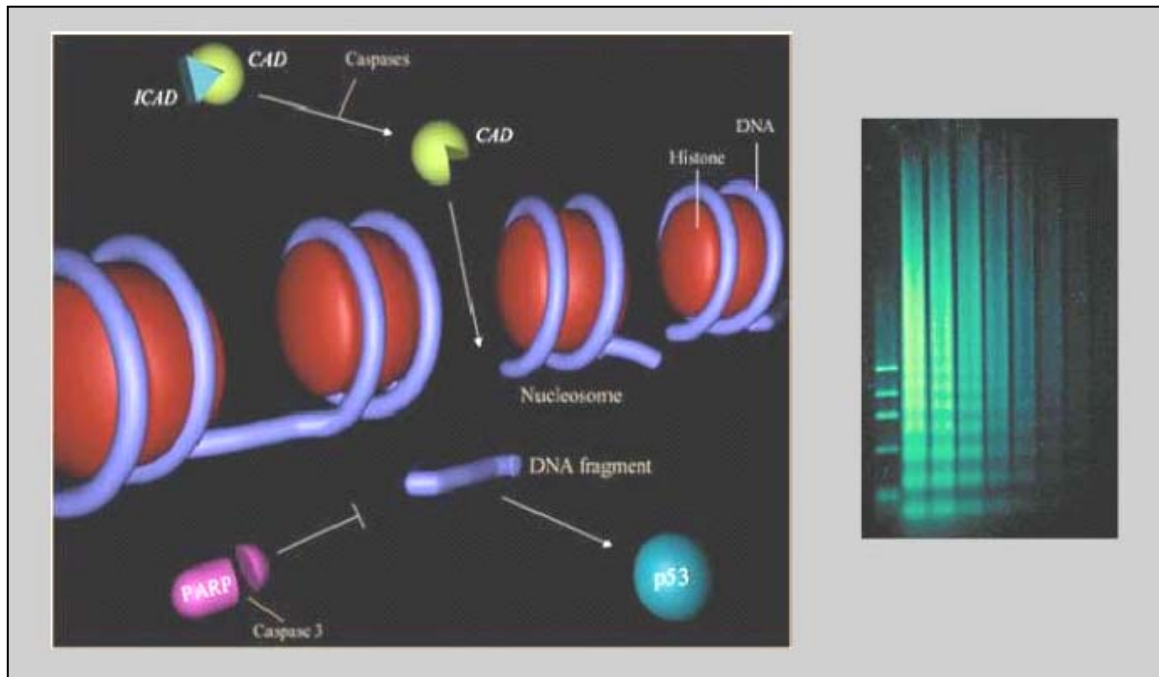
Los cambios característicos de la célula apoptótica incluyen la condensación de la cromatina, el “burbujeo” de la membrana plasmática, la fragmentación del núcleo y la liberación del citoplasma, organelas y fragmentos del núcleo, en forma de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son endocitados por las células vecinas, impidiendo la liberación del contenido intracelular.

**Tabla V. Necrosis versus apoptosis**

	<b>APOPTOSIS</b>	<b>NECROSIS</b>
<b>CAUSAS</b>	Privación de factores de sobrevivencia Influencia hormonal Sistema inmune Citotoxicidad leve Anoxia leve	Citotoxicidad fuerte Anoxia fuerte Daño físico severo Daño químico severo
<b>PRIMEROS CAMBIOS MORFOLÓGICOS</b>	Disminución de tamaño	Aumento de tamaño
<b>CAMBIOS NUCLEARES</b>	Condensación Fragmentación	Aumento de tamaño
<b>CAMBIOS EN LA MEMBRANA</b>	Protusiones Flip flop de fosfatidil serina	Alisamiento y lisis
<b>CAMBIOS MITOCONDRIALES</b>	Pérdida del potencial transmembrana	Hinchazón Desorganización de la estructura
<b>CAMBIOS BIOQUÍMICOS</b>	Activación de proteasas Activación de nucleasas Utilización de ATP Acidificación leve	Pérdida de ATP Acidificación

**2.2. Características bioquímicas:** La primera etapa de la apoptosis parece correlacionarse con el colapso de la cromatina contra la periferia nuclear [201]. Las endonucleasas clivan progresivamente al ADN genómico generando inicialmente fragmentos de 50 a 300 Kb [202, 203] y luego fragmentos de 180 pb o múltiplos, formándose así la típica escalera de ADN al ser separados por electroforesis en geles de agarosa (Figura 14). Las nucleasas involucradas no fueron exactamente identificadas, pero parte del clivaje observado podría

deberse a la topoisomerasa II [204-206]. El clivaje internucleosomal ha sido adjudicado a distintas enzimas, especialmente DNasa I [207] y DNasa II [208]. Sin embargo, se ha descrito apoptosis de morfología típica en células con aparente falta de actividad nucleasa endógena, así como también en células con ausencia de la “escalera” oligonucleosomal, sugiriendo otras vías de muerte celular programada [209].



### Figura 14. Fragmentación del ADN por nucleasas de restricción

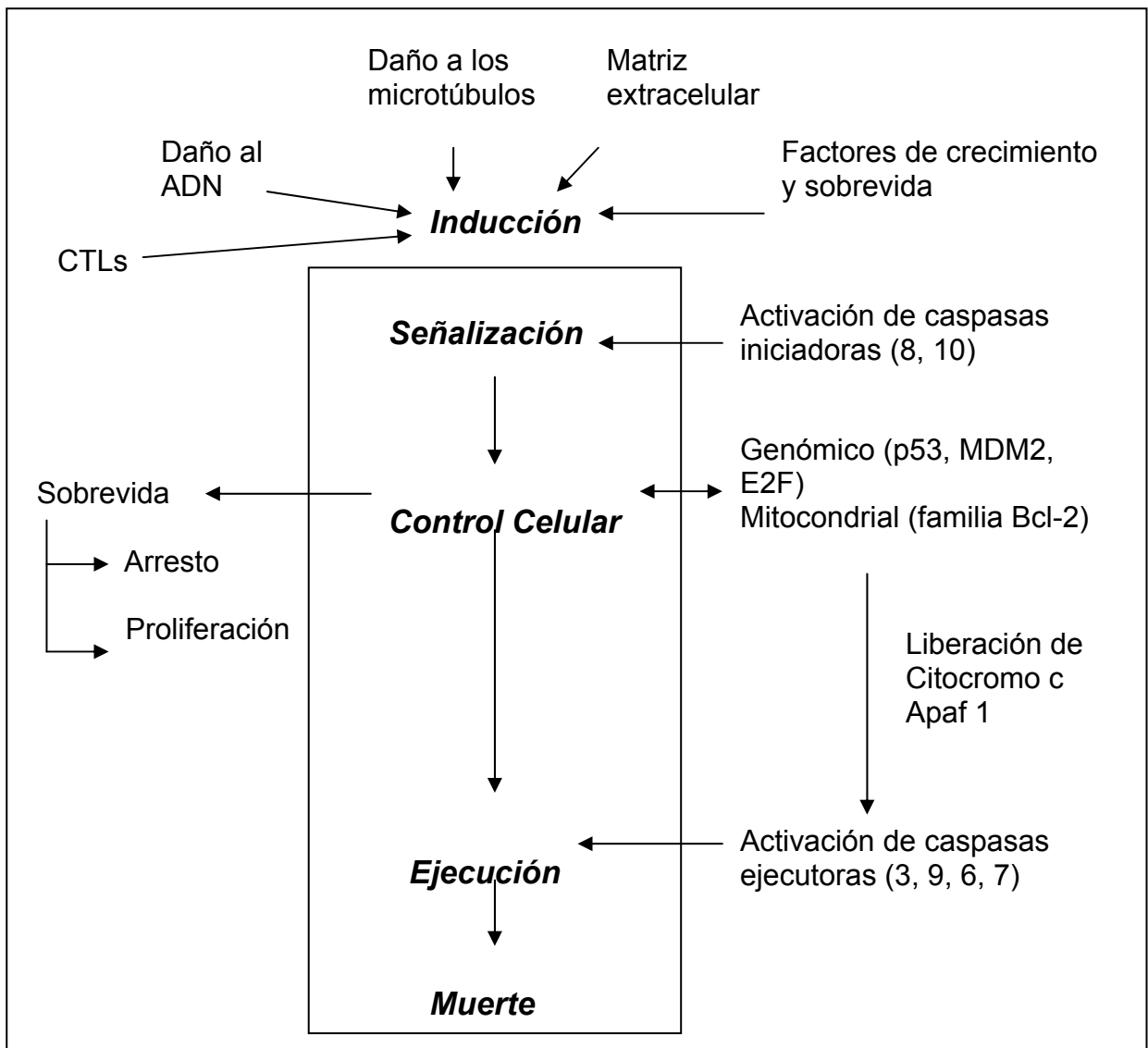
A nivel molecular, la apoptosis puede ser detectada por la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática en un ensayo de fluorescencia, por la activación de proteasas específicas en ensayos enzimáticos o por la degradación oligonucleosomal del ADN.

**2.3. Mecanismos:** Inicialmente los mecanismos genéticos y moleculares de la apoptosis fueron caracterizados mediante estudios en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [210]. Se comprobó la existencia de dos genes (*ced 3* y *ced 4*) necesarios y suficientes para inducir la apoptosis, así como también otro que la inhibe (*ced 9*) [211, 212]. La importancia de este programa se hizo evidente cuando se estableció la homología funcional y estructural entre *ced 3* y *ced 9* con los genes de mamíferos que codifican para caspasas y Bcl-2 respectivamente [213, 214].



La apoptosis evoluciona en tres etapas secuenciales que duran entre 12 y 24 horas [215] (Figura 15):

- Una primera etapa, o de **inducción**, en la cual la célula recibe un estímulo inductor de la apoptosis y desencadena una cascada de señalización que dirigirá a la célula a iniciar la apoptosis. Esta etapa es regulable, y la célula “decidirá” si sobrevive o continúa con el proceso apoptótico.
- Una etapa **efectora**, en la cual el destino celular se vuelve irreversible.
- Una etapa de **degradación** final.



**Figura 15. Etapas de la apoptosis**

Esquema de la etapas inductora, efectora y degradativa de la apoptosis.

**2.3.1. Etapa de inducción:** Incluye las vías de señalización iniciadoras y los mecanismos de control e integración que determinan la evolución.

*Vías de señalización:* Diversas señales originadas dentro y fuera de la célula, o la falta de las mismas, influyen en la decisión de morir, incluyendo: el daño celular, los factores de crecimiento, las interacciones celulares y las hormonas [216-218]. Estas señales pueden ser transmitidas mediante receptores a moléculas reguladoras intracelulares o dirigidas más directamente a blancos presentes en la célula. Mientras que algunas vías son universales, otras son específicas del tipo celular [219]. Entre los reguladores positivos de la apoptosis ubicados en la membrana plasmática se encuentran los miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) como Fas/CD 95/apo-1 y TNFR-1 [220, 221]. Los factores de crecimiento, las hormonas y las citoquinas actúan como factores de supervivencia, generando una cascada de transducción de señales inhibitorias del programa de muerte celular preexistente. Las vías que involucran señales intracelulares serían las utilizadas por los agentes físico-químicos o por los glucocorticoides a través de los receptores nucleares.

*Mecanismos de control e integración:* Se trata de proteínas específicas que conectan las señales de muerte al programa de ejecución. Así, por ejemplo, en el modelo Fas-Fas ligando y TNFR1 la transmisión directa de la señal es llevada a cabo por proteínas adaptadoras específicas como FADD (*Fas Associated Death Domain protein*) y TRADD (*TNFR Associated Death Domain protein*) respectivamente [222, 223].

Otro grupo importante de proteínas es el correspondiente a la familia Bcl-2, que regulan la permeabilidad mitocondrial. Algunas de estas proteínas promueven la apoptosis, como Bax y Bad, mientras que otras son anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-xl. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. Su efecto anti-apoptótico es llevado a cabo por vía directa previniendo el aumento de permeabilidad mitocondrial y la consecuente liberación del citocromo c [224, 225], o por un efecto indirecto mediado por el secuestro de otras proteínas, como el factor activador de proteasas pro-apoptóticas (APAF-1) [226, 227].

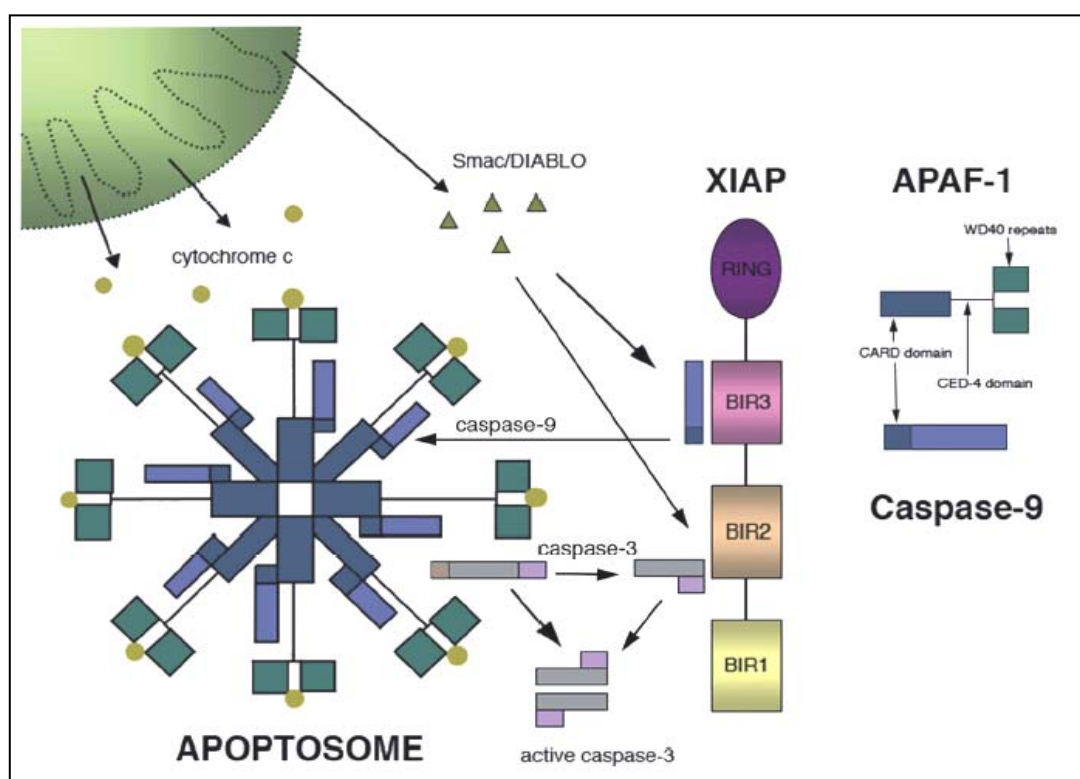
**2.3.2. Etapa de ejecución:** Es conducida por una cascada de proteasas altamente conservadas, conocidas como caspasas (contienen cisteína en su sitio activo y clivan después de un residuo del ácido aspártico en el extremo C-terminal). Esta familia incluye más de 10 miembros, que se presentan como precursores inactivos y se activan por el clivaje autocatalítico o por otras caspasas. Estas proteasas producen una degradación parcial que modifica la actividad de múltiples proteínas, entre las cuales se encuentra PPARP, también muy utilizada como un marcador de la apoptosis [228]. Debido a esta proteólisis parcial, la apoptosis es también descrita como **muerte por miles de cortes**. Funcionalmente, se consideran dos grupos:

- Caspasas iniciadoras, como caspasa 9 y caspasa 8;
- Caspasas ejecutoras, como caspasa 3 [229]. Estas caspasas causan la disrupción del citoesqueleto debido al clivaje de sus proteínas y las de la matriz nuclear [230]. Otros sustratos nucleares de las caspasas incluyen endonucleasas y proteínas comprometidas en la transcripción, en la replicación y en la reparación del ADN [231]. De este proceso surgen las características morfológicas y bioquímicas que caracterizan a la apoptosis.

**2.3.3. Etapa de degradación:** Las células apoptóticas y sus fragmentos presentan moléculas marcadoras sobre su superficie que facilitan su reconocimiento y fagocitosis por células adyacentes y macrófagos.

**2.4. El apoptosoma:** Como se dijo, las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la formación de poros en la membrana mitocondrial inducida por diferentes señales de muerte que convergen en esta organela [232]. Cuando el programa de muerte celular es iniciado, el citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas son liberadas de la mitocondria [233]. En el citosol, el factor activante de proteasas apoptóticas-1 (Apaf-1), la procaspasa-9, y el citocromo c/dATP forman el complejo conocido con el nombre de **apoptosoma**. Apaf-1 posee un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) al que se une la procaspasa-9, un *loop* central que une ATP, y el C-terminal que interactúa con el citocromo c [234]

(Figura 16). La oligomerización de Apaf-1 lleva a la autoactivación de la caspasa-9, que a su vez cliva a la caspasa-3, y desencadena la cascada que conduce a la muerte celular [235]. La Figura 16 muestra la estructura del apoptosoma, que por su morfología y función recibe el nombre de **rueda de la muerte**. En esta estructura participan también los inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP) [236], tales como XIAP, cIAP-1 y cIAP-2. Por medio de secuencias conservadas pueden unirse a las caspasas-9 y -3 procesarlas e inhibirlas. Sin embargo, los inhibidores más efectivos en la vía del apoptosoma parecen ser los miembros de la familia Bcl-2 [237], que antagonizan la liberación del citocromo c y de otras moléculas mitocondriales, evitando por lo tanto la formación del apoptosoma [238].



**Figura 16. El apoptosoma, la “rueda de la muerte”**

Apaf-1 junto con la procaspasa-9 forma la rueda que da forma al apoptosoma. El citocromo c se une a Apaf-1 y conduce a la muerte celular por la activación de la caspasa-3. Las IAPs pueden contraatacar la activación de las caspasas, aunque este efecto es disminuido por las proteínas Smac/Diablo liberadas de la mitocondria.

**2.5. Apoptosis y cáncer:** El papel fundamental de la regulación de la apoptosis en la generación del cáncer es un concepto logrado mucho tiempo después que otros de igual importancia, como ser las capacidades migratorias o proliferativas de la célula tumoral. La tardanza se debió principalmente a un concepto tan generalizado como errado: que el crecimiento de la masa tumoral se debía mayormente a un aumento en la capacidad proliferativa. Hoy en día se acepta que la tasa neta de crecimiento tumoral es la diferencia entre la tasa mitótica y la apoptótica.

La capacidad de resistir a la apoptosis es una de las características fundamentales de la mayoría, o tal vez de todos los tipos tumorales. Esta resistencia puede ser adquirida a través de una gran variedad de estrategias. Una de las más comunes es la pérdida de reguladores pro-apoptóticos por medio de mutaciones que involucran al gen supresor tumoral p53 [239]. Más del 50% de los cánceres humanos poseen una proteína p53 no funcional, evitándose así la apoptosis inducida por daño en el ADN [240] .

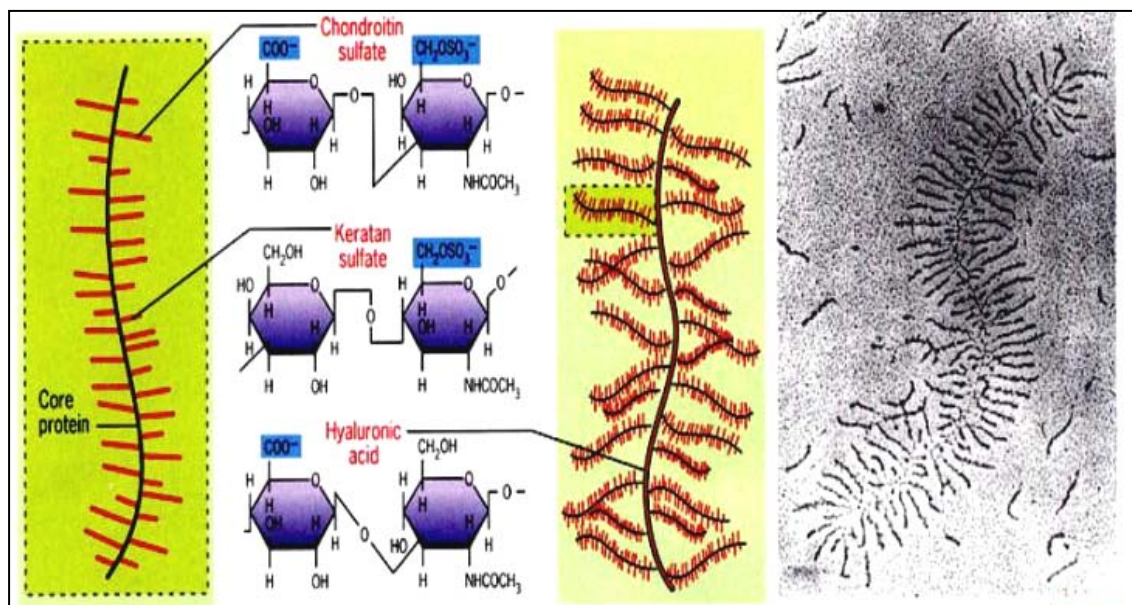
Si bien el proceso apoptótico es común a todas las células, en algunos casos el final no es el esperado. La mayoría de las células transformadas muestra uno o más mecanismos de inhibición de la apoptosis alterados. En las células tumorales, por lo general, se observa una inducción –o aumento– de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Ras y PI3K, o inhibición de la expresión de proteínas pro-apoptóticas, como el receptor Fas. De hecho, Bcl-2 fue descubierto a raíz de su sobreexpresión en células de linfoma folicular B [241]. Si bien son muchos los ejemplos de cambios en la expresión de proteínas que modulan el proceso apoptótico en las células tumorales, notoriamente la expresión de las caspasas se mantiene en mayor o menor medida en todos los tumores estudiados, por lo que se supone que tendrían alguna función tan necesaria como desconocida.

## IV- PAPEL DE LOS PROTEOGLICANOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

### Aspectos generales

Los **proteoglicanos** son macromoléculas que se encuentran en todos los tejidos conectivos, las matrices extracelulares y sobre la superficie de la mayoría de los tipos celulares [242, 243]. Estas moléculas presentan un *core* proteico al cual se unen covalentemente una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales son polímeros lineales repetitivos de disacáridos. Usualmente uno de los azúcares es el ácido urónico y el otro es N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina. Una proporción variable de estos azúcares se encuentra normalmente sulfatada. Los GAGs pueden ser clasificados en cuatro clases principales (Figura 17), basadas en el tipo de azúcar:

- Heparán sulfatos (HS) y heparina;
- Condroitín sulfato y dermatán sulfato;
- Queratán sulfato;
- Ácido hialurónico (AH).



**Figura 17. Principales tipos de proteoglicanos**

Los proteoglicanos están formados por un core proteico al que se unen distintas cadenas de GAGs. En la figura puede verse la estructura del queratán sulfato, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

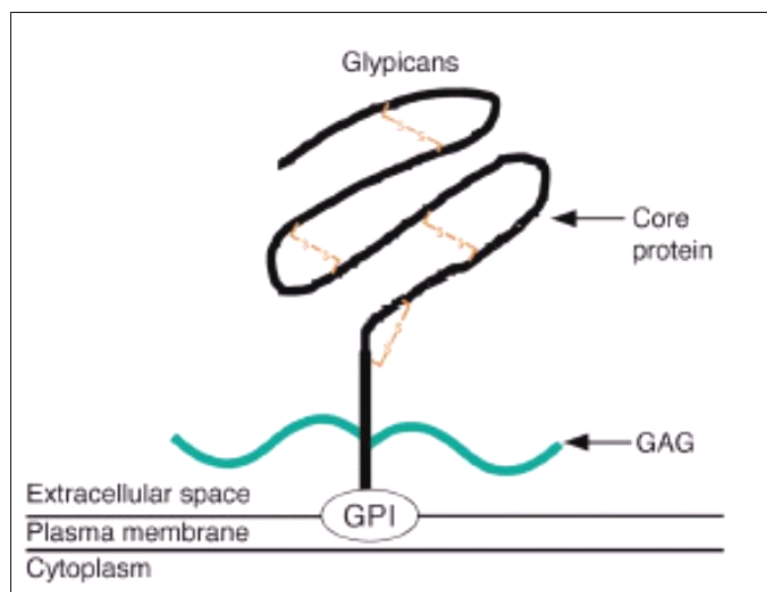
Los proteoglicanos pueden formar parte de la estructura de la membrana plasmática, a la que se unen por distintos tipos de anclajes. De estos proteoglicanos se conocen varias familias, entre ellas los **proteoglicanos de heparán sulfato**:

### **Proteoglicanos de Heparán sulfato unidos a la membrana celular (HSPGs)**

Durante los últimos 10 años ha sido claramente establecido que las células no responden a concentraciones fisiológicas de FGF2 si las cadenas HS son eliminadas de la superficie celular [244, 245]. También existen evidencias de que otros factores de crecimiento (Wnts, otros FGFs, VEGF, HB-EGF) necesitan las HS para unirse a sus receptores de alta afinidad a concentraciones fisiológicas [246-249]. Algunos investigadores han propuesto, además, que los HSPGs pueden actuar como correceptores para los factores de crecimiento [244, 250], aunque también han sido sugeridos modelos alternativos [251].

#### **1. La familia de los glipicanos**

Los **glipicanos** son un tipo de proteoglicano de la familia HSPG que se asocia a la membrana celular mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) [252-254] (Figura 18). El core proteico presenta 13 cisteínas y los sitios consenso para la inserción de GAGs se hallan altamente conservados [242, 243, 255].



**Figura 18. Diagrama esquemático de los glicanos**

En el esquema pueden verse las cadenas GAGs y el anclaje GPI a la membrana celular que presentan estos proteoglicanos.

Hasta el momento se han identificado seis tipos de glicanos en mamíferos (Tabla VI) y dos en *Drosophila*.

**Tabla VI. Tipos de glicanos y su patrón de expresión**

NOMBRE	DESIGNACIÓN ORIGINAL	EXPRESIÓN EN EL EMBRIÓN	EXPRESIÓN EN EL ADULTO	REFERENCIA
<b>Glicano 1</b>	Glicano	Hueso, médula ósea, músculo, epidermis, riñón	Mayoría de los tejidos	[252, 256-258]
<b>Glicano 2</b>	Cerebroglicano	Sistema nervioso	No detectado	[259]
<b>Glicano 3</b>	OCI-5	Mayoría de los tejidos	Ovario, glándula mamaria, mesotelio, pulmón, riñón	[260, 261]
<b>Glicano 4</b>	K-glicano	Cerebro, riñón, pulmón	Mayoría de los tejidos	[254, 262, 263]
<b>Glicano 5</b>		Cerebro, pulmón, hígado, riñón, extremidades	Cerebro	[255, 264]
<b>Glicano 6</b>		Principales tejidos, incluyendo riñón e hígado	Principales tejidos, incluyendo ovario, riñón, hígado e intestino	[265]



El tamaño del core proteico de los glipicanos es semejante (60-70 kDa), y, como es de esperar, poseen en su N-terminal una señal peptídica secretoria, además de un dominio hidrofóbico necesario para el agregado del ancla GPI en el extremo C-terminal. El grado de homología en los aminoácidos de los glipicanos es moderado [265], pero la posición de los 13 residuos cisteína está altamente conservada, sugiriendo que la estructura tridimensional de los glipicanos es muy similar. Otra característica común para todos los glipicanos es la localización de los sitios de inserción para las cadenas HS, los cuales parecen estar restringidos a los últimos 50 aminoácidos del C-terminal, colocando a las cadenas cerca de la membrana celular [265].

Los glipicanos se expresan principalmente durante el desarrollo, presentando cambios en sus niveles de expresión estado- y tejido-específico. Esto sugiere el importante papel de los glipicanos en la regulación de la morfogénesis [261, 266-269].

## 2. Los glipicanos en *Drosophila*

En *Drosophila* fueron encontrados dos genes que codifican para glipicanos. Una combinación de estudios genéticos y moleculares ha revelado importantes características de las funciones de estos genes durante el desarrollo. El gen de glipicano mejor caracterizado en *Drosophila* es el *división anormalmente delayed (dally)*, que fue descubierto por sus efectos sobre el patrón de división celular en el sistema visual [270]. Como su nombre lo indica, las mutantes *dally* presentan fallas en la progresión del ciclo celular de un conjunto de células del ojo y cerebro. La alteración de este gen produce efectos morfológicos sobre varios tejidos entre los que afectan el desarrollo de los ojos, antenas, alas y órganos genitales [271].

La caracterización bioquímica de Dally mostró que, al igual que en los vertebrados, es un HS modificado con un ancla GPI [272]. Se localiza en la superficie celular, donde puede actuar como un co-receptor de factores de crecimiento [273].

Se conoce que ciertas mutaciones que afectan la síntesis de HS producen alteraciones sobre la señalización de Wingless (Wg) [274]. Wg es un miembro de la familia Wnt, esencial para una gran cantidad de eventos que ocurren tanto

durante la embriogénesis como en el desarrollo post-embriogénico. El hecho de que la biosíntesis de HS sea crítica para el normal funcionamiento de la actividad Wg sugiere que uno o más proteoglicanos intervienen en los eventos dirigidos por Wg. Así, estudios realizados con mutantes de *dally* demostraron que el glipicano codificado por este gen promueve la actividad Wg [272, 275]. Más recientemente, *dally-like (dly)*, el segundo glipicano de *Drosophila*, ha sido implicado en la señalización mediada por Wg de los embriones [276, 277].

En resumen, los estudios genéticos en *Drosophila* han implicado a los glipicanos en la señalización de factores de crecimiento mediada por las familias Wnt y TGF- $\beta$ . Se sabe que existe una participación selectiva de Dally en estos caminos, dependiendo del contexto celular, pero las bases de esta selectividad son desconocidas. Es importante remarcar que aunque existen evidencias *in vitro* de que los glipicanos pueden unirse y modular la actividad de algunos miembros de la familia FGF [278-280], los estudios genéticos en *Drosophila* no implicaron a los glipicanos en la regulación de la actividad de ningún miembro de esta familia.

### 3. Glipicano 3 (GPC3) y el síndrome Simpson-Golabi-Behmel

En 1996 Pilia y colaboradores [281] informaron que **GPC3**, un miembro de la familia glipicano, está mutado en pacientes con el síndrome Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), también llamado Síndrome de Dismorfismo de Simpson [282]. GPC3, originalmente llamado OCI5, fue clonado a partir del intestino de rata durante una búsqueda de genes involucrados en la morfogénesis [260]. El análisis por hibridación *in situ* y Northern blot de tejidos de rata y humanos, mostró que GPC3 se expresa ampliamente en el embrión. Particularmente, altos niveles del glipicano fueron encontrados en mandíbula, lengua, esófago, intestino, aorta, tráquea, hígado, pulmones, riñón y hueso denso [261]. Además, la expresión de GPC3 durante el desarrollo es consistente con su importante papel en la interacción epitelio-mesénquima durante la morfogénesis [283]. Este glipicano prácticamente desaparece de los tejidos adultos y su expresión queda confinada a mesotelio, glándula mamaria, ovario y macrófagos [261].

Los pacientes que sufren SGBS, que se halla ligado al cromosoma X, presentan dimorfismos que incluyen macroglosia, hendiduras palatinas, defectos cardíacos, agrandamiento y displasia renal, hernias, pezones supernumerarios, rabo coccígeo, anomalías en las vértebras y en las costillas, sindactilia y polidactilia [284-287].

Muchas de las mutaciones identificadas de GPC3 son mutaciones puntuales o pequeñas deleciones [288-291]. Debido a la falta de correlación entre el fenotipo de los pacientes y la localización de las mutaciones, se ha propuesto que el SGBS es causado por la falta de una proteína GPC3 funcional, con factores genéticos adicionales responsables de las variaciones inter e intra familiares [288]. La generación de ratones que no expresan GPC3 soporta fuertemente esta hipótesis [292]. Estos ratones presentan algunas anomalías similares a las encontradas en los pacientes con SGBS, incluyendo el sobrecrecimiento y la displasia renal. Estas observaciones refuerzan la idea de que GPC3 es un regulador negativo de la proliferación, lo que es consistente con el sobrecrecimiento de los pacientes SGBS y de los ratones deficientes en GPC3.

Algunas de las características clínicas del SGBS, como pezones supernumerarios, sugieren que GPC3 estaría involucrado en la regulación de la supervivencia de las células de la glándula mamaria. Datos más recientes confirman esta hipótesis, ya que la transfección de GPC3 induce apoptosis en las células MCF-7, una línea celular de cáncer de mama GPC3 negativa. Esta inducción no se observó en líneas celulares como los fibroblastos NIH3T3 o las células de tumor colorrectal [293].

El SGBS es una enfermedad fenotípicamente muy similar al síndrome de Beckwith Wiedemann (BWS) [294], mucho mejor estudiado. Como la sobreexpresión del factor de crecimiento insulínico-II (IGF-II) es uno de los principales factores que contribuyen al BWS [295], se ha propuesto que GPC3 regularía negativamente la actividad del IGF-II [296, 297], uniéndose al factor y secuestrándolo o disminuyendo su expresión [288, 298]. Así, la ausencia de GPC3 funcional produciría efectos similares a la sobreexpresión del IGF-II [288]. Esta hipótesis fue posteriormente reforzada por la generación de ratones que sobreexpresan IGF-II [299]. Además de poseer algunas de las características de BWS, estos ratones presentan defectos esqueléticos que son típicos de SGBS.

Es importante notar, sin embargo, que los pacientes con SGBS y los ratones deficientes en GPC3 tienen anomalías en los riñones que no fueron encontradas en los ratones transgénicos IGF-II.

Datos adicionales que apoyan la idea de que GPC3 estaría involucrado en la vía de señalización del IGF-II, provienen del hecho de que ratones deficientes en el receptor del IGF-II (IGF2R) presentan el mismo grado de sobrecrecimiento que los ratones deficientes en GPC3 [300, 301]. El IGF2R es un regulador negativo del IGF-II, ya que se une a este factor e induce su endocitosis y degradación. Aunque se ha establecido que GPC3 no interactúa directamente con el IGF-II [278], es posible que el efecto represor de la actividad IGF-II se verifique indirectamente a través de la interacción con otras moléculas que se hallen asociadas a su señalización, como por ejemplo los receptores o las proteínas de unión al IGF (IGFBPs) [302].

Sin embargo, otros autores afirmaron posteriormente que la acción de GPC3 es completamente independiente de las vías de señalización del IGF [303]. Song y colaboradores [304] acaban de demostrar que GPC3 no sólo no regula de manera directa la traducción de señales del IGF a nivel de las interacciones ligando-receptor, sino que tampoco lo hace de manera indirecta estimulando un camino que interactúe con los componentes río abajo del sistema de señalización del IGF. Puntualmente, los autores focalizaron su atención en el sustrato del receptor de insulina (IRS-1), un miembro clave que puede ser activado por moléculas que no son consideradas componentes intrínsecos del camino de señalización del IGF [305]. Estos investigadores presentaron evidencias genéticas y moleculares que demuestran que GPC3 regula el tamaño del organismo mediante un mecanismo independiente de IRS-1. Se informó que GPC3 modula el camino de Wnt potenciando la señalización no canónica, tanto *in vivo* como *in vitro*, con la concomitante inhibición de la señalización canónica. Fue muy interesante el hallazgo que indicó que las cadenas de HS de GPC3 no fueron requeridas para esta actividad inductora de la señalización no canónica de Wnt ni para la formación de los complejos GPC3-Wnt5a [304].

En resumen, sobre la base de los resultados arriba descritos es razonable especular que, dependiendo del tejido y del estadio de desarrollo, GPC3 puede regular diferentes factores de crecimiento. Esta versatilidad puede

ser debida al hecho de que algunas de las interacciones del glipicano no dependen de sus cadenas HS, como fue recientemente sugerido por evidencias experimentales. Así se demostró que la eliminación de las cadenas no suprime la capacidad represora del crecimiento de GPC3 [293]. Sumado a esto, el hecho de que este glipicano sea secretado [306], hace posible que la forma de GPC3 secretada actúe por mecanismos diferentes a los de la forma unida a membrana.

#### 4. Glipicanos y cáncer

Dada la capacidad de los glipicanos de regular la actividad de los factores de crecimiento y la supervivencia, no resulta sorprendente que informes recientes revelen cambios en la expresión de estas moléculas asociados con el cáncer [307].

Uno de los primeros estudios que estableció la conexión entre los glipicanos y el cáncer mostró que la expresión de GPC1 aumenta significativamente en un importante número de carcinomas pancreáticos [308]. Más aún, la transfección con el oligonucleótido antisentido de GPC1 inhibe la respuesta mitogénica inducida por factores de crecimiento como el FGF2 de las células de carcinoma pancreático en cultivo [308] y disminuye la tumorigenicidad [309]. Aunque el mecanismo por el cual una reducción en la expresión de GPC1 inhibe el crecimiento tumoral aún no ha sido determinado, estos resultados son muy consistentes con los experimentos *in vitro* que mostraron que GPC1 puede facilitar la interacción del FGF2 con su receptor, y estimular así la señalización de este factor [279]. También se encontraron alteraciones en la expresión de GPC1 en cáncer de mama [310].

GPC3 ha sido involucrado también con cáncer. Lin y colaboradores [311] demostraron que la expresión de GPC3 está disminuida en una importante proporción de líneas celulares de cáncer de ovario. La pérdida de la expresión de GPC3 se debería a la hipermetilación de una región del promotor de su gen [312], sin encontrarse mutaciones en la región codificante. Reforzando esta idea, el tratamiento con agentes desmetilantes fue capaz de recuperar la expresión de GPC3. Conjuntamente, los autores demostraron que la expresión ectópica de GPC3 indujo una reducción en la capacidad de formar colonias de algunas líneas de cáncer de ovario [313]. Más recientemente, Murthy y colaboradores

[314] encontraron mediante estudios de expresión diferencial del ARNm, que GPC3 está disminuido en las células de mesotelioma maligno, cuando se lo compara con las células de mesotelio normal. En coincidencia con lo reportado para cáncer de ovario, no se encontraron mutaciones en la secuencia codificante del gen de GPC3, pero la mayoría de las líneas celulares de mesotelioma mostraron metilación aberrante de su promotor. Este estudio confirmó además que la expresión ectópica de GPC3 en las líneas celulares de mesotelioma inhibe su capacidad de formar colonias en medio semisólido.

Otros investigadores generaron resultados opuestos a los arriba descritos. Por ejemplo, se informó que mientras que GPC3 es indetectable en el hígado normal, su expresión está aumentada en la mayoría de los hepatocarcinomas [315-322]. De manera similar, Filmus y colaboradores encontraron un importante número de tumores colorrectales con altos niveles de GPC3, mientras que el tejido normal no lo expresa [271]. Teniendo en cuenta que el hígado y el intestino embrionarios expresan GPC3, y que esta expresión es silenciada en el tejido normal adulto, GPC3 ha sido postulado como una proteína oncofetal en estos órganos. En general, las proteínas oncofetales tienen un papel crítico en el desarrollo tumoral, y han sido utilizadas como marcadores o como “blancos” para inmunoterapias. Al respecto, vale la pena remarcar que Hsu y colaboradores [315] demostraron que en los hepatocarcinomas GPC3 está sobreexpresado más frecuentemente que la  $\alpha$ -fetoproteína, otra proteína oncofetal utilizada en la clínica como marcador tumoral de esta patología.

La expresión de GPC3 ha sido analizada por diferentes grupos en una gran variedad de tipos tumorales, como adenocarcinoma pulmonar [323, 324], cáncer gástrico [325, 326] y esofágico [326], así como también en una serie de tumores embrionarios, como neuroblastoma, meduloblastoma y tumor de Wilms, obteniéndose resultados variables acerca de su participación en el desarrollo maligno [327-332].

Los estudios comparativos de la expresión de GPC3 en el tejido mamario normal y tumoral revelaron que en los tejidos mamaros normales se pueden observar altos niveles de GPC3 en el epitelio ductal, mientras que en los tejidos tumorales esta expresión está significativamente reducida [333]. Xiang y

colaboradores demostraron que la expresión de GPC3 se encuentra silenciada en cáncer de mama debido, al menos en parte, a la hipermetilación de su promotor. La expresión ectópica de GPC3 inhibió el crecimiento de 8 de las 10 líneas celulares de carcinoma mamario estudiadas [334]. Por su parte, Yan y colaboradores examinaron exhaustivamente el promotor del gen de GPC3, encontrándolo hipermetilado principalmente en los tumores negativos para receptores hormonales. Los autores afirman que la hipermetilación de las islas CpG influye en el desarrollo del cáncer, y que produce diferentes características epigenéticas para cada subtipo tumoral [335].

Si bien es sabido que la expresión de GPC3 está disminuida en los tumores mamarios, aún no ha sido descrito el papel de esta glicoproteína en el desarrollo de metástasis y en la progresión tumoral.

En resumen, dependiendo del tejido del que se trate, GPC3 posee patrones de expresión muy diferentes durante la tumorigénesis. En los cánceres originados a partir de tejidos adultos GPC3-positivos, la expresión de GPC3 disminuye durante el desarrollo tumoral. Esta reducción parece tener un papel clave en la generación del fenotipo maligno. Por otro lado, en los tumores originados a partir de tejidos adultos GPC3-negativos, la expresión de GPC3 tiende a reaparecer durante la transformación maligna. Sin embargo, la vía mediante la cual la reexpresión de GPC3 ejerce su importante papel en el desarrollo de estos tumores aún no ha sido determinada. Se especula que las diferencias tejido-específicas son debidas al hecho de que GPC3 es capaz de regular diferentes factores de crecimiento y supervivencia en cada tejido [336].

## **V- MARCADORES TUMORALES**

### **Aspectos generales**

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 patológicos del paciente (derrames pleural, pericárdico, ascitis, contenido de quistes). La utilidad de esta determinación es variada dependiendo del tipo de patología tumoral y de las características del marcador, permitiendo entre otras facilitar el diagnóstico, seleccionar la aplicación de un esquema terapéutico, 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 las metástasis de primario desconocido [337]. Muchos elementos, incluyendo antígenos asociados al tumor, enzimas, metabolitos, productos de oncogenes, de genes supresores de tumor y el mismo material genético (ADN genómico o mitocondrial, alteraciones microsatelitales, pérdida de heterocigosis), pueden ser potencialmente útiles como marcadores tumorales.

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 [338-340]. Casi ochenta años más tarde, en 1928, Ascheim y Zondeck descubrieron la gonadotropina coriónica humana (HCG) y su asociación con los tumores de origen trofoblástico [339]. 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.

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 los factores producidos por las células tumorales, o por las 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. Así, la conclusión definitiva respecto de cada biomarcador en particular surgirá del análisis multidisciplinario, incluyendo los campos biológico, anatomopatológico, clínico y epidemiológico.

### **Clasificación**

Los marcadores tumorales pueden resultar de utilidad en diferentes etapas de la enfermedad. Se los puede clasificar de diferentes formas.

#### **1. De acuerdo con sus propiedades**

**1.1. Marcador de susceptibilidad:** Es aquel que permite identificar personas con mayor riesgo de desarrollar un determinado tipo de cáncer, muchas veces en el contexto de un síndrome familiar. Generalmente se basan en la detección de las alteraciones en los genes supresores de tumor o en los genes vinculados a los mecanismos de reparación del ADN. En la Tabla VII se muestran algunos ejemplos de genes supresores de tumor y las enfermedades relacionadas.

**Tabla VII. Genes supresores de tumor y tipos de cáncer relacionados con su alteración**

<b>GEN SUPRESOR TUMORAL</b>	<b>ENFERMEDAD RELACIONADA</b>
<i>Rb</i>	Retinoblastoma
<i>Dcc</i>	FCC (Familiar Colorrectal Cancer)
<i>p16</i>	Melanoma familiar
<i>Brca1 y Brca2</i>	Cáncer de mama familiar

**1.2. Marcador de diagnóstico:** Es aquel cuya sola presencia indica la existencia de neoplasia, o bien resulta de utilidad en la confirmación de un diagnóstico histopatológico.

El cáncer de sitio primario desconocido representa del 5 al 10% de todos los pacientes oncológicos. Se trata de una población heterogénea 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 de linaje celular y de marcadores 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.

En la Tabla VIII 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.

**1.3. Marcador de estadificación:** Este marcador sirve para evaluar la presencia de células que se han escapado del tumor primario. Así, por ejemplo, se busca reconocer micrometástasis en la médula ósea, o en los ganglios linfáticos drenantes. En cáncer de mama el fracaso en la detección de las micrometástasis es de alrededor del 25%, por lo tanto hay un interés creciente en mejorar la sensibilidad de los métodos y por ende la estadificación.

**Tabla VIII. Algunos ejemplos de antígenos analizados mediante IHQ en el diagnóstico y caracterización tumoral**

<b>ANTÍGENO</b>	<b>ESPECIFICIDAD TISULAR Y TUMORAL</b>
Actinas musculares	Isoforma específica para músculo liso, miofibroblastos y mioepiteliales Isoforma sarcomérica específica para músculo estriado
$\alpha$ -Fetoproteína	Hígado, carcinoma hepatocelular
$\alpha$ -Lactoalbúmina	Epitelio de glándula mamaria, Carcinoma de mama lobulillar y ductal
Antígeno Carcinoembrionario (CEA)	Adenocarcinomas del tracto gastrointestinal y páncreas, pulmón, carcinoma medular de tiroides
Citoqueratinas	Tumores de estirpe epitelial
Factor VIII	Megacariocitos, plaquetas, mastocitos, endotelio, tumores endoteliales
Proteína gliofibrilar ácida	Células gliales, astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, schwannomas
Ki-67	Ag de proliferación celular, todos los tumores con células en división
Antígeno leucocitario común	Linfocitos, ausente en otros tipos tumorales
Mioglobina	Músculo esquelético y cardíaco
Miosina	Isoformas específicas para músculo liso y estriado
Antígeno prostático específico	Epitelio de acinos y túbulos de la próstata normal, hiperplasia y carcinoma de próstata
Vimentina	Tumores mesenquimáticos

**1.4. Marcador de pronóstico:** Se refiere a cualquier factor capaz, en el momento del diagnóstico, de dar información sobre la evolución clínica que tendrá el paciente en términos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (recaída local y/o a distancia).

La introducción de un nuevo marcador de pronóstico implica:

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

A pesar de contar con muchos marcadores de pronóstico en diferentes patologías oncológicas, aún se necesitan otros factores de pronóstico que

permitan conocer con certeza la evolución individual de cada paciente. Así, por ejemplo, en cáncer de mama sin compromiso de ganglios linfáticos se hacen necesarios marcadores que predigan el porcentaje de casos que progresarán. Estos marcadores permitirían identificar a los pacientes de pobre pronóstico, en los que una terapia adyuvante agresiva temprana sería beneficiosa. También podrían ser identificados los pacientes cuyo pronóstico es tan bueno, que la terapia adyuvante luego de la cirugía local no sería necesaria.

**1.5. Marcador predictivo:** Un marcador predictivo es cualquier factor capaz de proporcionar información que permita seleccionar pacientes que responderán o no a un esquema terapéutico en particular. Es decir, permite seleccionar una terapia específica dependiendo de las características del tumor y del paciente. Esto involucra medir sustancias marcadoras en sangre, orina u otros fluidos.

**1.6. Marcador de seguimiento (monitoreo de la enfermedad en curso):** Estos marcadores son capaces de informar respecto del estado de la enfermedad de un paciente en un momento dado. Los mismos permiten seguir la evolución del paciente una vez que éste ha finalizado su tratamiento primario, siendo capaces de anticipar recidiva o recurrencia en relación al diagnóstico clínico, o de detectar enfermedad mínima residual.

## **2. Según cuál sea el problema a resolver**

**2.1. 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 las reactividades cruzadas, así como lograr la especificidad y la sensibilidad adecuadas considerando la heterogeneidad del tumor.

**2.2. Marcadores moleculares:** Se basan en la identificación de genes, ARNm, 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 rearrreglos de los genes de las Ig o de los receptores T.

Un ejemplo de marcador molecular es el análisis del gen de Bcl-2, el cual puede ser un marcador de translocación indicativo del linfoma folicular de células B. Otro ejemplo es la identificación de un ARNm de 8,5 Kb, responsable de la una proteína de fusión de 220 kDa que se genera como producto de la translocación 9:22 en la leucemia mieloide crónica (LMC).

**2.3. Marcadores citogenéticas:** Se basan en la detección de las 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, proteómica y *tissue arrays*.

### **1. *Microarrays***

La tecnología basada en los microarreglos o *microarrays*, consiste en la inmovilización o la síntesis de los 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 ADNc sintetizado a partir de los ARNm provenientes de tejidos o células y que se marcan en forma diferente según se trate de una muestra de un paciente o de un 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 ARNm [341, 342].

## **2. Análisis serial de la expresión génica (SAGE)**

Consiste en elaborar una biblioteca de ADNc (proveniente de los ARNm que se están expresando en ese momento en la célula), con la finalidad de poder secuenciar entre 30-35 transcritos al mismo tiempo. Los ADNc se marcan con el sistema biotina–estreptavidina y se cortan con enzimas de restricción para agregarles un *linker* que permita clonarlos y secuenciarlos. Esta técnica es muy sensible para la medición de transcritos poco abundantes, así como también para la detección de pequeños cambios de la expresión. Cuenta con la ventaja de prescindir de la secuencia de genes conocidos, permitiendo ser útil también para el descubrimiento de nuevos genes [343].

## **3. Identificación de un perfil proteico (proteómica)**

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 láser y pegado en soporte sólido (SELDI TOF), para luego ser analizadas 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 de los 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 las mutaciones del ADN no siempre se correlaciona con la manifestación de la enfermedad [344, 345].

## **4. Tissue arrays**

Por otro lado, es posible analizar la distribución de una determinada proteína sobre tejidos tumorales. 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. Este arreglo permite el estudio de una molécula en cientos de muestras respetando la arquitectura del tejido [346]. Además se ha desarrollado metodología tendiente a determinar no sólo la expresión de determinadas

proteínas sino su funcionalidad biológica (**metabolómica**). 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 de la 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.

## **Propiedades de los marcadores**

### **1. Especificidad**

Se define como la proporción de individuos sin enfermedad, con un test negativo para determinado marcador y se expresa en porcentaje. En general, todos los individuos presentan niveles de concentración o de actividad del marcador estudiado, comprendidos dentro del rango establecido como normal para el mismo (son verdaderos negativos). Un marcador tumoral que se califica como específico tiene pocos falsos positivos (individuos sin enfermedad, pero con niveles alterados del marcador) [347].

### **2. Sensibilidad**

Se define como la proporción de pacientes con enfermedad neoplásica que presentan un test positivo para determinado marcador, y se expresa en porcentaje. En este caso, los pacientes presentan valores elevados del marcador (son verdaderos positivos). Un marcador tumoral clasificado como sensible tiene pocos falsos negativos (pacientes con enfermedad que presentan niveles normales del marcador) [347].

### **3. Valor predictivo positivo (VP+)**

Es la probabilidad de enfermedad en un paciente cuando el resultado del test es positivo [347].

#### 4. Valor predictivo negativo (VP-)

Es la probabilidad de no tener enfermedad cuando el resultado del test es negativo [347].

Para definir mejor las cualidades de un marcador se establecen algunos parámetros indicados en las siguientes tablas [347]:

**Tabla IX. Relación entre el resultado de un test diagnóstico y la presencia de la enfermedad en el paciente**

		ENFERMEDAD	
		PRESENTE	AUSENTE
TEST	POSITIVO	Verdadero Positivo (A)	Falso Positivo (B)
	NEGATIVO	Falso Negativo (C)	Verdadero Negativo (D)

**Tabla X. Parámetros utilizados para caracterizar a un marcador biológico**

PARÁMETRO	FÓRMULA
Especificidad	$D / B + D$
Sensibilidad	$A / A + C$
Valor Predictivo Positivo	$A / A + B$
Valor Predictivo Negativo	$D / C + D$



## **Marcadores tumorales tisulares y circulantes en cáncer de mama**

La naturaleza heterogénea del carcinoma mamario hace muy difícil que un único marcador tumoral refleje los distintos aspectos del comportamiento biológico de esta neoplasia. Actualmente, la propuesta es elegir un grupo o un panel de marcadores, que caractericen el perfil del comportamiento de un tipo tumoral [348]. A lo largo de los últimos 20 años, numerosas moléculas han sido propuestas como potenciales marcadores tumorales en cáncer de mama, lo cual complica la elección de la combinación más acertada de marcadores [348].

### **1. Marcadores tisulares**

El receptor de estrógenos (RE) es el marcador de pronóstico mejor caracterizado y más ampliamente aceptado como tal. Su papel como factor de pronóstico y su importancia tanto en la predicción de la respuesta a la adyuvancia en el carcinoma de mama primario, así como en el tratamiento del paciente con progresión ósea, se encuentran muy bien establecidos.

Hay un amplio espectro de potenciales marcadores propuestos, incluyendo el producto de oncogenes tales como el erbB2/Her-2 neu, el producto de genes supresores de tumor como p53, marcadores de muerte celular e ingreso a Fase S del ciclo (Bcl-2), moléculas para estudiar fracción de crecimiento celular (Ki-67) y marcadores de invasión/recaída temprana como el uPA. Como se dijera previamente, aún no se ha delineado la combinación de marcadores adecuados como para que, evaluados en forma conjunta, brinden información referida a los diversos aspectos del comportamiento biológico del tumor [348].

### **2. Marcadores circulantes**

El CEA y el CA 15.3 son los marcadores tumorales circulantes más comúnmente utilizados en cáncer de mama [349-351]. Aunque la utilidad de ambos marcadores en la detección temprana de recurrencia no se encuentra aún claramente establecida [349, 352, 353], el dosaje de CEA y CA 15.3 es frecuentemente utilizado como marcador de seguimiento [352]. La sensibilidad de CEA y CA 15.3 en pacientes con cáncer de mama metastatizado, sugiere de todos modos, su posible utilidad en el diagnóstico de una recaída [352]. El grupo

de Molina reportó el beneficio de realizar determinaciones séricas de CEA y CA 15.3 en pacientes sin evidencias clínicas de enfermedad [349] para la detección temprana de recurrencia. Estos marcadores tumorales demostraron detectar el 52% de las recaídas (locales y a distancia) antes de la detección clínica, con una sensibilidad aún mayor en el caso de las recaídas a distancia 64% [349].

# **OBJETIVOS**

## **I. OBJETIVO GENERAL**

Dada la posible asociación entre la expresión de GPC3 y algunos de los eventos claves en la progresión tumoral y la falta de trabajos en este campo, se propone estudiar el papel de este proteoglicano en el comportamiento biológico de células mamarias murinas. Se analizará si la reexpresión GPC3 en células de una línea derivada de tumores de mama genera alteraciones fenotípicas asociadas con la transformación maligna y/o con la progresión tumoral.

En una segunda etapa, y con el objetivo de identificar nuevos parámetros capaces de anticiparse a la evolución del carcinoma mamario, se analizará la utilidad de GPC3 y de algunas moléculas reguladoras del ciclo celular como marcadores de pronóstico en esta patología.

## **II. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

### **1. Identificar un modelo celular que no exprese GPC3**

Con el objetivo de determinar si las células de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3 no expresan GPC3, se realizarán ensayos de Northern blot.

### **2. Reexpresar GPC3 en las células de adenocarcinoma mamario murino**

Para analizar las funciones biológicas de GPC3 en el desarrollo tumoral, las células identificadas como GPC3 negativas serán transfectadas de manera estable con el gen de este proteoglicano.

### **3. Analizar las células transfectadas con el gen de GPC3**

Los clones que expresen GPC3 se analizarán *in vivo* e *in vitro* con el fin de determinar la función de este proteoglicano en eventos relacionados con la invasión y la metástasis.

### **Estudios *in vivo***

- Se estudiará la capacidad tumorigénica de los clones que expresan GPC3 y de los controles. Se evaluará la toma tumoral, la latencia y la tasa de crecimiento de los tumores subcutáneos generados por la inoculación de los distintos clones, así como también la supervivencia de los ratones portadores.
- Se estudiarán las capacidades invasiva y metastática de las mismas células. Con el fin de evaluar la capacidad metastásica espontánea y experimental se emplearán diferentes vías de inoculación.

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

- Se estudiarán las propiedades de crecimiento de las células que expresan GPC3, analizando la morfología, la proliferación celular y las capacidades clonogénica y de formar colonias en agar blando.
- Se analizará la susceptibilidad a la muerte celular. Para ello se realizarán ensayos de respuesta a agentes citotóxicos así como también de respuesta a la muerte celular inducida por privación de nutrientes.
- Se estudiará la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular, mediante distintas técnicas inmunológicas (como WB, ICQ, IF). Se analizará el efecto de GPC3 sobre la expresión de las siguientes proteínas:
  - Pro-apoptóticas: Caspasa-9 y Bax,
  - Anti-apoptóticas: Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>,
  - Ciclinas: D1 y B1,
  - CDKIs: p16, p21 y p27.
- Se analizarán las propiedades adhesivas y la expresión de moléculas de adhesión relevantes. Se estudiará la capacidad de adhesión a sustratos de la ME (como FN) y la adhesión célula a célula (adhesión homotípica). Mediante WB, ICQ y/o IF se estudiará la expresión de moléculas importantes en el proceso de adhesión, como  $\beta_1$ -integrina, E-cadherina,  $\beta$ -catenina y CD44.

- Se estudiarán las capacidades de *spreading*, migración e invasión.
- Se analizará el citoesqueleto.
- Se estudiará la secreción de enzimas proteolíticas asociadas con la invasión, como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y las metaloproteasas (MMPs), y su modulación por TGF- $\beta$  e IGF-II.

#### **4. Estudiar la expresión de GPC3 en tumores de mama humanos**

Mediante IHQ se analizará la expresión de GPC3 en patologías mamarias benignas, así como también en tumores mamarios de bajo estadio. Se estudiará la relación con los parámetros clínico-patológicos de las pacientes, incluido el tiempo de supervivencia libre de enfermedad (SLE). El objetivo final es establecer el posible uso de este proteoglicano como marcador de pronóstico en cáncer de mama de estadios I y II.

#### **5. Estudiar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en tumores de mama humano**

Mediante IHQ se analizará la expresión de las ciclina D1 y E, y de los CDKIs p16 y p21. Además se analizará la asociación con los parámetros clínico-patológicos y con el tiempo de SLE. Finalmente, se intentará establecer el posible uso de alguna/s de estas moléculas como marcadores de pronóstico en cáncer de mama.

#### **6. Estudiar las posibles asociaciones entre la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular y GPC3**

# **MATERIALES Y METODOS**

**PARTE I: Papel de GPC3 en la progresión tumoral.**  
**Estudios en el modelo experimental de adenocarcinoma**  
**mamario murino LM3**

**Línea celular**

Se utilizó la línea celular continua LM3, establecida a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de un cultivo primario del adenocarcinoma mamario murino M3 [354]. El adenocarcinoma mamario M3 surgió espontáneamente en un ratón BALB/c endocriado en el bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” y se mantiene por trasplante subcutáneo (s.c.). Los tumores M3 no muestran invasividad local y son moderadamente metastásicos en pulmón, su órgano blanco (Tabla XI, Figura 19 A).

A diferencia de su tumor parental, las células LM3 adquirieron con los sucesivos pasajes *in vitro* un fenotipo altamente invasivo y metastásico al ser inoculadas en ratones singeneicos (Figura 19 B). La línea LM3 presenta en cultivo una morfología epitelial polihédrica (Figura 19 C) [354].

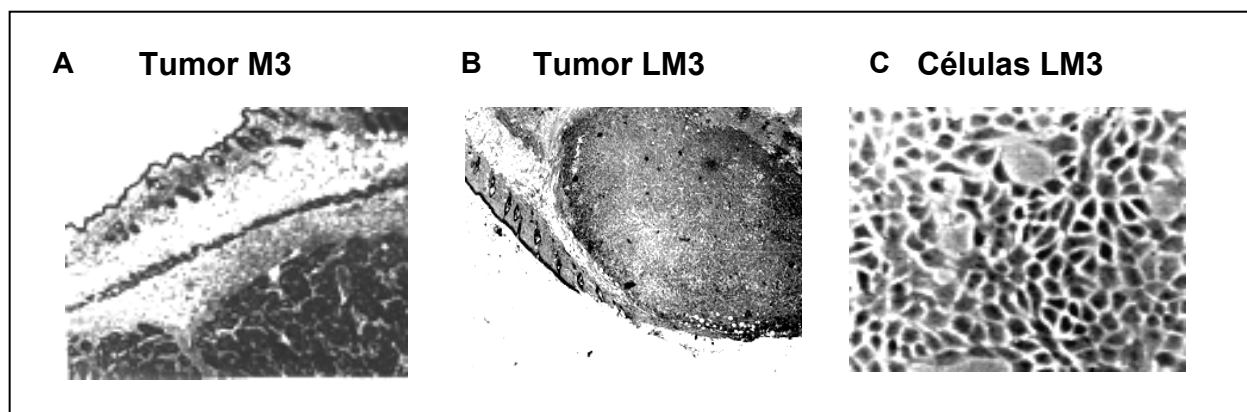
Las células se mantuvieron a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, en medio esencial mínimo con aminoácidos no esenciales (MEM 41500 Gibco), 2 mM L-glutamina, 80 µg/ml de gentamicina y 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gen). Las monocapas confluentes se repicaron dos veces por semana empleando 0,25% tripsina/ 0,02% EDTA (Sigma), en PBS libre de calcio y magnesio. Periódicamente, se determinó que las células estuvieran libres de micoplasmas, utilizando una tinción con el reactivo de Hoechst.



**Tabla XI. Comportamiento *in vivo* del adenocarcinoma mamario murino M3 y de su línea derivada LM3**

Datos extraídos de Urtreger y colaboradores [354].

PROPIEDADES	M3	LM3
<b>Latencia (días)</b> Mediana (rango)	6 (5-10)	7 (7-11)
<b>Tasa de crecimiento tumoral (mm/día)</b> Media $\pm$ DS	0,86 $\pm$ 0,17	0,35 $\pm$ 0,07
<b>Tumorigenicidad (%)</b>	100	90
<b>Invasión local</b>	No	Si
<b>Supervivencia (días)</b>	42	64
<b>Incidencia de metástasis espontáneas (%)</b>	40	100
<b>N° nódulos pulmonares/ratón</b> Mediana (rango)	1 (0-5)	28 (5-91)



**Figura 19. Características del tumor M3 y de la línea LM3**

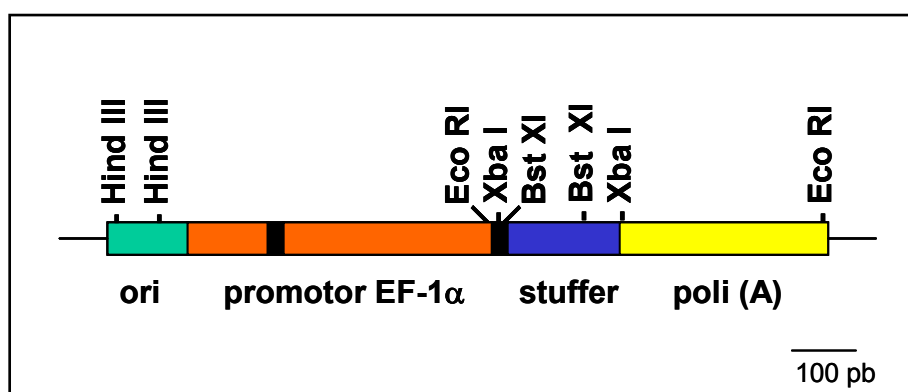
- A. Corte histológico del tumor parental M3, inoculado en el flanco de ratones BALB/c.
- B. Corte histológico del tumor formado por la inoculación s.c. de las células LM3 en ratones singéneos BALB/c.
- C. Monocapa confluyente de la línea celular LM3 (400X).

### **Análisis de la expresión de GPC3 en la línea LM3 mediante Northern blot**

Para analizar la expresión de GPC3 en las células de la línea LM3, el ARN total fue extraído por el método RNAzol B (Tel-Test, Inc.). Los ARNs (30 µg) fueron fraccionados en geles de agarosa 1,2%, 2,2 M de formaldehído y transferidos a membranas de nylon (Hybond N+, Pharmacia Biotech). Una región parcial del ADNc de OCI5/GPC3 fue marcada con  $\alpha P^{32}$  dCTP por el método de *random primer* (Gibco). Las sondas fueron hibridadas con las membranas de nylon a 60°C toda la noche, en condiciones de alta astringencia. Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas y expuestas a placas autorradiográficas a -70°C para intensificar la señal.

### **Transfección de la línea celular LM3 con el gen de GPC3**

El ADNc correspondiente a OCI5/GPC3, unido al epítipo de la Hemaglutinina (HA), fue introducido en el vector pEF-BOS [355]. Las construcciones utilizadas llevaron además genes que confieren resistencia a ampicilina y geneticina (G418), permitiéndose así la selección primero de bacterias transformadas (ampicilina), y posteriormente, de las células eucariontes transfectadas (G418). En la Figura 20 se muestra parte de la estructura de este plásmido.



**Figura 20. Estructura de pEF-BOS**

El rectángulo verde indica la zona del plásmido con origen de SV40, el naranja corresponde al promotor humano EF-1 $\alpha$ , el azul es una zona del plásmido CDM8 y el amarillo corresponde al sitio de poliadenilación. Las áreas negras del promotor EF-1 $\alpha$  equivalen al primer exón y a parte del segundo exón, respectivamente. Las líneas que flanquean a los rectángulos corresponden a las secuencias de pUC119. Además se indican los principales sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

Este vector fue transfectado en las células LM3 utilizando lipofectina (Gibco) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En paralelo, las células fueron transfectadas con el vector vacío, como control. Las células transfectadas se cultivaron durante 15 días en medio completo suplementado con 5% de SFB, conteniendo 400 µg/ml de G418 (Gibco). Se evaluó la expresión de GPC3 en las colonias seleccionadas mediante la técnica de WB. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de 200µg/ml del antibiótico G418.

### **Selección de los clones que expresan GPC3 mediante WB**

Monocapas confluentes de las células transfectadas fueron lavadas 3 veces con PBS frío y lisadas en buffer de lisis (PBS-1% Triton X-100) conteniendo inhibidores de proteasas (10 µg/ml PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina). El contenido proteico de las muestras fue determinado por el método de Bradford [356]. Los extractos se diluyeron con buffer de siembra Laemmli (0,5 M Tris (pH 6,8), 10% SDS, 1 mg/ml azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) y se calentaron 5 minutos a 100 °C. Las muestras se resolvieron en geles dodecil sulfato de sodio, 10% poliacrilamida (SDS-PAA) [357]. Luego, los geles fueron transferidos (25 V; 60 minutos) a membranas PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) utilizando el método semiseco (BioRad). La unión inespecífica fue impedida incubando a las membranas con buffer de bloqueo (5% leche descremada, en PBS/0,1% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal específico anti HA (12CA5). Luego, las membranas se lavaron (PBS/0,1% Tween 20) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo anti ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, Vector). Para el revelado se utilizó el método ECL (Enhanced Chemiluminescence reagent, Amersham Pharmacia Biotech). Las bandas obtenidas se analizaron y cuantificaron mediante densitometría (Molecular Analyst TM GS-700, BioRad).

Como control de siembra, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti β-actina (AC-40 Sigma). Para ello, las mismas membranas tratadas 40 minutos a temperatura ambiente con buffer de *stripping* (62,5 mM Tris, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoetanol, pH 6,7), se bloquearon e incubaron con anti actina

1:500. Como segundo anticuerpo se usó un anti ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 ( Vector). El revelado se realizó como fue descrito más arriba.

Se seleccionaron 2 clones que expresaban GPC3 (llamados LM3-GPC3 B1 y LM3-GPC3 B4) y 2 clones control (LM3-vector V1 y LM3-vector V4) para los estudios *in vivo* e *in vitro*.

## **Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento *in vivo* de las células LM3**

### **a. Animales**

Todos los experimentos fueron realizados utilizando hembras vírgenes BALB/c de 2 meses de edad, obtenidas del bioterio del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. Los animales se guardaron en cajas (máximo 10 ratones por caja), siguieron un esquema de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y tuvieron a su disposición alimento en *pellets* y agua. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo a las normas del NIH para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

### **b. Tumorigenicidad, invasión y metástasis**

Las células LM3-GPC3 (B1, B4) y las LM3-vector (V1, V4) fueron cultivadas hasta alcanzar la subconfluencia, cosechadas en fase exponencial de crecimiento con Tripsina/EDTA, lavadas con MEM y resuspendidas en el mismo medio de cultivo sin suero. Se procedió entonces a inocular s.c.  $4 \times 10^5$  células en 0,3 ml MEM en el flanco de ratones singeneicos BALB/c (10 por grupo experimental). Tres experimentos independientes fueron realizados.

Se evaluaron los siguientes parámetros: la latencia (tiempo transcurrido entre la inyección de las células tumorales y la palpación externa de los tumores), la tumorigenicidad (porcentaje de toma tumoral), y la tasa de crecimiento (mm/día, obtenida por la medición de los diámetros mayor y menor del tumor, al menos dos veces por semana).

Los animales moribundos fueron sacrificados por dislocación cervical y sometidos a necropsia, con especial interés en la búsqueda de focos metastásicos en ganglios linfáticos y pulmones. Los pulmones se fijaron con

solución de Bouin y fueron examinados bajo lupa, para determinar el tamaño y número de las metástasis superficiales espontáneas. Además, parte del tejido tumoral y pulmonar fue fijado con formalina 10% y embebido en parafina para su posterior estudio histopatológico. Los nódulos parenquimatosos y micrometástasis pulmonares se cuantificaron a partir de cortes seriados separados 100  $\mu\text{m}$ .

El análisis de la invasión tumoral se realizó mediante el examen macroscópico y el estudio histopatológico de cortes seriados de los tumores s.c. Los tumores se definieron como invasivos cuando sus células atravesaban la capa del músculo esquelético presente en la piel del ratón y ocupaban la dermis papilar llegando a la epidermis.

*Metástasis Experimentales:* Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron cosechadas e incubadas en medio durante 2 horas para recuperar su integridad. Posteriormente,  $2 \times 10^5$  células en 0,3 ml de MEM fueron inoculadas por vía intravenosa (i.v.) en la cola de ratones BALB/c (10 animales por grupo experimental). 21 días después de la inyección, los animales fueron sacrificados y sus pulmones fijados. El número de nódulos metastásicos fue evaluado como se describió anteriormente.

### **Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento *in vitro* de las células LM3**

#### **a- Propiedades de crecimiento**

##### **Proliferación celular**

0,5 ml de una suspensión conteniendo  $4 \times 10^4$  células viables/ml fueron sembrados por triplicado en placas de 24 hoyos, en medio suplementado con 5% de SFB. El medio de cultivo fue renovado cada 24 horas. Las células fueron cosechadas a las 24, 48, 72 y 96 horas después de su siembra. El crecimiento celular fue evaluado por la medición del contenido proteico en cada tiempo [356]. Previamente se había demostrado que existe una correlación entre el número de células y el contenido de proteínas (datos no mostrados). El tiempo

de duplicación poblacional fue calculado utilizando la fase exponencial de las curvas de crecimiento.

### **Eficiencia de plaqueo**

Para evaluar la eficiencia de plaqueo, se obtuvieron suspensiones monocelulares LM3-GPC3 y LM3-vector y se sembraron en placas de 6 hoyos a baja densidad ( $0,8 \times 10^3$  y  $1,6 \times 10^3$  células/ml) en medio suplementado con 10% de SFB. El medio de cultivo se reemplazó cada 72 horas por medio fresco, adicionado con SFB. 8 días después de la siembra, las células se lavaron, se fijaron con 5% ácido acético/metanol y se tiñeron con Hematoxilina. El número de colonias fue contado bajo lupa. La eficiencia de plaqueo fue definida como el porcentaje de células capaces de formar colonias de más de 10 células.

### **Colonias en agar**

Para evaluar si las células eran capaces de crecer en agar blando, placas de 24 hoyos fueron preparadas con 1 ml de agar base 0,6% (Gibco) en medio suplementado con 10% de SFB, y 1 ml de agar superior 0,4% en el mismo medio, conteniendo las células recientemente cosechadas a partir de monocapas creciendo en fase exponencial ( $10^5$  células/hoyo). Una semana después de la siembra, los cultivos fueron fijados y las colonias con más de 10 células fueron contadas bajo microscopio invertido. Se calculó el porcentaje de células capaces de formar colonias en agar blando como medida de la capacidad de crecer independientemente del anclaje.

## **b- Susceptibilidad a la muerte celular**

### **Respuesta a agentes citotóxicos**

El quimioterapéutico Doxorubicina (Doxo. Gador) fue disuelto en agua bidestilada y esterilizado por filtración. Se sembraron  $10^4$  células en 200  $\mu$ l de medio suplementado con 10% de SFB, en placas de 96 hoyos por triplicado. Las monocapas subconfluentes fueron lavadas con PBS y tratadas con 0,1 a 10  $\mu$ M de Doxo. A las 2 horas de tratamiento, las células fueron lavadas y adicionadas con medio sin SFB continuando el cultivo por 48 horas. La citotoxicidad fue

evaluada de manera indirecta mediante el Ensayo de Proliferación no radiactivo Cell Titer 96 TM (Promega Corp.) según las instrucciones de fábrica.

### **Muerte celular inducida por privación de nutrientes**

Para evaluar el efecto de la eliminación del suero,  $1,75 \times 10^5$  células fueron sembradas en medio con 5% SFB en placas de 100 mm. Después de 24 horas, las monocapas fueron lavadas con PBS y cultivadas en medio libre de SFB por 96 horas. El número de células viables y muertas fue cuantificado por el ensayo de exclusión Azul de Trypan.

También se sembraron cubreobjetos con células creciendo sin suero para determinar la muerte celular por apoptosis mediante la tinción con naranja de acridina. Para ello, las células fueron incubadas durante 1 minuto con una solución conteniendo 5  $\mu\text{g/ml}$  de naranja de acridina. Después de ser lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos en una solución de glicerina:PBS 1:1. La visualización se realizó con un microscopio de fluorescencia con emisión 480 nm. Fueron clasificadas como apoptóticas aquellas células que mostraban condensación de la cromatina, disminución del volumen celular, morfología alterada o redondeada o fragmentos celulares (cuerpos apoptóticos).

### **c y d- Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular. Análisis mediante WB, IF e ICQ**

Como primera instancia, se evaluó si GPC3 era capaz modular la expresión de proteínas inductoras/inhibidoras de la apoptosis, así como también de proteínas reguladoras del ciclo celular mediante **WB**. Para ello, las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron sembradas en placas de 100 mm por triplicado. Cuando se alcanzó el 60% de confluencia, las monocapas fueron lavadas y cultivadas en ausencia de SFB por 48 o 72 horas. Los controles fueron realizados en presencia de 5% de SFB. Se procedió entonces a la preparación de los extractos proteicos como se describió anteriormente. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles 10% SDS-PAA y se transfirieron a membranas de PDVF. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados:

*Proteínas anti-apoptóticas:* anti Bcl-XI (6586E), anti Bcl-2 (15616E) (Becton Dickinson, PharMingen), diluidos en buffer de bloqueo 1:500.

*Poteínas pro-apoptóticas:* anti caspasa-9 p35 (H-170, sc-8355 Santa Cruz Biotechnologies), anti Bax (13401A Becton Dickinson, PharMingen), diluidos en buffer de bloqueo 1:500.

*Ciclinas:* anti ciclina D1 (A-12, sc-8396) y anti ciclina B1 (GN51, sc-245) (Santa Cruz Biotechnologies), diluidos 1:500 en buffer de bloqueo.

*Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs):* anti p16 (C-20, sc-468), anti p21 (F-5, sc-6246) y anti p27 (C-19, sc-528) (Santa Cruz Biotechnologies), diluidos 1:200 en buffer de bloqueo.

Como segundos anticuerpos se utilizaron anti conejo, anti ratón y anti rata acoplados a peroxidasa (1:2000, Vector). Las bandas obtenidas se analizaron y cuantificaron mediante densitometría. Como control de siembra, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti actina (AC-40, Sigma).

Además, la expresión y localización de la caspasa-9 y de las ciclinas D1 y B1 fue estudiada también mediante **IF**. Para ello, células creciendo sobre cubreobjetos se cultivaron por 48 horas en medio con o sin suero. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se permeabilizaron con PBS/0,05% Tritón X-100 (Sigma), durante 30 min. Los cubreobjetos se incubaron con buffer de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y luego con los anticuerpos primarios arriba descritos por 2 horas (diluidos 1:100). Los segundos anticuerpos estuvieron acoplados a isotiocianato de tetrametilrhodamina (TRITC) o a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200, Sigma) y fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Los vidrios fueron entonces lavados 5 veces con PBS y los núcleos teñidos con DAPI (dilución 1:10000 en PBS, Sigma). Por último, los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje Vectashield (Vector). Se tomaron fotografías con microscopio de fluorescencia (Eclipse E400, Nikon).

Finalmente, la expresión y localización de las proteínas reguladoras del ciclo celular fue determinada por **ICQ**. Brevemente, se cultivaron por 48 horas células creciendo sobre cubreobjetos en presencia o ausencia de SFB. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y fijadas con formaldehído 4% a 4°C por 10 min. A continuación, se trataron con 30 volúmenes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante



15 minutos para eliminar la peroxidasa endógena, se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS (1 hora) y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (1:200). Después de lavarlos, los cubreobjetos fueron incubados con el segundo anticuerpo acoplado a biotina (1:500, Vector), durante 1 hora a temperatura ambiente y, posteriormente, con estreptavidina peroxidasa durante 30 minutos en oscuridad (Vector) [358]. Por último, la visualización cromogénica se produjo utilizando 3, 3'-diaminobencidina (DAB, *Kit ABC*, Vector), durante 3 minutos de acuerdo a las especificaciones de fábrica. Se consideró como positiva a la tinción nuclear.

#### **e- Propiedades de adhesión y expresión de moléculas relevantes en la adhesión celular**

##### **Adhesión a Fibronectina (FN)**

Se realizó un *coating* de FN (Sigma) en placas de 24 hoyos, utilizando 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de FN en 0,2 ml de PBS a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas fueron posteriormente incubadas durante otros 60 minutos con medio suplementado con 1 mg/ml de soro albúmina bovina (BSA) para saturar cualquier espacio libre de sustrato. También se realizó un *coating* utilizando sólo 1% de BSA, como sustrato control. Para evaluar la capacidad de adhesión a FN, las células recién cosechadas por tripsinización fueron incubadas durante 2 horas para recuperar la integridad de la superficie celular. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células fueron sembradas por triplicado en 0,5 ml de medio sin SFB e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Las células no adheridas fueron entonces eliminadas mediante 2 lavados con PBS, y las adheridas fueron tripsinizadas y contadas. La tasa de adhesión celular fue expresada como el porcentaje del total de células sembradas.

*Expresión de FN celular:* Utilizando IF se determinó si GPC3 es capaz de modular la producción de FN celular de las células LM3. Para ello, células de los distintos clones fueron sembradas sobre cubreobjetos, fijadas y permeabilizadas como se describió con anterioridad. Se procedió a la incubación con el primer anticuerpo anti FN celular diluido 1:1000 en PBS-0,1% Tween 20 (clon FN-3E2 Sigma). Como segundo anticuerpo se usó un anti ratón IgM-biotinilado diluido 1:500 en buffer de bloqueo (B9265 Sigma). Los vidrios fueron posteriormente

incubados con estreptavidina-FITC 1:200 en PBS (19538 Gibco) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

### **Adhesión homotípica**

Con el objetivo de estudiar si GPC3 modula la capacidad de las células LM3 de adherirse entre sí, se sembraron  $3 \times 10^4$  células en medio con 10% de SFB, sobre 1 ml de agar 1%, en placas de 24 hoyos. El cultivo se siguió durante 4 días, tomándose fotografías a distintos tiempos. Finalmente las células fueron cosechadas y contadas, utilizando el ensayo de exclusión Azul de Trypan como parámetro de viabilidad. Se registró el número de células aisladas y la cantidad de grumos formados.

Por otro lado, algunos de los esferoides así formados fueron fijados con paraformaldehído durante 15 minutos, lavados con PBS y teñidos toda la noche a 4°C con una solución de ioduro de propidio 20  $\mu\text{g/ml}$  en 0,1% buffer citrato-0,1% Tritón X-100. La estructura de estos esferoides fue analizada con microscopía confocal de fluorescencia.

### **Expresión de moléculas de adhesión**

La expresión de moléculas relevantes en la adhesión celular fue evaluada mediante WB como se describió con anterioridad. Los anticuerpos y diluciones utilizados fueron: anti  $\beta_1$ -integrina 1:200 (clon W1B10 Sigma), anti E-cadherina 1:500 (clon 32 Transduction Laboratories), anti  $\beta$ -catenina 1:500 (clon 14 Transduction Laboratories), anti CD44 1:100 (hibridoma IM7.8.1, TIB-235 ATCC). Como control de siembra se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti actina 1:500 (clon AC-40 Sigma). Subsecuentemente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti ratón y anti rata conjugados a peroxidasa (1:2000, Vector).

Adicionalmente, la expresión y localización de algunos antígenos fue estudiada también por IF y/o ICQ. Para estos estudios las células de los diferentes clones fueron sembradas sobre cubreobjetos y se procedió como ya se indicó con anterioridad. Para las IF se utilizaron las siguientes diluciones de los anticuerpos: anti E-cadherina 1:100, anti  $\beta$ -catenina 1:200 y anti CD44 1:100.

Como segundos anticuerpos se usaron anti ratón-TRITC (1:200, Sigma) y anti rata biotinilado (1:200, Sigma). El último anticuerpo requirió para su visualización un paso adicional consistente en la incubación con estreptavidina-FITC (Gibco) durante 30 minutos. La ICQ se realizó utilizando el anticuerpo anti E-cadherina 1:500 y un anti ratón biotinilado 1:500 (Vector).

#### **f- Ensayo de *spreading* celular**

$7 \times 10^4$  células de los diferentes clones fueron resuspendidas en medio y sembradas en placas de Petri plásticas (35 mm, Corning). Después de 60 minutos, las células no adheridas fueron eliminadas mediante un lavado con PBS. El porcentaje de *spreading* celular fue determinado a diferentes tiempos post-siembra mediante la observación en microscopio de contraste de fase (Nikon). Los campos fueron seleccionados al azar y por triplicado. Las células redondeadas refringentes fueron incluidas en el grupo de *no spreading*, mientras que la presencia de lamelas y/o filipodios fue indicativa de *spreading* celular.

#### **g- Ensayo de migración celular**

El efecto de GPC3 sobre la motilidad celular se evaluó mediante el ensayo de cicatrización de heridas o *wound-healing* [354]. Para ello se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células/ml en placas de 100 mm, en medio con 5% SFB. Al llegar a 100% confluencia celular, se realizaron heridas paralelas de  $\sim 400 \mu\text{m}$  de ancho sobre las monocapas utilizando un tip. A tiempo 0 y 6 horas después de realizada la herida, se tomaron fotografías de las mismas zonas para determinar el grado de cubrimiento de la herida original. Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría cuantitativa.

#### **h- Organización del citoesqueleto**

Se estudió el citoesqueleto de actina mediante microscopía de fluorescencia. Brevemente, las células se sembraron sobre cubreobjetos en medio con 5% SFB, se cultivaron hasta alcanzar el 60% de confluencia y se fijaron con paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con PBS- 0,2% Tritón X-100 y bloqueadas con una solución de PBS- 0,1% Tween 20- 5% leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con una

dilución 1:200 de faloidina acoplada a FITC (P-5282 Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Junto con la faloidina-FITC se utilizó el colorante Hoescht 33258, que tiñe específicamente ADN. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando la solución de montaje Vectashield (Vector). Las células se fotografiaron bajo microscopio de fluorescencia.

Se estudió también la expresión y localización de la vinculina. Para ello, se realizó la técnica de IF ya descrita, utilizando un anticuerpo específico anti vinculina (clon VIN 11-5, V4504 Sigma) diluido 1:100. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti ratón-TRITC (1:200, T5393 Sigma) y Hoescht 33258 como colorante de contraste.

En todos los casos, los controles negativos fueron realizados omitiendo los primeros anticuerpos.

## **i- Ensayos de invasión**

### **Ensayo de invasión en cámaras *Transwell***

La capacidad invasiva celular se estudió utilizando cámaras *Transwell* (Corning) de 8  $\mu\text{m}$ /poro, en placas de 24 hoyos. Los filtros fueron cubiertos en su cara basal con 0,1% de gelatina, y en su cara superior con 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la membrana basal reconstituida Matrigel (Becton Dickinson Labware). Como quimioattractante, se utilizaron 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de FN (Sigma) en 0,5 ml de medio, que fueron colocados en cada hoyo de la placa. Luego, se sembraron  $2 \times 10^5$  células en 0,15 ml de medio con 2% SFB sobre el filtro, en contacto con el Matrigel. Transcurridas 20 horas se procedió a la fijación y coloración de las células. Para ello, cada cámara fue pasada por formol 10% (5 minutos), lavada con PBS y teñida con hematoxilina de Harris (5 minutos). A continuación se procedió con la deshidratación, pasando las cámaras durante 2 minutos por cada uno de los siguientes alcoholes: 70°, 96° y 100°. Después de aclarar las membranas con xilol, la cara superior de cada filtro fue limpiada utilizando hisopos de algodón, removiéndose así las células que no atravesaron el filtro. Las membranas fueron cortadas con bisturí y montadas en portaobjetos. Se determinó el número de células que atravesaron el Matrigel y los filtros mediante recuento bajo microscopio.

### **Ensayo de invasión en geles de colágeno**

Se prepararon placas de 48 hoyos, colocando 300  $\mu$ l de la siguiente mezcla: 1,4  $\mu$ g/ml de colágeno tipo I extraído de cola de rata neutralizado con NaOH 0,14 M, en medio con 5% de SFB. Después de dejar la placa durante 15 minutos a 37°C, se sembraron 10<sup>5</sup> células por hoyo en 200  $\mu$ l de medio con 5% de SFB. Pasadas 48 y 96 horas, las células fueron fijadas con formaldehído 4% durante 15 minutos, lavadas con PBS y teñidas toda la noche a 4°C con una solución conteniendo 20  $\mu$ g/ml de ioduro de propidio en 0,1% de buffer citrato-0,1% de Tritón X.100. Después de lavar con PBS, la capacidad invasiva fue evaluada por microscopía confocal. Para ello se realizaron cortes tomográficos de 20  $\mu$ m, hasta alcanzar 9 capas de profundidad. El número de células de cada capa fue registrado. La capacidad invasiva (*CI*) fue calculada utilizando la siguiente fórmula:  $CI = \sum \frac{\log^2 20 \times i \times n}{\log^2 20}$ , siendo *i* el número de capa y *n* el número de células en la capa *i*.

### **j- Secreción de proteasas y su modulación por factores de crecimiento**

Se analizó el efecto de la expresión de GPC3 sobre la producción basal de enzimas proteolíticas involucradas en el proceso metastásico, como las metaloproteasas (MMPs) y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). También se estudió el efecto de los factores de crecimiento TGF- $\beta$  e IGF-II sobre la producción de estas proteasas. Para ello, se utilizaron medios condicionados de células tratadas o no con los factores arriba mencionados.

#### **Preparación de Medios Condicionados (MC)**

Los MC fueron preparados según ha sido descrito por Pereyra-Alfonso y colaboradores [359]. Brevemente, células de los diferentes clones se cultivaron en placas de 24 hoyos hasta subconfluencia. Después de ser lavadas con PBS para eliminar restos de SFB, 200  $\mu$ l de medio libre de suero fueron adicionados por hoyo, continuándose con el cultivo durante 24 horas más. Posteriormente, el medio se recolectó y centrifugó a 5000 rpm para eliminar restos celulares. Las monocapas fueron lisadas y el contenido proteico fue determinado por el método de Bradford [356].

Para estudiar si los TGF- $\beta$ s (1, 2 y 3) y el IGF-II tenían algún efecto sobre la producción de proteasas, en algunos experimentos los MC fueron preparados en presencia de 10 ng/ml de cada una de las tres isoformas de TGF- $\beta$ s (Oncogene, Calbiochem) o de 20 ng/ml de IGF-II (Sigma).

### **Detección de la actividad de MMPs**

La actividad colagenolítica de las MMPs se estudió mediante zimografía cuantitativa en geles 9% SDS-PAA copolimerizados con 0,1% de colágeno tipo I desnaturalizado por calor (gelatina, Sigma) como sustrato *in situ* de la enzima [360]. Los geles obtenidos se lavaron con 2% Tritón X-100 para desplazar al SDS y se incubaron a 37°C durante 48 ó 72 horas en buffer colagenasa (0,25 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,025 M CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4)). Posteriormente, los geles fueron fijados, teñidos con 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 y desteñidos con 30% metanol-10% ácido acético en agua. Las bandas de gelatinólisis se visualizaron por tinción negativa (como bandas claras sobre el fondo azul) y se analizaron por densitometría cuantitativa con un analizador de imágenes (Bio-Rad Densitometer). Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se refirieron al contenido proteico celular, como Unidades Arbitrarias (UA) por mg proteína celular. Además, para detectar la actividad no específica, los geles se incubaron en buffer colagenasa conteniendo 25 mM EDTA, que bloquea la actividad de las MMPs.

### **Cuantificación de la actividad de uPA**

La actividad proteolítica de uPA se determinó por caseinólisis radial [361]. Para ello, una mezcla conteniendo 1,25 g de agarosa (Biodynamics SRL) en 100 ml de agua deionizada, 20 mg de leche descremada como fuente de caseína, 2  $\mu$ g/ml de plasminógeno (Chromogenix) y 100 mM Tris (pH=8) fue preparada y calentada a 46° C. Esta mezcla fue colocada sobre placas plásticas, dejándola enfriar durante 15 minutos a 4° C. Se realizaron perforaciones de 4 mm de diámetro en estos geles, dentro de las cuales se sembraron 10  $\mu$ l de MC. Además, en cada gel se sembró una curva estándar de 0,1-25 UI/ml uroquinasa purificada (Serono). Los geles se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda. Se midió el diámetro de las áreas líticas y los valores obtenidos se refirieron a la curva estándar de uroquinasa, se normalizaron por el

contenido proteico celular y se expresaron como Unidades Internacionales (UI) de uPA/mg proteína celular.

*Expresión de uPA celular:* Mediante WB se determinó el nivel de uPA expresado por células LM3-GPC3 y LM3-vector, utilizando un anticuerpo específico anti uPA murino (1:100, donado gentilmente por la Dra. Ossowski) y como segundo anticuerpo un anti conejo conjugado a peroxidasa (1:2000, Vector).

#### **k- Análisis estadísticos**

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (DS), utilizando el test t-Student para comparaciones entre dos grupos y el Análisis de ANOVA y el test Scheffe, a fin de evaluar conjuntamente más de dos grupos.

Para analizar diferencias en la capacidad metastásica, se emplearon los tests no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos se consideraron de significancia biológica a un nivel de  $p < 0,05$ .

**PARTE II: Estudio de la expresión de GPC3 y de proteínas reguladoras del ciclo celular en pacientes con cáncer de mama.**

**Utilidad como marcadores tumorales**

**Pacientes**

Se analizó la expresión de GPC3 y de proteínas reguladoras del ciclo celular en tumores de mama obtenidos de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” durante el período 1995-1999. Se estudiaron un total de 23 casos con patología mamaria benigna y 56 con tumores de mama malignos. La Tabla XII y la Tabla XIII muestran algunas de las características de esta población.

**Tabla XII. Características de los diferentes grupos estudiados con patologías mamarias**

<b>PATOLOGÍA MAMARIA</b>	<b>n</b>	<b>EDAD (Md) [AÑOS]</b>	<b>SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (Md) [MESES]</b>
<b>Benigna</b>	23	46 (22-65)	
<b>Maligna</b>			
<i>Estadio I</i>	14	59 (42-81)	56 (3-108)
<i>Estadio IIA</i>	22	56 (37-89)	52 (16-101)
<i>Estadio IIB</i>	20	55 (34-66)	55,5 (15-122)

Los datos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) están presentados en la tabla anterior. Como sólo 3 pacientes murieron debido a un crecimiento descontrolado del tumor, la supervivencia global (SG) no pudo ser analizada.



**Tabla XIII. Distribución de las pacientes con cáncer de mama según edades y características histopatológicas del tumor**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>n</b>
<b><i>Edad (años)</i></b>	
<50	20
51-60	14
>61	22
<b><i>Estadio</i></b>	
I	14
IIA	22
IIB	20
<b><i>Tamaño tumoral (cm)</i></b>	
< 1,0	4
1,1-2,0	22
>2,1	30
<b><i>Ganglios con MTS (n)</i></b>	
0	26
1-3	21
≥4	9
<b><i>Grado Histológico</i></b>	
I	4
II	16
III-IV	26
<b><i>Grado Nuclear</i></b>	
I	10
II	25
III	21
<b><i>Índice Mitótico</i></b>	
I	20
II	26
III	10

<b>Tipo Histológico</b>	
<i>Lobulillar</i>	10
<i>Ductal</i>	40
<i>Especial</i>	6
<b>Estatus</b>	
<i>Pre-menopáusica</i>	13
<i>Peri-menopáusica</i>	4
<i>Post-menopáusica</i>	39
<b>Receptores estrogénicos</b>	
<i>Positivo</i>	38
<i>Negativo</i>	18

### **Criterios para la inclusión de pacientes**

Se evaluó la expresión de GPC3 y de moléculas claves en la progresión del ciclo celular en pacientes portadoras de patología mamaria benigna y con cáncer que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- 1- Diagnóstico de patología benigna.
- 2- Diagnóstico de carcinoma primario de mama estadio I o II.
- 3- Pacientes vírgenes de tratamiento.
- 4- Ausencia de neoplasias previas.

Todas las pacientes fueron debidamente informadas respecto del carácter experimental del estudio y de su decisión voluntaria de ingresar al protocolo; del mismo modo, también conocían la posibilidad de desistir de continuar participando en cualquier momento de su desarrollo. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado.

La implementación del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” de la Universidad de Buenos Aires.

## **Revisión de Historias Clínicas**

Los datos necesarios para los análisis estadísticos fueron obtenidos del Archivo de Historias Clínicas del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". Se confeccionó una bases de datos, incorporando la información de cada paciente en forma codificada. Se incluyeron los siguientes datos:

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1.- Apellido y nombres                | 15.- Receptores de estrógenos           |
| 2.- N° de Historia Clínica            | 16.- Receptores de progesterona         |
| 3.- Edad                              | 17.- Expresión de erbB-2                |
| 4.- Grupo étnico                      | 18.- Expresión de p53                   |
| 5.- Tamaño Tumoral                    | 19.- Expresión de Ki-67                 |
| 6.- Axila positiva o negativa         | 20.- Enfermedades de base               |
| 7.- N° de ganglios positivos para MTS | 21.-Muestras obtenidas, consignándose:  |
| 8.- Tipo histológico                  | I) Número de muestra;                   |
| 9.- Grado histológico                 | II) Expresión de GPC3,                  |
| 10.- Grado nuclear                    | III) Expresión de ciclinas D1 , E y B1, |
| 11.- Índice mitótico                  | IV) Expresión de CDK1s p21 y p16.       |
| 12.- Estadío tumoral                  | 22.- Evolución clínica del paciente     |
| 13.- Fecha de cirugía                 |   |
| 14.- Tipo de cirugía realizada        |   |

La expresión de los receptores hormonales, erbB-2, p53 y Ki-67 se estudió mediante técnicas IHQ. Éstas fueron realizadas en el Área de Patología del Instituto.

### **A- Estudio de la expresión de GPC3 mediante IHQ**

Las muestras tumorales fueron fijadas, inmediatamente después de su remoción, en formalina 10% e incluidas en parafina.

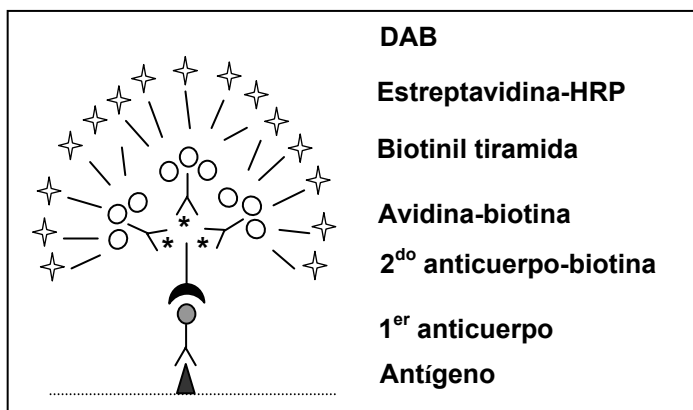
Se realizaron cortes seriados de 5  $\mu$ m, los cuales fueron colocados sobre vidrios cargados positivamente y guardados a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Los cortes fueron desparafinados por 3 pasajes sucesivos en

xilol de 10 minutos cada uno y rehidratados por pasajes en alcohol 100°, 95° y agua destilada de 5 minutos cada uno. Para la recuperación antigénica los tejidos fueron sumergidos en buffer citrato 0,1 M (pH=6) y sometidos a la acción del microondas durante tres ciclos sucesivos de 6 minutos cada uno, incluyendo los siguientes pasos: 1- potencia 900 watts durante 2 minutos, 2- potencia 550 watts, 1 minuto 30 segundos, 3- potencia 800 watts durante 2 minutos 30 segundos. Posteriormente, los cortes se deshidrataron (pasajes sucesivos de 5 minutos cada uno por concentraciones crecientes de alcohol y metanol) y se incubaron con 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol, durante 7 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. Más tarde, después de volver a hidratar los cortes, se los bloqueó con 5% leche descremada/PBS (1 hora, temperatura ambiente) en cámara húmeda. La incubación con el primer anticuerpo anti GPC3 diluido 1:50 en buffer de bloqueo (1G12, donado gentilmente por el Dr. Jorge Fimus) se realizó toda la noche a 4°C. Como segundo anticuerpo se empleó un anticuerpo anti ratón biotinilado (1:500, Vector), durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, los vidrios fueron incubados con avidina-biotina durante 30 minutos en oscuridad (*Kit ABC*, Vector). A continuación se utilizó como método de amplificación de la señal el kit *TSA Biotin System (Tyramide Signal Amplification*, PerkinElmer), basado en la deposición de tiramidas acopladas a biotina (como reactivo de amplificación). Este kit se empleó de acuerdo a las indicaciones de su fabricante, incubando los vidrios con una dilución 1:50 de biotini-tiramida, durante 7 minutos a temperatura ambiente. Seguido a esto, se realizó otra incubación con estreptavidina-HRP 1:100 en buffer de bloqueo, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, la visualización cromogénica se produjo utilizando 3, 3'-diaminobencidina (DAB Substrate for peroxidase, Vector) durante 3 minutos de acuerdo a las especificaciones de fábrica. Tras detener la acción del cromógeno con agua corriente, se realizó la contratinción con hematoxilina de Harris para lograr una coloración azul-violácea en los núcleos celulares. Posteriormente, los cortes fueron deshidratados (pasajes sucesivos en concentraciones crecientes de alcohol), aclarados (xilol), para finalmente ser montados en medio de montaje sintético acuoso, especialmente diseñado para IHQ reveladas con DAB. Controles negativos, obviando la incubación con el primer anticuerpo, fueron

realizados para discriminar cualquier tinción de fondo inespecífica. Se utilizaron cortes de placenta como controles positivos, ya que se conoce que GPC3 se sobreexpresa en este tejido.

En el siguiente esquema se muestran los distintos pasos de esta técnica.

El registro semicuantitativo se realizó mediante la observación microscópica, cuantificando el número de



células con tinción marrón brillante. Las diferencias en la intensidad de las tinciones no fueron registradas. El índice de marcación fue calculado como el porcentaje de células positivas sobre el total de células tumorales registradas.

Se realizó un análisis estadístico para establecer un valor de corte, determinándose que un mínimo de 10% de tinción era requerida para que el caso fuera considerado positivo.

## **B- Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular**

### **IHQ**

Las muestras tumorales fueron procesadas como se describió arriba. Las secciones obtenidas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: anti ciclina D1 (R-124, sc-6281), anti ciclina E (HE12, sc-247), anti ciclina B1 (GNS1, sc-245), anti p16 (C-20-G, sc-468-G) y anti p21 (F-5, sc-6246), seguidos de los anticuerpos secundarios biotinilados anti ratón o anti conejo (Gibco). Todos los anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron diluidos 1:100, excepto el anti ciclina D1 que fue diluido 1:80. Después de ser lavadas, las secciones fueron tratadas con el kit universal Vectastain ABC (Vector) e incubadas con DAB. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris. Controles negativos, obviando la incubación con el primer anticuerpo, fueron realizados para discriminar la tinción inespecífica.

Para el análisis de la expresión de la ciclina D1 sólo se consideró la tinción nuclear. En cambio, para ciclinas B1, E y los CDKIs p21 y p16 la tinción citoplasmática también fue tenida en cuenta. El índice de marcación para cada anticuerpo fue calculado. Para el análisis estadístico, los índices se agruparon en “negativo” o “positivo”, estableciéndose un mínimo de 10% de tinción para que el caso fuera considerado positivo.

## **WB**

Aproximadamente, 0.5-1 g de cada muestra tumoral fueron agregados a 1 volumen de buffer de homogenización conteniendo 20 mM Tris (pH 7,4), 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Nonidet P-40, 0,1% β-mercaptoetanol, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato de sodio, 5 mM fluoruro de sodio, 20 mM molibdato de sodio y 5 mM pirofosfato de sodio. Se procedió entonces a la homogenización de las muestras con Ultra-Turrax y a la sonicación de las mismas a 4°C. Los homogenatos obtenidos fueron centrifugados a 100000×g durante 45 minutos a 4°C y el contenido proteico de los sobrenadantes se cuantificó utilizando el método de Bradford [356]. Se procedió entonces a la realización de WB como ya se ha descrito, utilizando los siguientes anticuerpos primarios: anti ciclina D1 (R-124, sc-6281) y anti p16 (C-20-G, sc-468-G) diluidos 1:500 (Santa Cruz Biotechnologies). Subsecuentemente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti ratón o anti conejo conjugados a peroxidasa (1:2000, Vector).

## **Análisis estadístico de los resultados**

Se determinó un valor óptimo de referencia para definir valores de expresión antigénica positivos y negativos, cuando se utilizó IHQ. Este valor, como se indicó previamente, fue 10 % para GPC3, ciclinas y CDKIs.

Para los análisis bivariados entre la expresión de los diferentes antígenos y los parámetros clínico-patológicos se empleó el Test de Chi Cuadrado, considerándose como significativa una diferencia < 0,05.

En los casos que correspondía se realizaron análisis multivariado empleándose regresión logística para analizar el efecto conjunto de los

parámetros clínicos y anatómo-patológicos clásicos en pacientes con cáncer de mama, sobre la expresión de los antígenos estudiados.

Las curvas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) fueron realizadas por el método de Kaplan y Meier. Las diferencias entre las curvas se analizaron mediante el *log rank test for equality of survivor functions*. El método de análisis de supervivencia de Cox fue utilizado para analizar simultáneamente la positividad antigénica y otros parámetros.

Para analizar los resultados obtenidos mediante WB, se aplicaron métodos estadísticos no paramétricos, dado que la distribución de la expresión de los antígenos estudiados no mostró un patrón de distribución normal. Se utilizaron los Tests de Mann Whitney y de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre los valores hallados en el grupo de pacientes portadores de tumor maligno y en los pacientes con patología benigna.

Para los análisis previamente mencionados se utilizó el programa SPSSPC+.

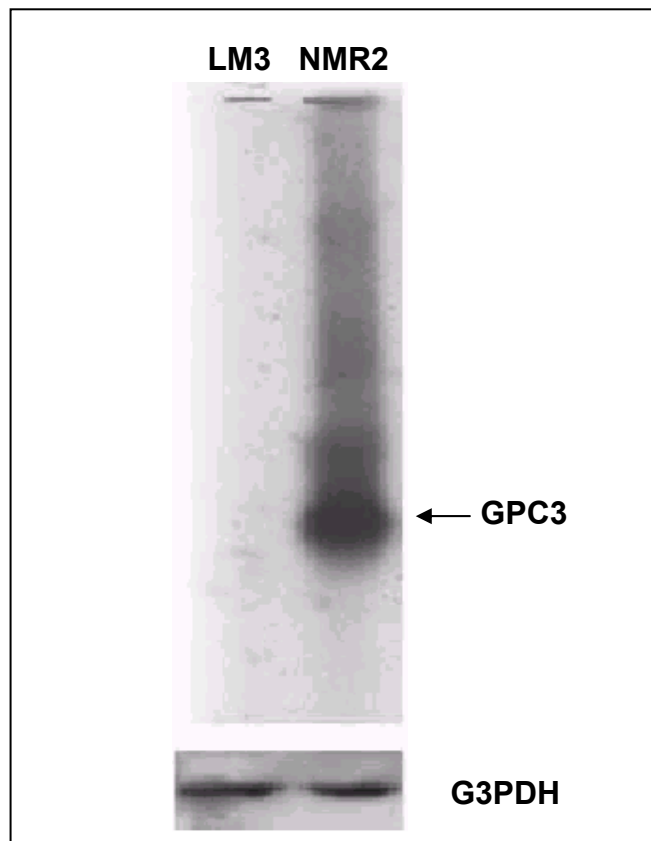
# **RESULTADOS**



**PARTE I: Papel de GPC3 en la progresión tumoral**  
**Estudios en el modelo experimental de adenocarcinoma**  
**mamario murino LM3**

**Expresión de GPC3 en la línea celular LM3**

Con el objetivo de determinar si las células de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3 son capaces de expresar GPC3, se realizaron experimentos de Northern blot. Para ello, las células se cultivaron hasta subconfluencia, momento en el cual fueron procesadas para la extracción del ARN total. Después de ser fraccionados en geles de agarosa y transferidos a membranas de nylon, los ARNs fueron hibridados con una sonda de ADNc específica para GPC3, marcada con  $\alpha P^{32}$  dCTP. Como puede verse en la Figura 21, las células LM3 no expresan cantidades detectables de GPC3.



**Figura 21. Análisis de la expresión de GPC3 por Northern blot**

El ARN extraído de las células LM3 y de de las células de la línea mamaria normal NMR2 (utilizada como control positivo) fueron hibridadas con la sonda de ADNc específica para GPC3. La sonda G3PDH fue utilizada como control de siembra.

### **Transfección de la línea celular LM3 con el gen de GPC3**

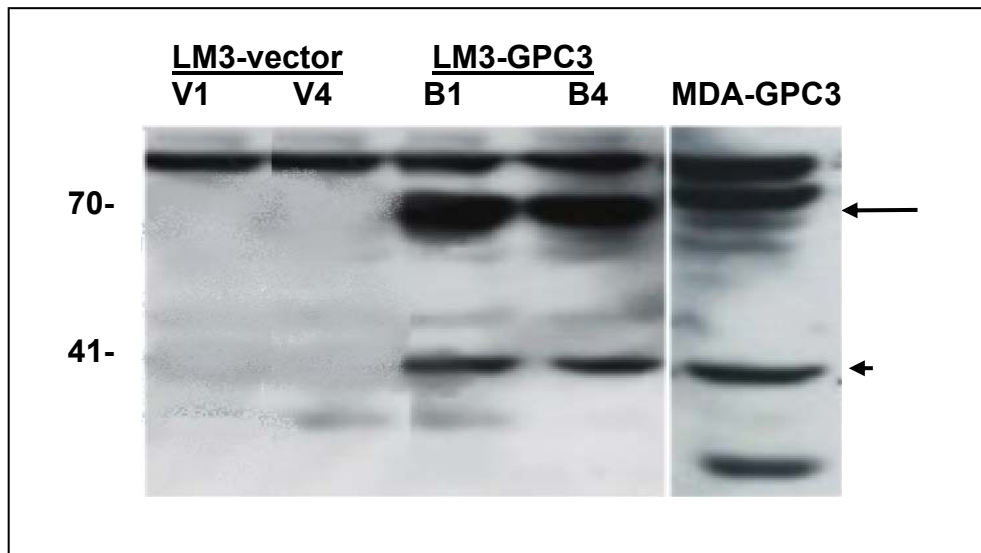
Con el objetivo de establecer el papel biológico de este glicano en la progresión maligna, se transfectaron células de la línea tumoral mamaria LM3 (incapaces de expresar GPC3) con el vector de expresión pEF-BOS, conteniendo el gen de rata de GPC3 (OCI5) fusionado a un epítopo de la hemaglutinina (HA) como *tag* para su posterior detección (pEF OCI5). En paralelo, las células fueron transfectadas con el vector vacío (pEF vector), como control. Como se muestra en la Tabla XIV, se aislaron 30 colonias celulares resistentes al antibiótico.

**Tabla XIV. Colonias resistentes a G418 obtenidas luego de la transfección de la línea LM3**

LÍNEA CELULAR	PLÁSMIDO UTILIZADO	Nº DE COLONIAS
LM3	pEF OCI5	24
	pEF vector	6

### **Obtención de las colonias que expresan GPC3**

Con el objetivo de establecer qué colonias resistentes a G418 expresaban efectivamente GPC3, los extractos proteicos de estas células fueron analizados mediante WB utilizando un anticuerpo que reconoce el *tag* HA. De las 24 colonias transfectadas con EF OCI5 y resistentes a G418, sólo 2 presentaron niveles detectables de GPC3. En ambos clones se observó una banda específica de 70 kDa, correspondiente al core proteico del proteoglicano y otra de 41 kDa, producto de su degradación proteolítica (Figura 22). Los clones que expresan GPC3 fueron denominados LM3-GPC3 B1 y LM3-GPC3 B4. Las bandas específicas no se detectaron en los dos clones utilizados como control (llamados LM3-vector V1 y LM3-vector V4). Las células MDA234 transfectadas con GPC3-HA fueron utilizadas como control positivo.



**Figura 22. Expresión de GPC3 en las células LM3 transfectadas con pEF OCI5 y pEF vector**

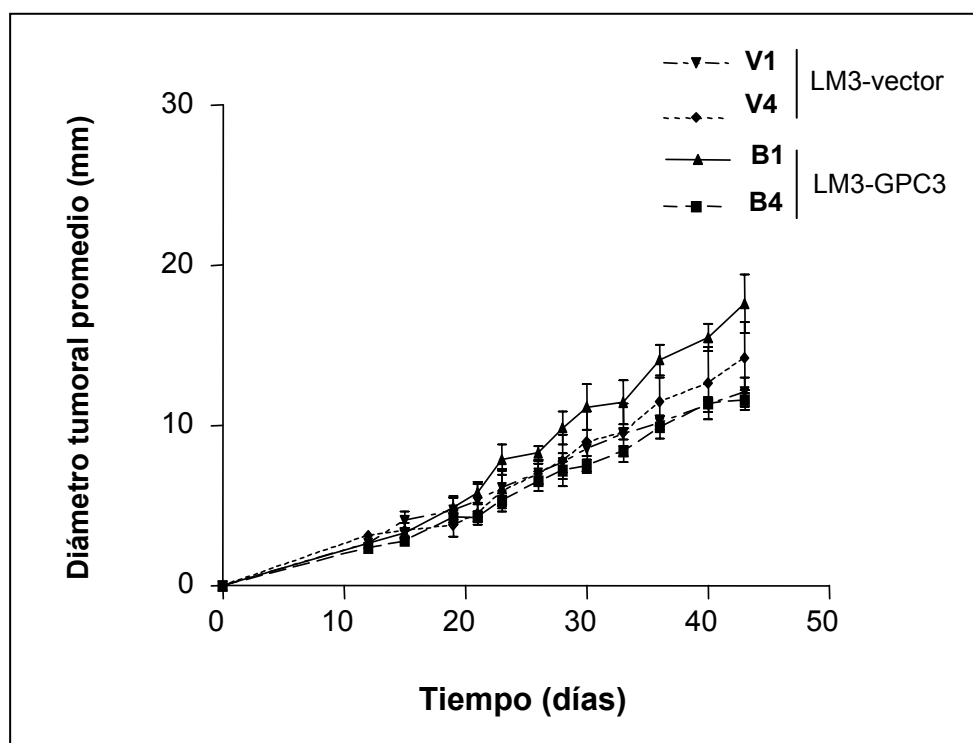
Las colonias resistentes a G418 fueron analizadas por WB, utilizando el anticuerpo anti-HA 12CA5. Las células MDA231 (GPC3-HA) se utilizaron como control positivo. La flecha indica el core proteico de GPC3 y la cabeza de flecha marca los fragmentos clivados de este core. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares en kDa.

### **Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento *in vivo* de las células LM3**

Para estudiar el efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el crecimiento tumoral y metastásico *in vivo*, las células LM3-GPC3 y LM3-vector fueron inyectadas de manera s.c. en el flanco de ratones hembra BALB/c. A partir de los tumores así generados, se evaluaron los parámetros descritos a continuación.

#### **a- Crecimiento tumoral subcutáneo**

Tanto las células LM3-GPC3 como las LM3-vector inoculadas en forma s.c. en ratones BALB/c formaron tumores con una alta tumorigenicidad (toma tumoral del 100%) y una latencia de alrededor de 12 días, definida como el tiempo transcurrido entre la inyección de las células tumorales y la palpación externa de los tumores en el 50% de los ratones. Además, los distintos tipos de tumores crecieron a una velocidad similar, alcanzando un diámetro promedio de 13 mm a los 45 días post-inoculación (Figura 23).

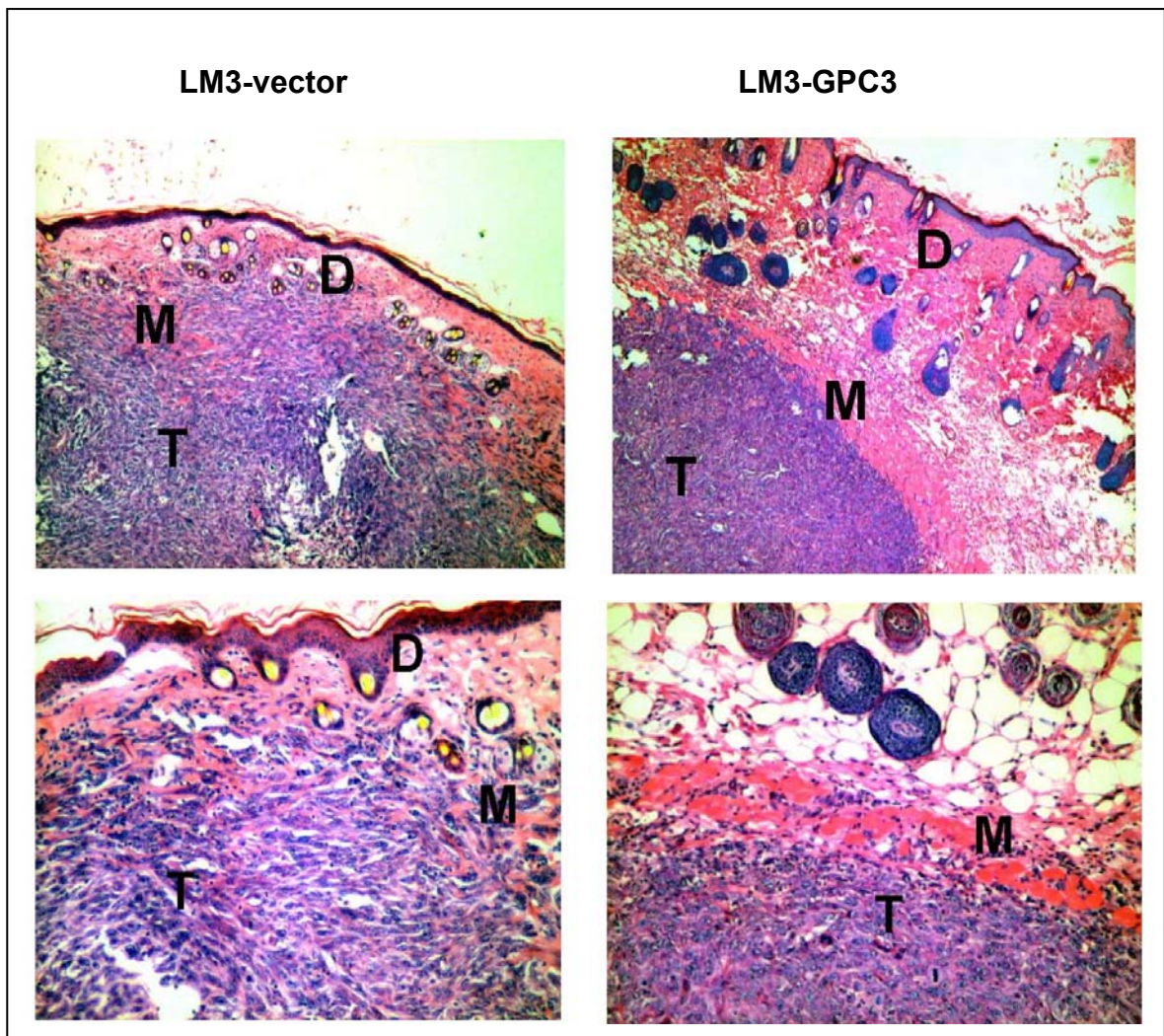


**Figura 23. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el crecimiento *in vivo* del adenocarcinoma mamario murino LM3**

Células de cada uno de los clones transfectados fueron inyectadas s.c. en ratones BALB/c. Al menos 10 ratones hembra se utilizaron para cada grupo experimental. El diámetro tumoral, expresado en mm como la media+DS, fue utilizado como parámetro de crecimiento. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes.

#### **b- Capacidad invasiva y metastásica**

Con el objetivo de determinar el efecto de GPC3 sobre la capacidad invasiva de las células LM3, los animales moribundos fueron sacrificados por dislocación cervical, y sus tumores extraídos y analizados. Parte del tejido tumoral fue fijado y embebido en parafina para su estudio histopatológico. Mediante el examen macroscópico y el estudio histopatológico de los tumores se pudieron observar importantes diferencias en el comportamiento invasivo local. Así, un alto porcentaje de tumores LM3-vector (87,5%) presentó amplia invasión del músculo subcutáneo y de la dermis, con necrosis de la epidermis adyacente (Figura 24). Por el contrario, sólo el 21% de los tumores producidos por las células LM3-GPC3 mostró puntos de invasión ocasionales y localizados, sin compromiso de la epidermis ( $p < 0,05$ ) (Figura 24, Tabla XV).



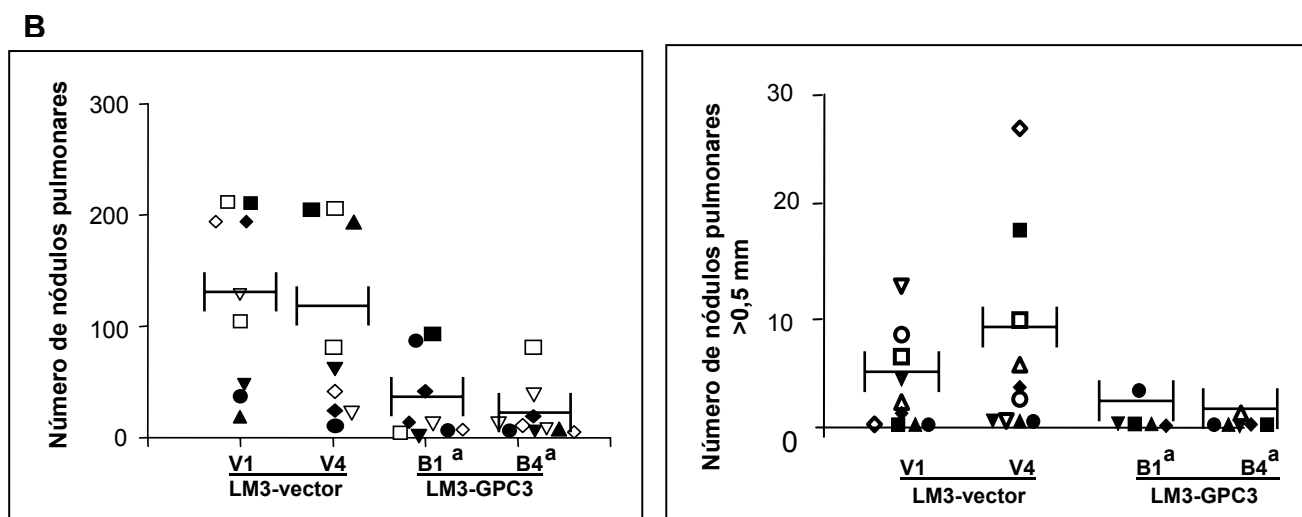
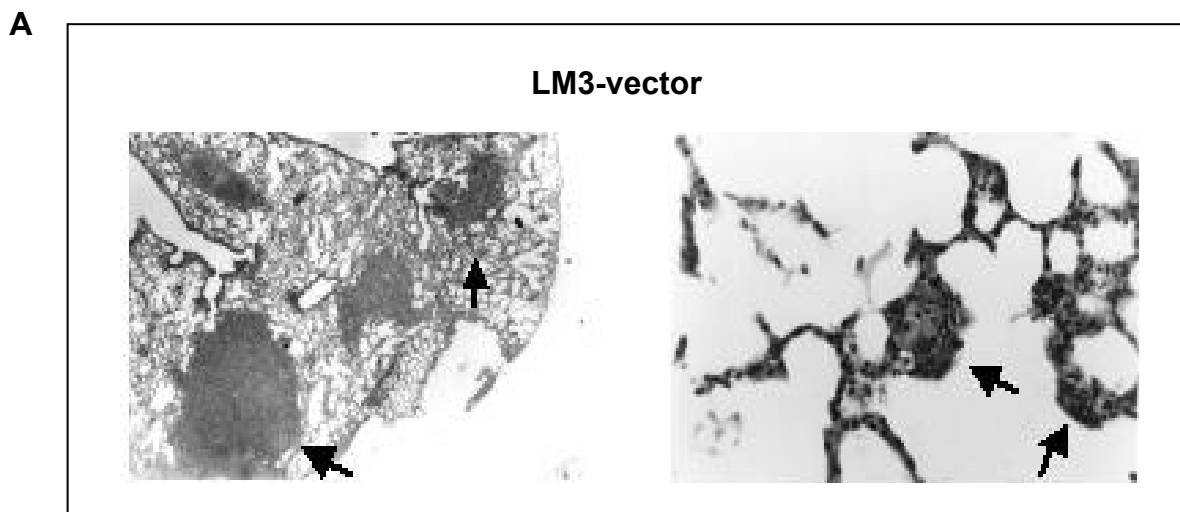
**Figura 24. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la capacidad invasiva de las células LM3**

Las células control y las transfectadas con GPC3 fueron inyectadas s.c. en ratones BALB/c. Los tumores así generados fueron fijados y analizados. Los tumores LM3-vector (izquierda) mostraron invasión del músculo subcutáneo y de la dermis. Los tumores LM3-GPC3 crecieron s.c. (derecha) sin invadir el músculo ni la dermis (X100, X400). D: dermis, M: músculo, T: tumor.

Para estudiar si la capacidad metastásica espontánea de las células LM3 se altera por la reexpresión de GPC3, los ratones sacrificados fueron sometidos a necropsia, buscando focos metastásicos en pulmones, ganglios linfáticos y otros órganos, que se examinaron en fresco y posteriormente se fijaron. Los pulmones fueron analizados bajo lupa, para determinar el tamaño y número de las metástasis superficiales. Mediante el análisis histopatológico se analizó la presencia de nódulos parenquimatosos y micrometástasis pulmonares. Así, se

pudo determinar que tanto los tumores LM3-GPC3 como los LM3-vector sólo metastatizaron en pulmón, siendo incapaces de colonizar otros órganos. Los ratones inoculados con LM3-GPC3 mostraron una disminución significativa en la incidencia de metástasis pulmonares superficiales en comparación con los ratones inoculados con las células LM3-vector (Tabla XV). Asimismo, el estudio microscópico de los pulmones de los ratones inyectados con las células control LM3-vector mostró, además de las metástasis superficiales, un elevado número de nódulos parenquimatosos y micrometástasis (Figura 25 A, Tabla XV), indicando que la inhibición metastásica inducida por GPC3 es aún mayor que la determinada por el recuento de las metástasis superficiales.

También se analizó el efecto de GPC3 sobre la incidencia y el número de metástasis experimentales. Éstas fueron evaluadas 21 días después de la inoculación i.v., en la cola de ratones BALB/c, de las células LM3-GPC3 o de las LM3-vector. Como se observa en la Figura 25 B, los ratones inyectados con las células LM3-GPC3 mostraron un número significativamente menor de nódulos pulmonares. En cuanto al tamaño de estos nódulos pulmonares, mientras que el 60% de los ratones inyectados con las células LM3-vector presentó nódulos superficiales mayores de 0,5 mm de diámetro, sólo alrededor del 20% de los animales inyectados con los clones LM3-GPC3 presentaba nódulos de este tamaño (Figura 25 B, Tabla XV).



**Figura 25. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la capacidad metastásica de las células LM3**

**A- Metástasis espontáneas:** El análisis histológico de los pulmones de los ratones inyectados s.c. con los distintos clones, mostró un importante número de nódulos parenquimatosos (izquierda 100X) y micrometástasis (derecha 400X), sólo en los ratones inyectados con células LM3-vector.

**B- Metástasis experimentales:** Las células tumorales fueron inoculadas i.v. en ratones BALB/c. Después de 21 días se registró el número de metástasis pulmonares totales (izquierda) o mayores de 0,5 mm (derecha). Las barras ( |—| ) indican el valor de la mediana. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. clones control, Test U de Mann-Whitney.

**Tabla XV. Comportamiento *in vivo* de las células LM3-GPC3 y LM3-vector**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>LM3-VECTOR (V1 Y V4)</b>	<b>LM3-GPC3 (B1 Y B4)</b>
Invasión local [n/total (%)]	7/8 (87,5)	3/14 (21,0) <sup>a</sup>
Incidencia de metástasis pulmonares espontáneas (%)	39	12
Nódulos parenquimatosos y micrometástasis espontáneas	Presentes	Ausentes
Metástasis pulmonares experimentales [Md (rango)]	113 (26-200)	15 (6-57) <sup>b</sup>
Incidencia de metástasis pulmonares experimentales > 0,5 mm (%)	60	20

Los ratones fueron inoculados y evaluados como se indica en Materiales y Métodos. Como no se observaron diferencias significativas entre los clones LM3-GPC3 B1 y B4 o LM3-vector V1 y V4, los resultados se presentan conjuntamente. Este experimento es representativo de 2 independientes.

<sup>a</sup> p<0,05 vs. LM3-vector, Test Chi Cuadrado.

<sup>b</sup> p<0,001 vs. LM3-vector, Test Kruskal-Wallis.



## **Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento *in vitro* de las células LM3**

Para poder dilucidar alguno de los mecanismos involucrados en la modulación de las capacidades invasiva y metastásica inducida por la reexpresión de GPC3 en las células LM3 *in vivo*, se decidió realizar una serie de análisis *in vitro*.

Como el proceso metastásico consta de diferentes etapas, para determinar en cuál o cuáles de ellas opera GPC3, se realizaron los siguientes estudios:

### **a- Propiedades de crecimiento**

#### **Morfología y proliferación celular**

Las células control y las transfectadas con el gen de GPC3 fueron similares morfológicamente y crecieron formando monocapas de células epiteliales polihédricas (Figura 26 A).

Para evaluar la proliferación celular, se sembraron células por triplicado en medio suplementado con 5% de SFB. Las células fueron cosechadas a las 24, 48, 72 y 96 horas después de su siembra. El crecimiento celular fue evaluado por la medición del contenido proteico en cada tiempo, no encontrándose diferencias en la velocidad de crecimiento entre las células LM3-GPC3 y las LM3-vector. El tiempo de duplicación poblacional, calculado a partir de la fase exponencial de las curvas de crecimiento, fue de alrededor de 22 horas para todos los clones (Figura 26 B).

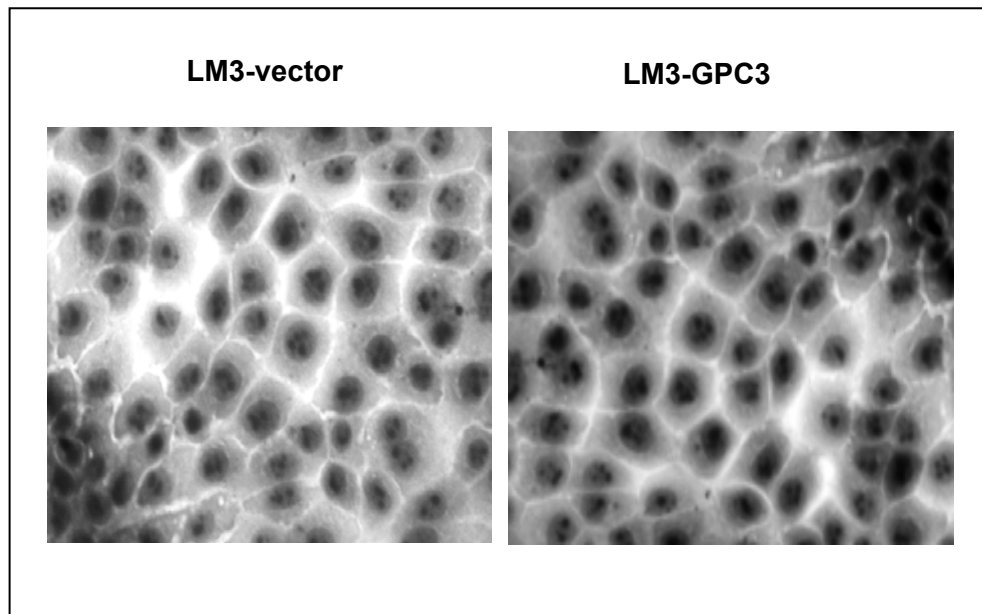
#### **Eficiencia de plaqueo**

Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron sembradas en baja densidad para evaluar su capacidad clonogénica. El crecimiento clonal, es decir la capacidad de cada una de las células de crecer y formar colonias en cultivo, es un parámetro más exigente indicativo de la proliferación celular. La eficiencia de plaqueo se definió como el porcentaje de células capaces de crecer como colonias mayores de 10 células. Bajo estas condiciones, la reexpresión de GPC3 indujo una reducción significativa de la capacidad clonogénica de las células LM3, como se puede ver en la Figura 26 C.

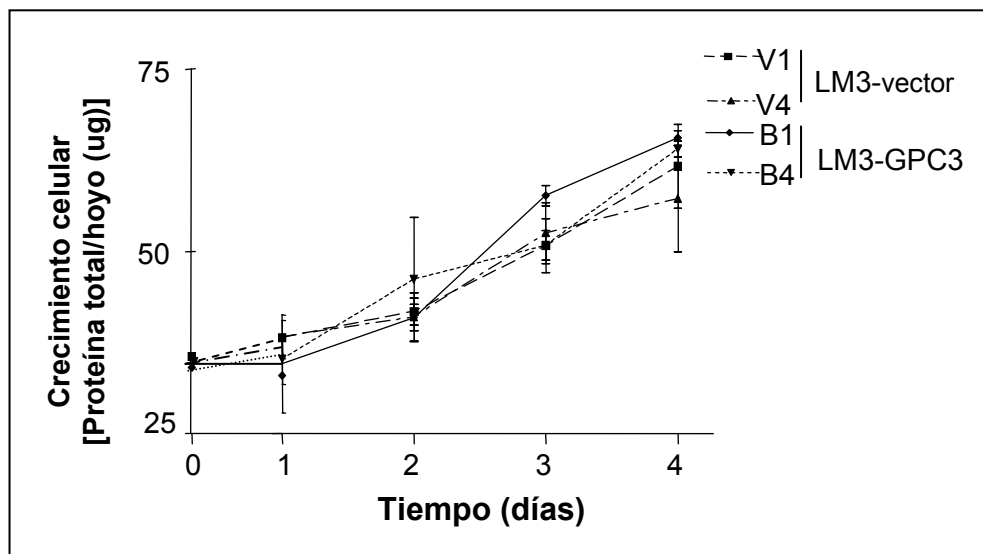
## Colonias en agar

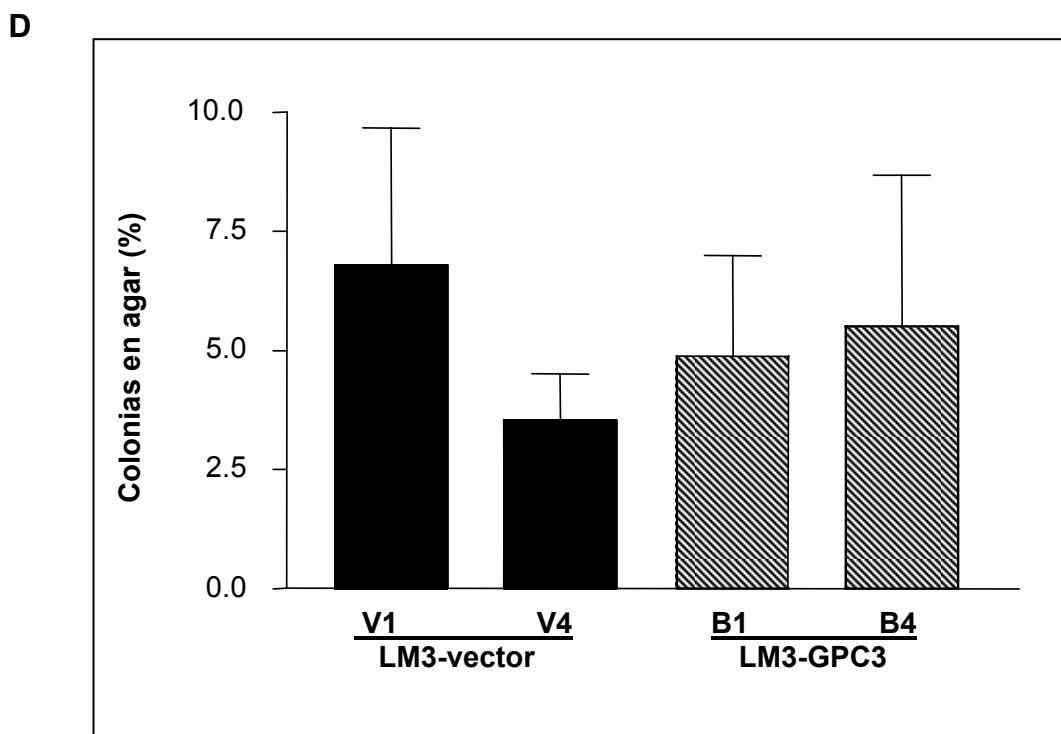
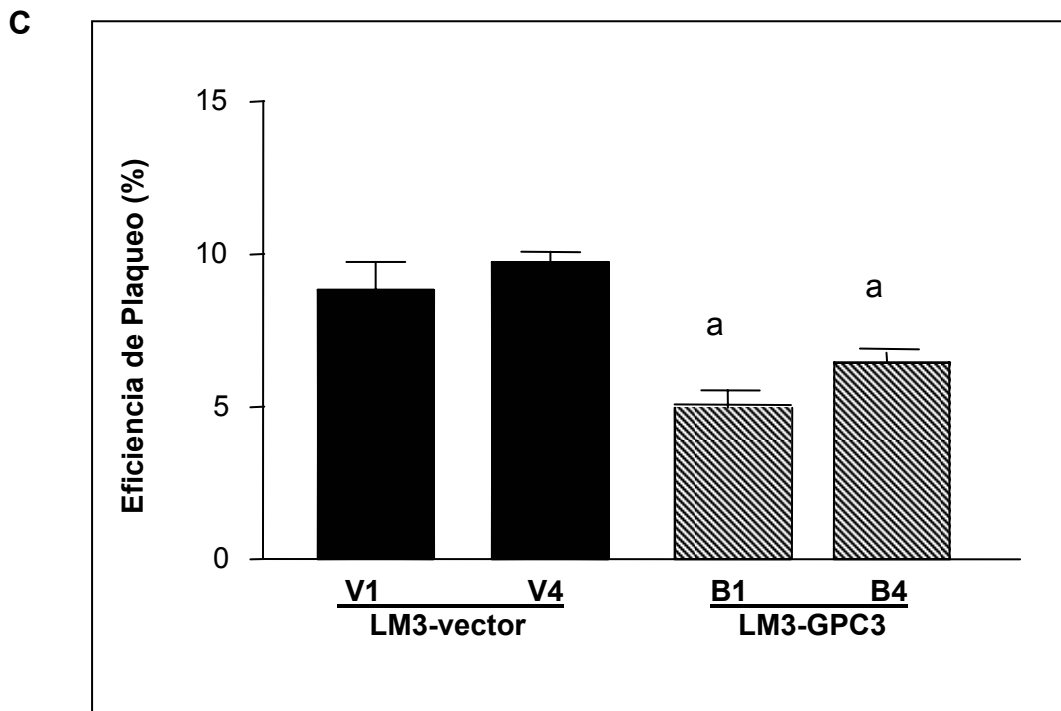
También se evaluó la capacidad de las células control y de las que expresan GPC3 de crecer y formar colonias en agar blando. Se calculó el porcentaje de células capaces de formar colonias de más de 10 células como medida de la capacidad de crecer independientemente del anclaje. Como puede verse en la Figura 26 D, GPC3 fue incapaz de modular la capacidad de las células LM3 de formar colonias en agar blando.

**A**



**B**





**Figura 26. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el crecimiento *in vitro* de las células LM3**

**A- Características morfológicas de las células transfectadas:** Todos los clones presentaron características morfológicas similares, creciendo en monocapas de células epiteliales polihédricas (400X).

**B- Proliferación celular:** La capacidad de proliferación de los clones estudiados fue evaluada a distintos tiempos por el contenido total de proteínas de las monocapas. Los valores representan la media±DS. Resultados similares fueron obtenidos en 3 experimentos independientes.

**C- Capacidad clonogénica:** Para evaluar el crecimiento a baja densidad celular, se sembraron células monodispersas y 8 días después se contaron las colonias formadas. La figura muestra los resultados de 1 experimento representativo de otros 3.

a  $p < 0,001$  vs. clones control, Test ANOVA Scheffe.

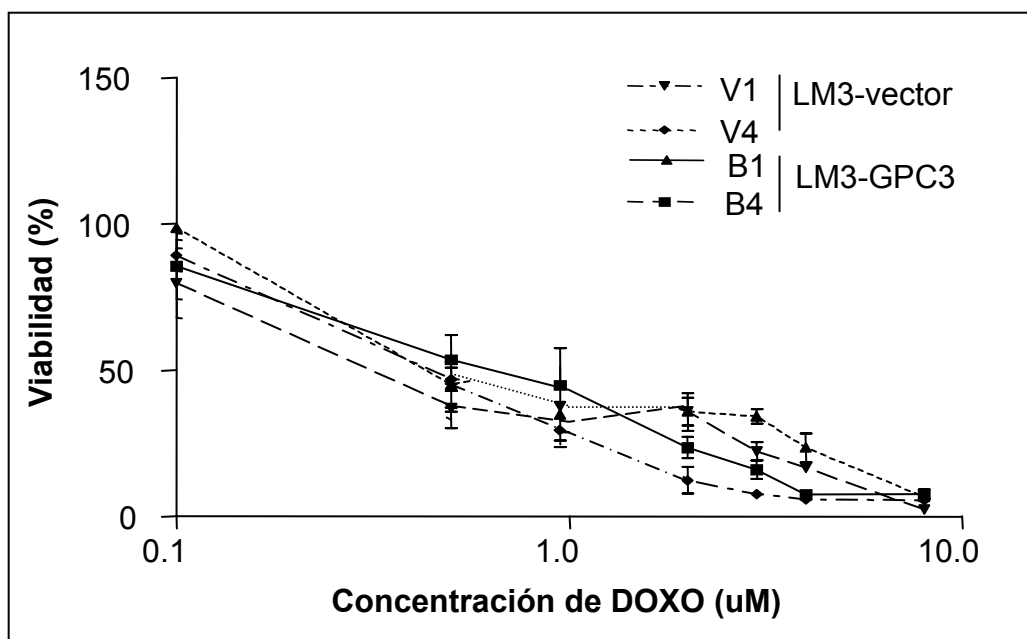
**D- Crecimiento independiente de anclaje:** Este parámetro fue definido como el porcentaje de células capaces de formar colonias de más de 10 células en agar blando. Los valores son expresados como la media+DS. Otros 2 experimentos independientes dieron resultados similares.

## **b- Susceptibilidad a la muerte celular**

Distintas evidencias sugieren que GPC3 está involucrado en el control de la supervivencia celular en la glándula mamaria. GPC3 es capaz de inducir apoptosis cuando es transfectado en células MCF-7, una línea celular de cáncer mamario humano que no expresa GPC3 [293]. Esta inducción de la apoptosis mediada por GPC3 parece ser específica del tipo celular. Es por ello que se decidió estudiar la capacidad de las células LM3 que expresan GPC3 de sobrevivir frente a distintos estímulos inductores de muerte.

### **Respuesta a agentes citotóxicos**

Se realizó una curva dosis-respuesta a la Doxorubicina, para evaluar si GPC3 es capaz de modular la respuesta a las drogas citotóxicas. La citotoxicidad fue evaluada de manera indirecta mediante el Ensayo de Proliferación no radiactivo *Cell Titer 96 TM* (Promega Corp.), que mide la actividad metabólica mediante la formación de formazán como medida de viabilidad. No se observaron diferencias entre los clones LM3-GPC3 y los control, siendo la  $IC_{50} = 0,5 \mu M$  (Figura 27).



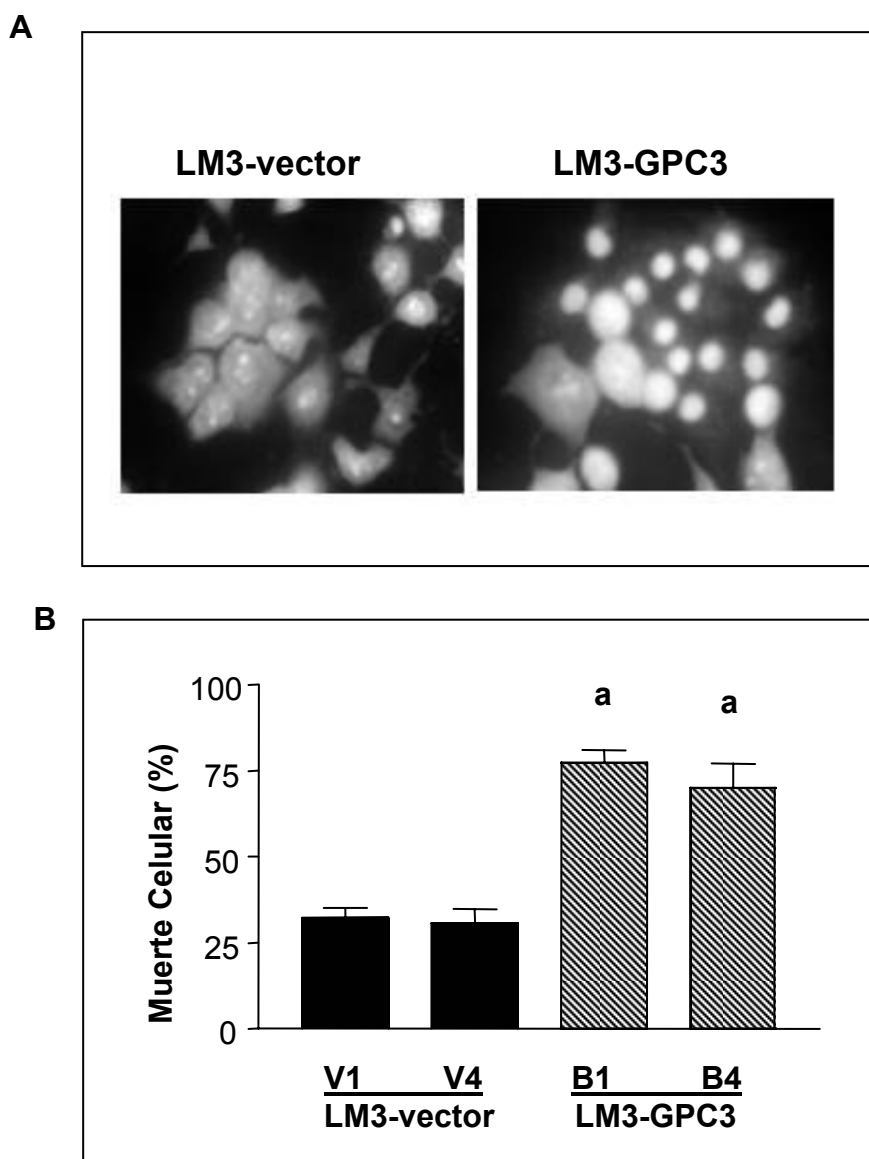
**Figura 27. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la respuesta de las células LM3 al agente citotóxico Doxorubicina**

Monocapas subconfluentes de las células LM3-vector y de las LM3-GPC3 fueron tratadas con concentraciones crecientes de Doxorubicina. La viabilidad celular se calculó de manera indirecta mediante el Ensayo de Proliferación no radiactivo *Cell Titer 96 TM*. Los valores expresados en el gráfico corresponden a la media $\pm$ DS. Este es un experimento representativo de 3 independientes.

### **Muerte celular inducida por privación de nutrientes**

Para evaluar el efecto de la eliminación de nutrientes, monocapas subconfluentes de los distintos clones fueron incubadas durante 96 horas en ausencia de SFB. Al teñir las células privadas de suero con naranja de acridina, los clones que expresan GPC3 mostraron alteraciones morfológicas características de apoptosis, tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear (Figura 28 A). Un alto porcentaje de las células LM3-GPC3 presentaron una marcada disminución de su tamaño, un aumento de la densidad citoplasmática y una importante condensación de la cromatina. Algunas de estas células estaban ya en las etapas finales de la apoptosis, apareciendo fragmentadas en múltiples y pequeños cuerpos apoptóticos. Por su parte, las células LM3-vector se mostraron más resistentes a la privación de nutrientes. El porcentaje de muerte

celular fue cuantificado por el ensayo de exclusión con Azul de Trypan. Como puede verse en la Figura 28 B, las células LM3-GPC3 fueron significativamente más sensibles a la apoptosis inducida por privación de nutrientes.



**Figura 28. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la susceptibilidad a la muerte celular inducida por privación de nutrientes de las células LM3**

Las monocapas subconfluentes fueron incubadas en medio libre de SFB por 96 horas. **A-** La apoptosis fue detectada por tinción con naranja de acridina. Los clones que expresan GPC3 mostraron alteraciones morfológicas características de la apoptosis (400 X).

**B-** La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión con Azul de Trypan. Los datos están expresados como el porcentaje de muerte celular, calculándose la media $\pm$ DS de triplicados. Resultados similares fueron obtenidos en otros 2 experimentos.

a  $p < 0,001$  vs. clones control, Test ANOVA Scheffe.

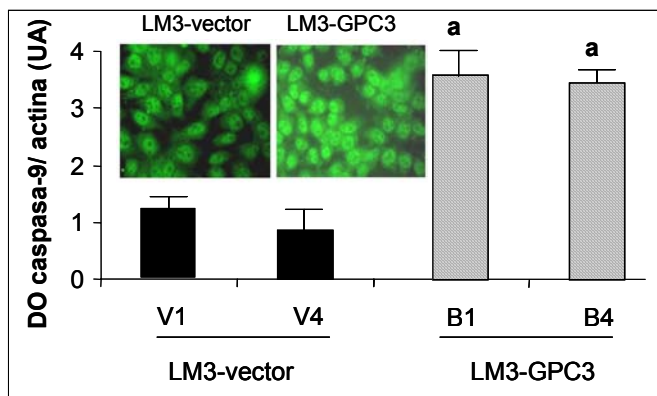
### c- Expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis

Debido a la diferente susceptibilidad encontrada en la muerte celular inducida por privación de nutrientes, y a que GPC3 ha sido involucrado en el control de la supervivencia/apoptosis, se decidió analizar la expresión de proteínas claves en el proceso apoptótico.

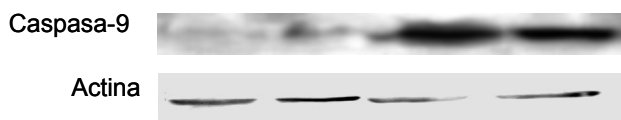
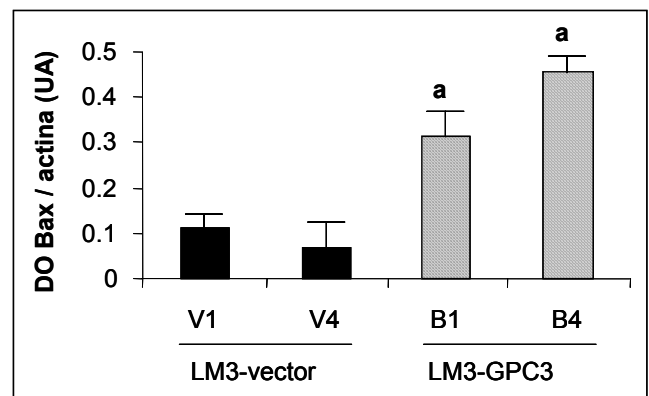
Se estudió, mediante WB y en algunos casos por IF, la expresión de las proteínas pro-apoptóticas caspasa-9 y Bax, y de las anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, a partir de células creciendo en presencia o en ausencia de SFB.

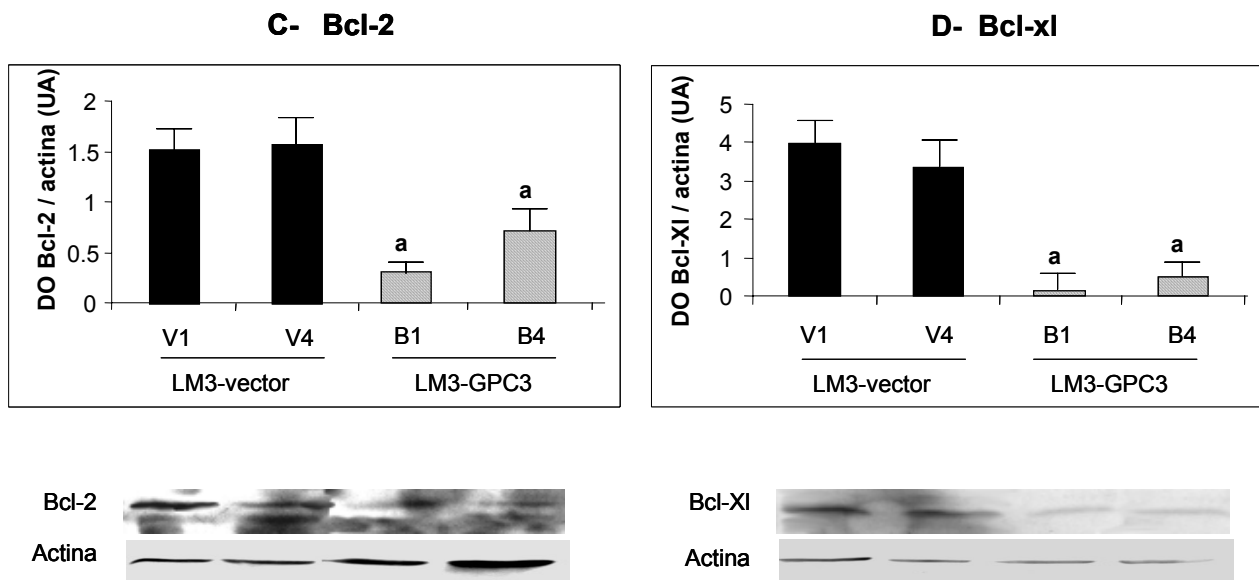
La expresión de GPC3 indujo un aumento significativo en los niveles de expresión basal de caspasa-9 con respecto a las células control (Figura 29 A). La expresión basal de Bax fue también mayor en las células LM3-GPC3 que en las LM3-vector (Figura 29 B). Por otro lado, GPC3 indujo una significativa reducción en el nivel de expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> (Figura 29 C y D). Se pudo ver que la eliminación del SFB durante 48 o 72 horas no afectó la expresión de ninguna de las moléculas estudiadas (datos no mostrados).

**A- Caspasa-9**



**B- Bax**





**Figura 29. Expresión moléculas reguladoras de la apoptosis**

Los extractos proteicos de las células LM3-GPC3 y LM3-vector fueron analizados por WB como se indica en Materiales y Métodos. El nivel de expresión de cada antígeno fue cuantificado y representado mediante los siguientes histogramas: **A-** Caspasa-9. *Inset:* IF, **B-** Bax, **C-** Bcl-2, **D-** Bcl-XI. En todos los casos se incluye actina como control de siembra. El experimento es representativo de otro independiente.

a  $p < 0,05$  vs. clones control, test Chi Cuadrado.

#### **d- Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular**

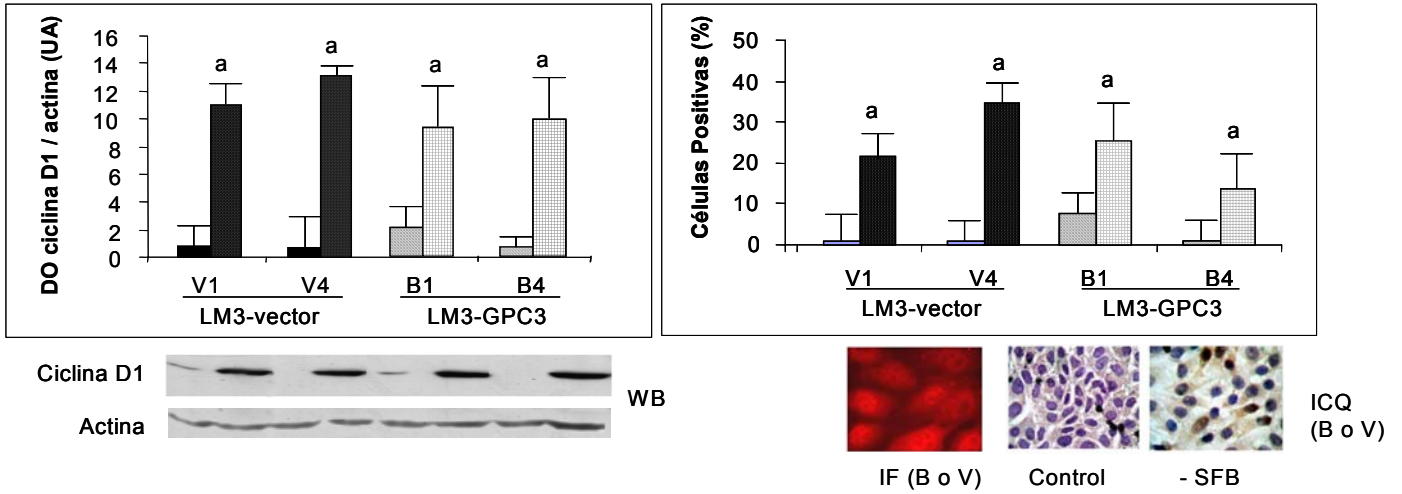
Como es sabido, distintas moléculas son capaces de censar las condiciones del medio ambiente y, cuando éstas no son favorables, pueden enviar señales inhibitorias de la proliferación. Debido al hecho de que las células LM3-GPC3 responden distinto ante la eliminación de nutrientes que las células LM3-vector, se decidió analizar el nivel de expresión de proteínas claves en el control del ciclo celular bajo estas condiciones de estrés.

Mediante WB, ICQ e IF en algunos casos, se analizó la expresión de las ciclinas D1 y B1, así como también de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p16, p21 y p27 (Figura 30). La reexpresión de GPC3 en las células LM3 no causó ningún efecto sobre la expresión basal de las ciclinas D1 y B1, como así tampoco del CDKI p16 (Figura 30 A, B y C). En cambio, tanto por WB como por ICQ, se detectaron mayores niveles de expresión de los CDKIs p21 y p27 en las células que expresan GPC3 (Figura 30 D y E). Sorprendentemente, la

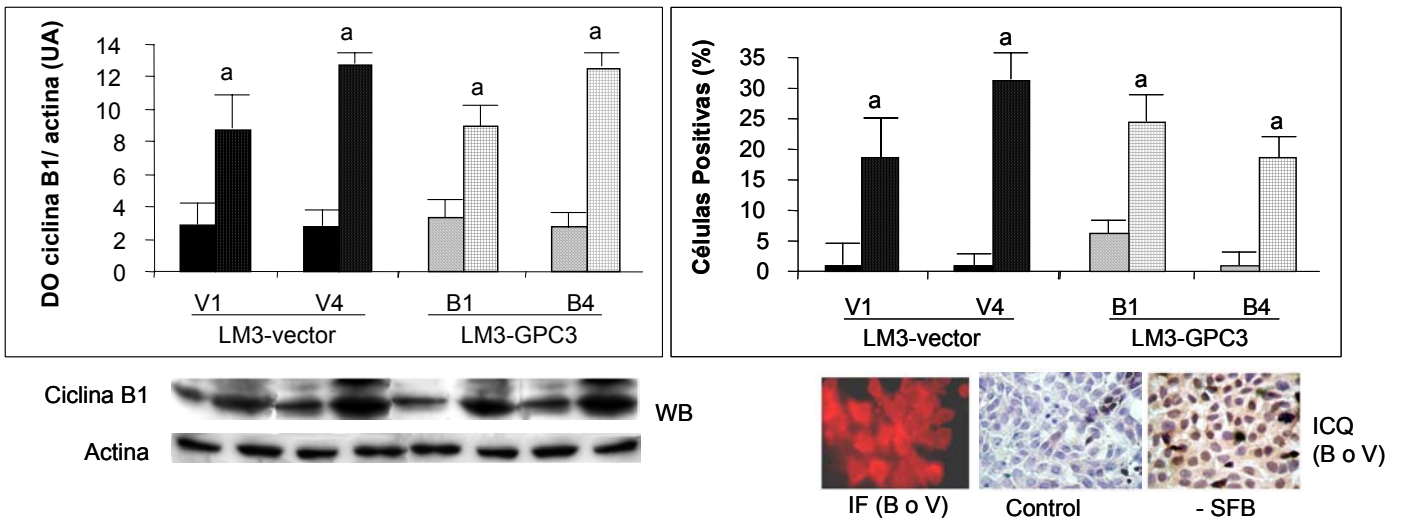


eliminación del SFB indujo un marcado aumento en la expresión de todas las moléculas analizadas, independientemente de la expresión de GPC3.

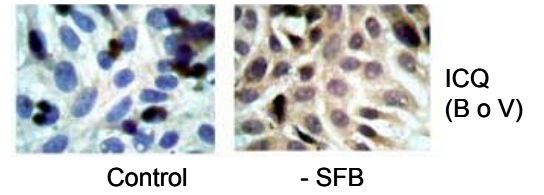
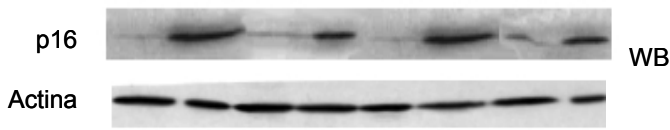
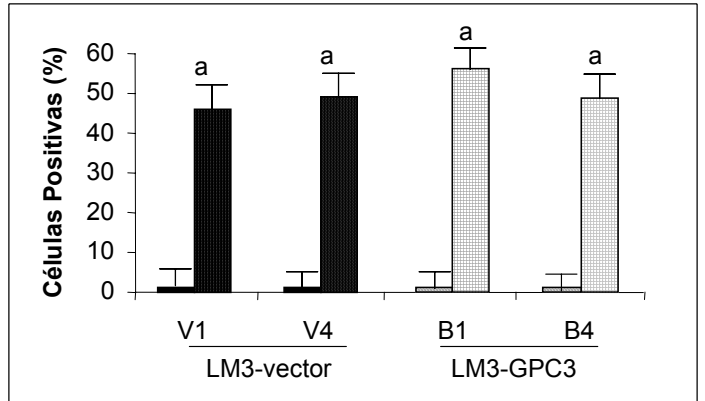
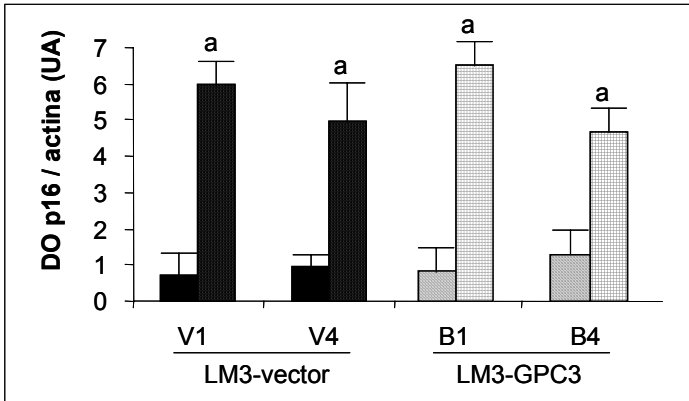
### A- Ciclina D1



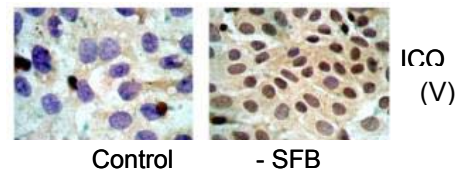
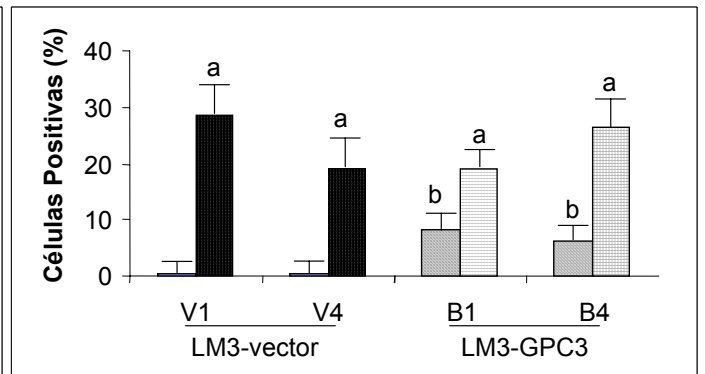
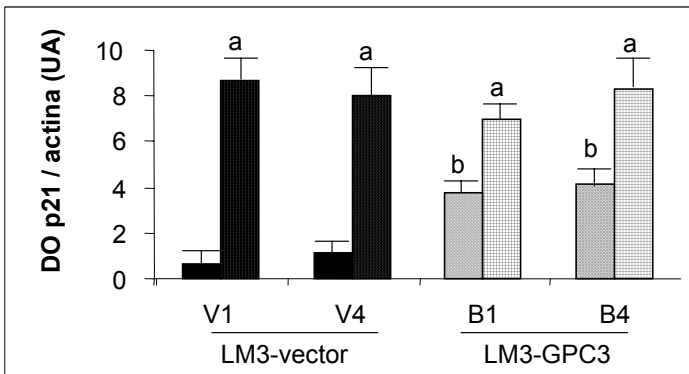
### B- Ciclina B1



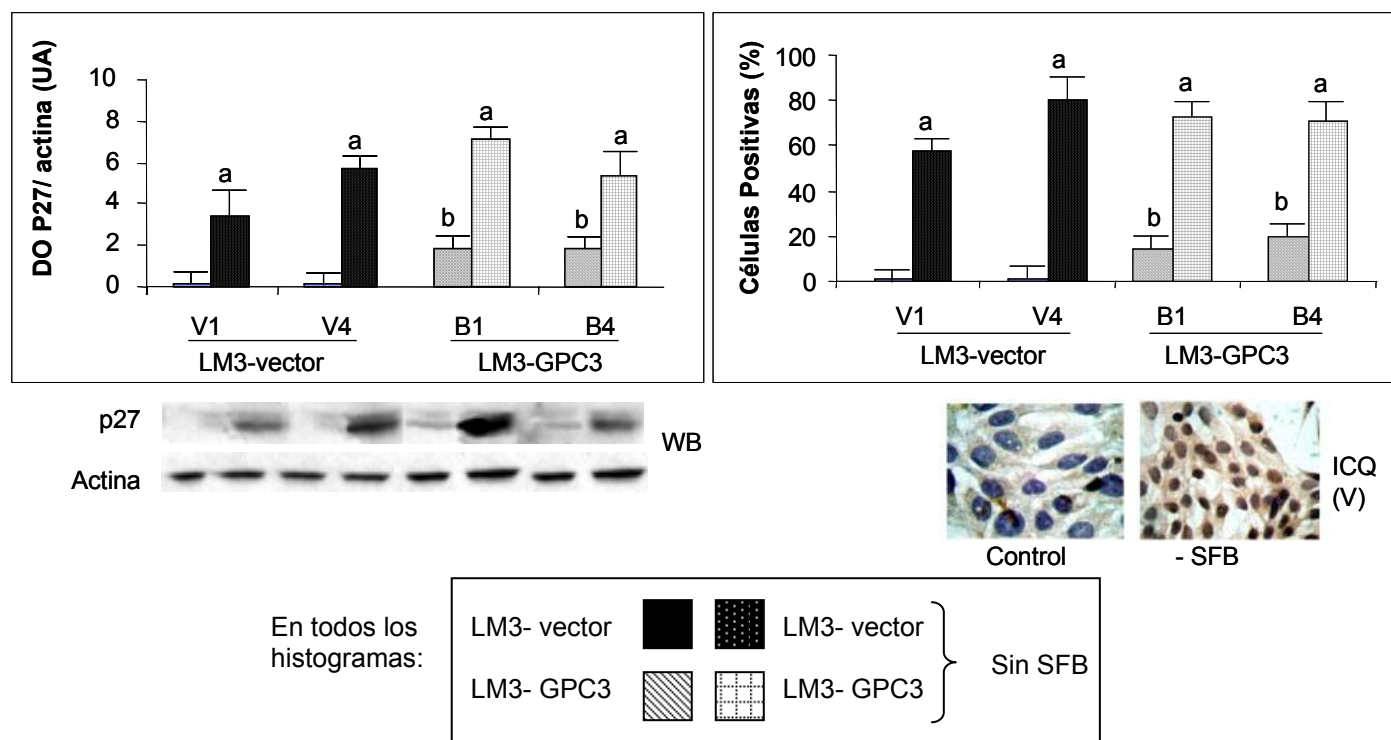
### C- p16



### D- p21



### E- p27



**Figura 30. Expresión moléculas reguladoras del ciclo celular**

Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector creciendo en presencia o en ausencia de SFB fueron analizadas por WB, ICQ e IF como se indica en Materiales y Métodos. El nivel de expresión de cada antígeno fue cuantificado y representado mediante histogramas, donde: **A-** Ciclina D1, **B-** Ciclina B1, **C-** p16, **D-** p21, **E-** p27. En todos los casos se incluye actina como control de siembra para el WB. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

a  $p < 0,05$  vs. el mismo tipo celular en presencia de SFB, Test Chi cuadrado.

b  $p < 0,05$  vs. clones control, Test Chi Cuadrado.

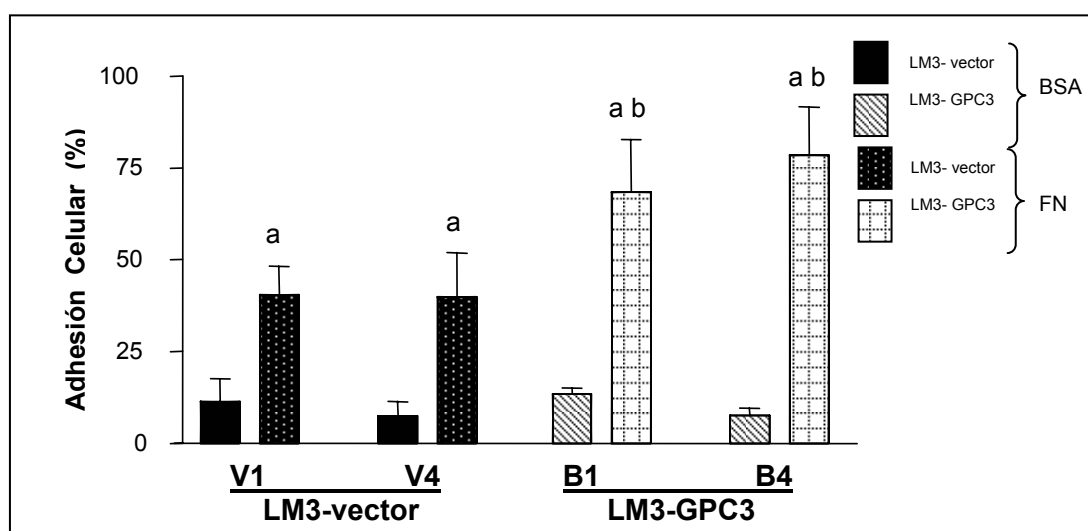
### e- Propiedades de adhesión y expresión de moléculas de adhesión relevantes

Como se mencionó en la Introducción, la capacidad de las células neoplásicas de desprenderse del tumor, invadir los tejidos vecinos y colonizar órganos alejados del sitio primario, constituye un proceso fisiopatológico de profunda relevancia clínica. Como ocurre en la formación de un tumor primario, el éxito de la invasión y la metástasis depende en gran medida de que la célula tumoral sea capaz de modificarse y adquirir capacidades especiales. Aunque los determinantes genéticos y bioquímicos de estas capacidades no son completamente conocidos, se sabe que alteraciones de proteínas involucradas en la adhesión celular pueden mediar estos procesos. Como las células LM3-

GPC3 demostraron ser menos invasivas y metastásicas *in vivo*, se decidió analizar su capacidad de adhesión *in vitro*, así como también la expresión de moléculas involucradas en dicho evento.

### Adhesión a Fibronectina

La ME se caracteriza por ser una red tridimensional compleja constituida principalmente por colágeno y glicosaminoglicanos, como así también por laminina, fibronectina (FN), vitronectina y trombospondina. Se decidió analizar entonces la capacidad de las células LM3-GPC3 y de las LM3-vector de adherirse al componente de la matriz extracelular FN. Para ello, las células de los distintos clones fueron sembradas en hoyos previamente recubiertos con FN o con el sustrato control sero albúmina bovina (BSA). La tasa de adhesión celular fue expresada como el porcentaje de células adheridas después de 30 minutos de su siembra. Como puede observarse en la Figura 31, no se detectaron diferencias en la adhesión a BSA entre los diferentes clones. Sin embargo, ambos tipos de clones fueron significativamente más adherentes a FN que al sustrato control BSA, siendo las células LM3-GPC3 aún más adherentes a FN que las células LM3-vector.



**Figura 31. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la capacidad de las células LM3 de adherirse a FN**

La adhesión celular fue expresada como el porcentaje de células capaces de adherirse al sustrato FN. Cada valor representa la media+DS. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

a  $p < 0,001$  vs. el mismo tipo celular adherido a BSA, test de ANOVA de Scheffe.

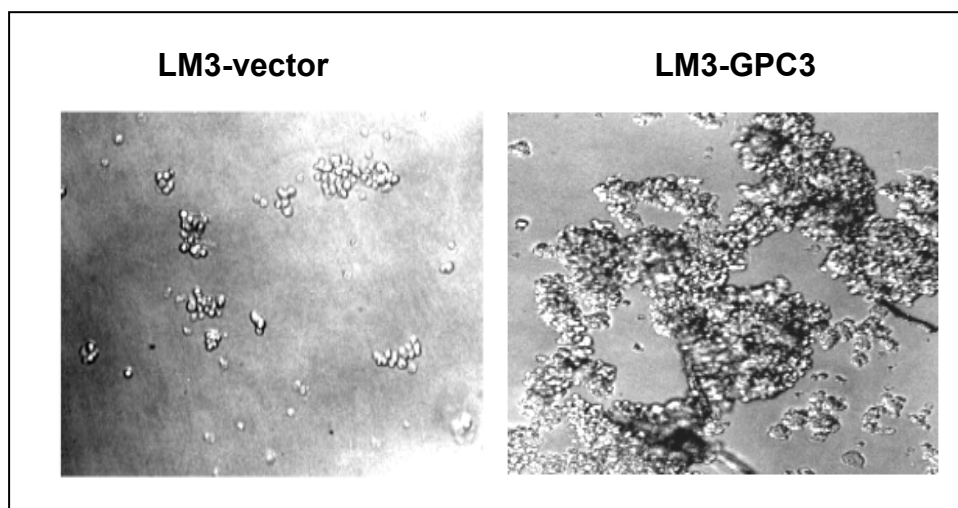
b  $p < 0,05$  vs. células LM3-vector adheridas a FN, test de ANOVA Scheffe.

Por otro lado, conociendo que las células parentales LM3 no producen FN celular aunque aparentemente no tienen alteraciones en el gen correspondiente [354], estudiamos si GPC3 era capaz de inducir la reexpresión de esta molécula. Mediante IF se determinó que las células LM3-GPC3, al igual que las LM3-vector, no son capaces de producir y ni de secretar FN celular (datos no mostrados).

### **Adhesión homotípica**

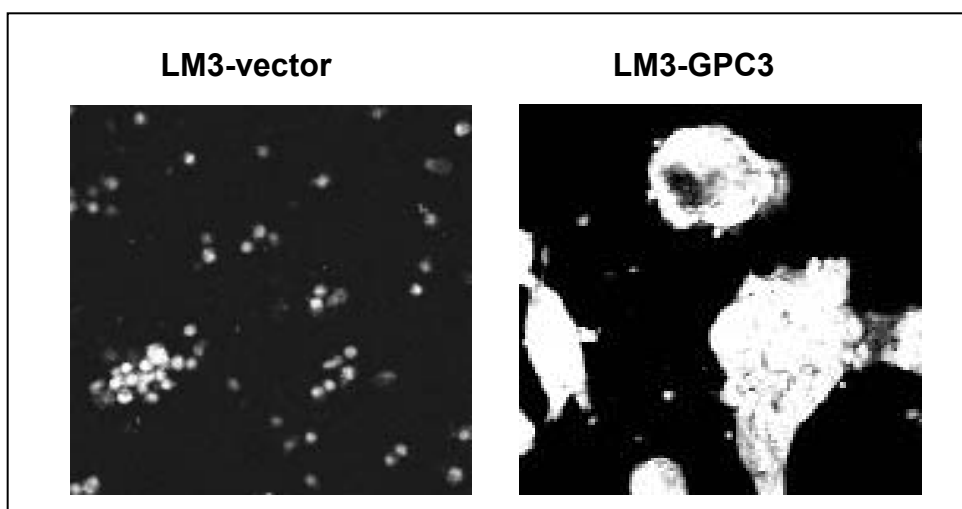
La adhesión célula a célula determina la polaridad de las células y participa en el mantenimiento funcional y estructural de los tejidos. Su disminución permite a las células tumorales desobedecer el orden tisular, lo que resulta en la destrucción de la estructura, marca morfológica de los tumores malignos. Durante la progresión del cáncer, se reduce la adhesión intercelular, las células se vuelven más móviles y adquieren capacidad invasiva. Con el objetivo de determinar si GPC3 es capaz de modular la adhesión célula a célula, los distintos clones fueron cultivados en suspensión en medio líquido sobre una capa de agar nutritivo. Así pudo observarse que transcurridas 48 horas post-siembra, las células control se mantuvieron separadas o formaron agregados celulares pequeños. En cambio, las células LM3-GPC3 mostraron una alta adhesión homotípica, formando grupos mayores de 50 células (Figura 32). Por lo tanto, la reexpresión de GPC3 en células de la línea LM3 logra revertir la pérdida de adhesión célula a célula, característica de los tumores más invasivos.

Al analizar los esferoides de células LM3-GPC3, previamente teñidos con yoduro de propidio, por microscopía confocal de fluorescencia, pudo observarse la formación de estructuras con lumen en su interior. Esta organización es característica de las células epiteliales mamarias normales, que siguen un patrón estructural organizado. Los esferoides LM3-vector, en cambio, no formaron estructuras de tipo glandular (**Figura 33**). Por lo tanto, la reexpresión de GPC3 podría estar induciendo una reorganización de las células tumorales LM3, alcanzando así una estructura más parecida a la del tejido normal.



**Figura 32. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la adhesión homotípica de las células LM3**

Las células de los distintos clones fueron cultivadas en suspensión (en medio líquido) sobre una capa de agar, impidiéndose de esta forma su anclaje. A las 48 horas post-siembr, los grupos celulares así generados fueron fotografiados (microscopía de contraste de fase, X200).



**Figura 33. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la organización estructural de los esferoides LM3**

Las células de los distintos clones fueron cultivadas sobre una capa de agar. A las 48 horas post-siembr, los esferoides se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por microscopía

confocal (X200). En la figura se muestra una estructura típica de los esferoides que expresan GPC3 (derecha), donde la flecha señala el lumen, y de los esferoides control (izquierda).

### **Expresión de moléculas de adhesión**

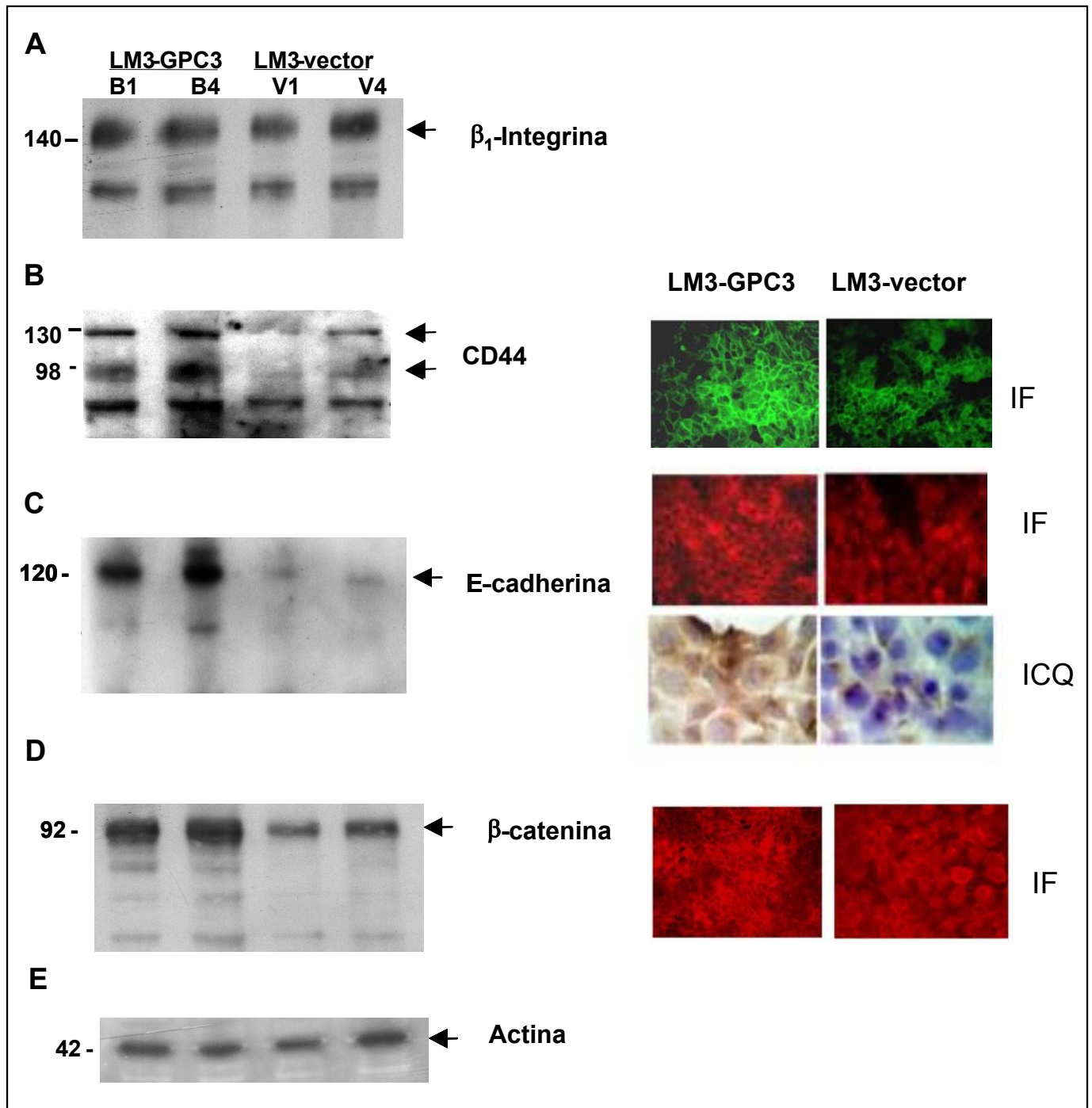
Debido a las diferencias encontradas en la capacidad de adhesión entre las células LM3-GPC3 y las LM3-vector, se decidió estudiar la expresión de moléculas relevantes en la adhesión celular.

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que reconocen distintos componentes de la ME (como FN), cuya expresión se ve modificada en las células invasivas y metastásicas. Como se encontraron diferencias en la capacidad de adhesión a FN entre las células LM3-GPC3 y las LM3-vector, se decidió analizar si GPC3 modula la expresión del principal receptor de FN (la integrina  $\alpha v \beta 1$ ). Sin embargo, se determinó mediante WB que las células LM3-GPC3 y las LM3-vector expresan niveles similares de la integrina  $\beta_1$  (Figura 34 A).

CD44 es una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor del glicosaminoglicano hialuronato (HA), aunque algunas modificaciones post-traduccionales pueden permitirle interactuar con proteínas de la ME, como FN [362]. En este trabajo de tesis, y en concordancia con la mayor adhesión a FN encontrada en las células LM3-GPC3, se determinó por WB e IF que GPC3 es capaz de inducir un aumento en la expresión de CD44 (Figura 34 B).

La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana asociada a la adhesión célula a célula, cuya expresión está frecuentemente disminuida en los carcinomas altamente invasivos [363]. Dada las diferencias observadas entre las células LM3-GPC3 y las LM3-vector en el comportamiento invasivo/metastásico *in vivo*, y en la adhesión homotípica *in vitro*, se decidió analizar el nivel de expresión de E-cadherina por WB, IHQ e IF. Así, se determinó que las células LM3-GPC3 presentan un incremento significativo en la expresión de E-cadherina cuando se las compara con las células control (Figura 34 C).

Las cadherinas clásicas se caracterizan por formar complejos con las cateninas. Contundentemente, en este trabajo se encontró que la expresión de  $\beta$ -catenina está aumentada en aquellas células que expresan GPC3, medido por WB e IF (Figura 34 D).



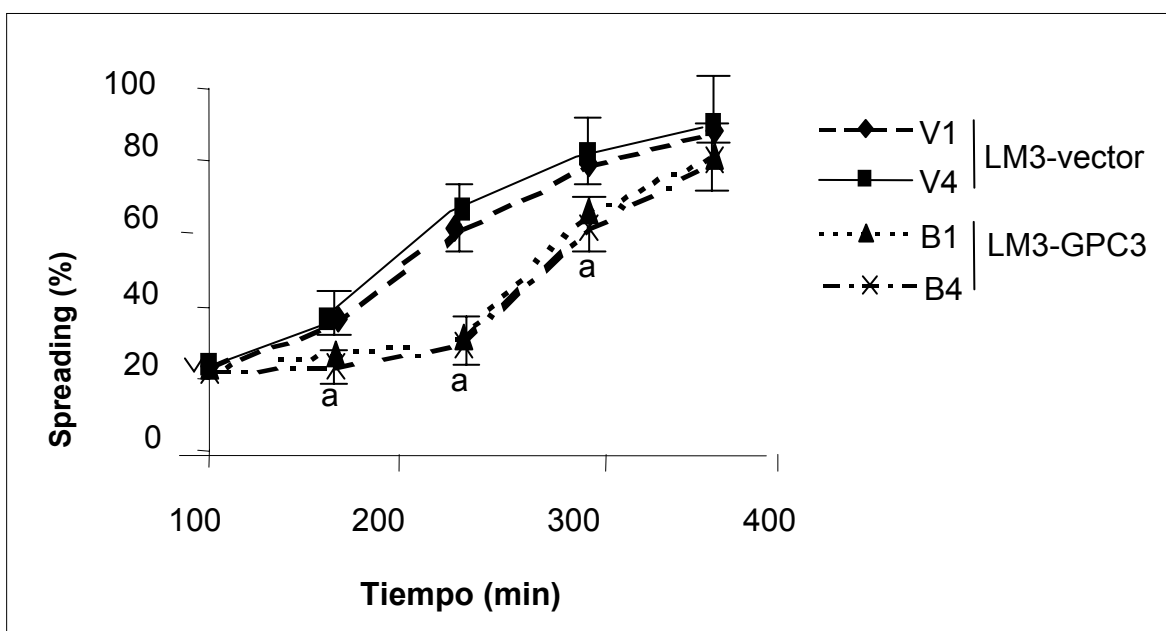
**Figura 34. Efecto de GPC3 sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión en las células LM3**

Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron analizados por WB, IF e ICQ, según se indica. **A-**  $\beta_1$ -integrina, **B-** CD44, **C-** E-cadherina, **D-**  $\beta$ -catenina, **E-** actina (control de siembra). A la izquierda se muestran WB representativos, donde los números indican el PM expresado en kDa. A la derecha se ven fotografías de las IF e ICQ.



#### f- Ensayo de *spreading* celular

El *spreading*, o extensión sobre el sustrato, es una de las primeras etapas de la migración celular. Para determinar si la reexpresión de GPC3 es capaz de modificar el *spreading* de las células LM3, se realizaron las curvas correspondientes mediante la observación microscópica. Se definió que las células redondeadas refringentes corresponden al grupo de *no spreading*, mientras que la presencia de lamelas y/o filopodios es indicativa de *spreading* celular. Las células LM3 que expresan GPC3 presentaron un significativo retraso en las primeras etapas del *spreading* (150 a 300 minutos) sobre plástico. Sin embargo, a los 360 minutos alcanzaron el mismo porcentaje de extensión sobre el sustrato que las células control (Figura 35).



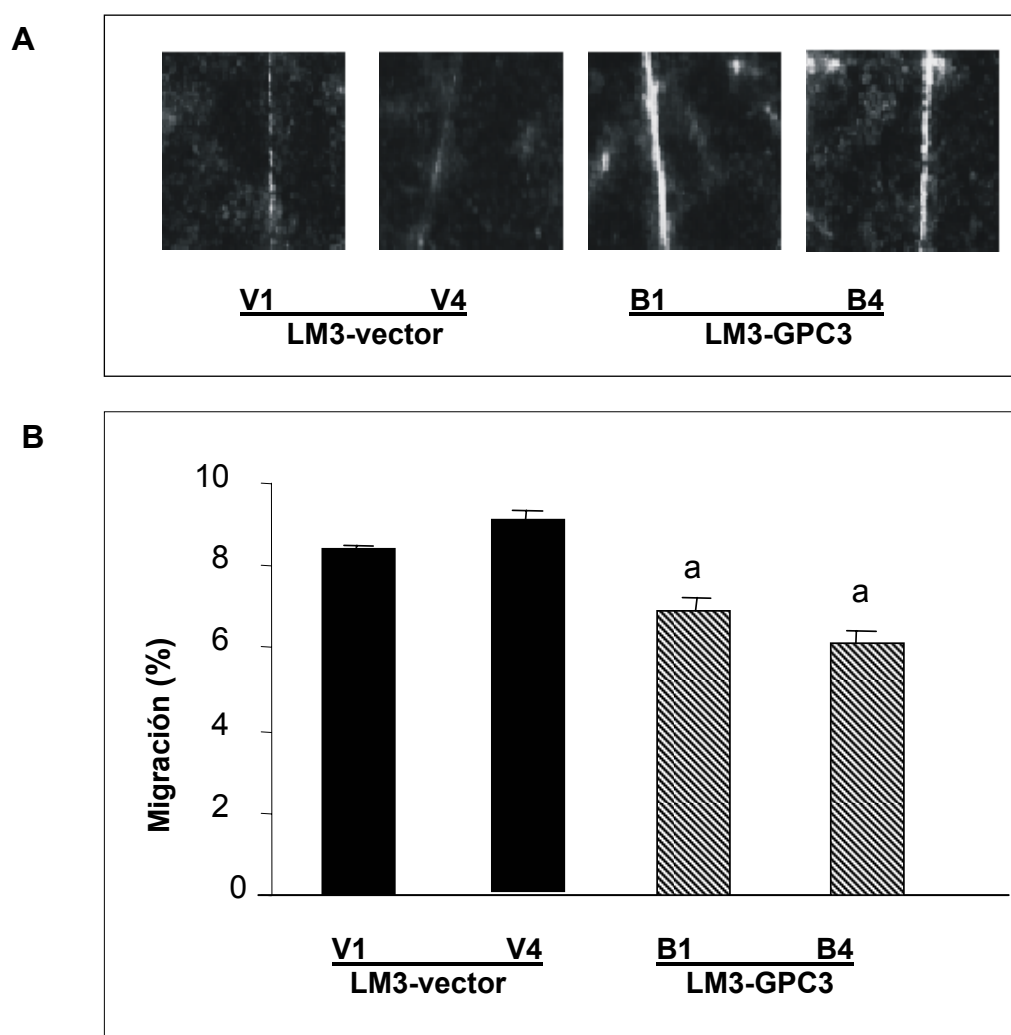
**Figura 35. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el *spreading* de las células LM3**

60 minutos después de que las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron sembradas, se procedió a remover las no adherentes. El porcentaje de *spreading* fue determinado a distintos tiempos. Los datos fueron obtenidos por observación microscópica de campos al azar y al menos por triplicado. Los resultados se presentan como la media ± DS. El experimento es representativo de otros 2 independientes.

a  $p < 0,01$  vs. células control, Test ANOVA Scheffe.

### g- Ensayo de migración celular

Como fue mencionado con anterioridad, para que la célula tumoral invada tejidos próximos y/o distantes es necesario que pueda migrar en forma activa a través de la ME. Por lo tanto, el proceso de migración celular es otro evento clave que define las capacidades invasiva y metastásica.



**Figura 36. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la capacidad migratoria de las células LM3**

Monocapas confluentes fueron sometidas al ensayo de “cicatrización de herida”.

**A-** Transcurridas las 6 horas de realizada la herida, las células fueron fotografiadas (100X).

**B-** La migración celular fue cuantificada por densitometría calculando el área ocupada por las células migrantes y expresada como el porcentaje de la herida original cubierta. Los datos se presentan como la media±DS de cuadruplicados.

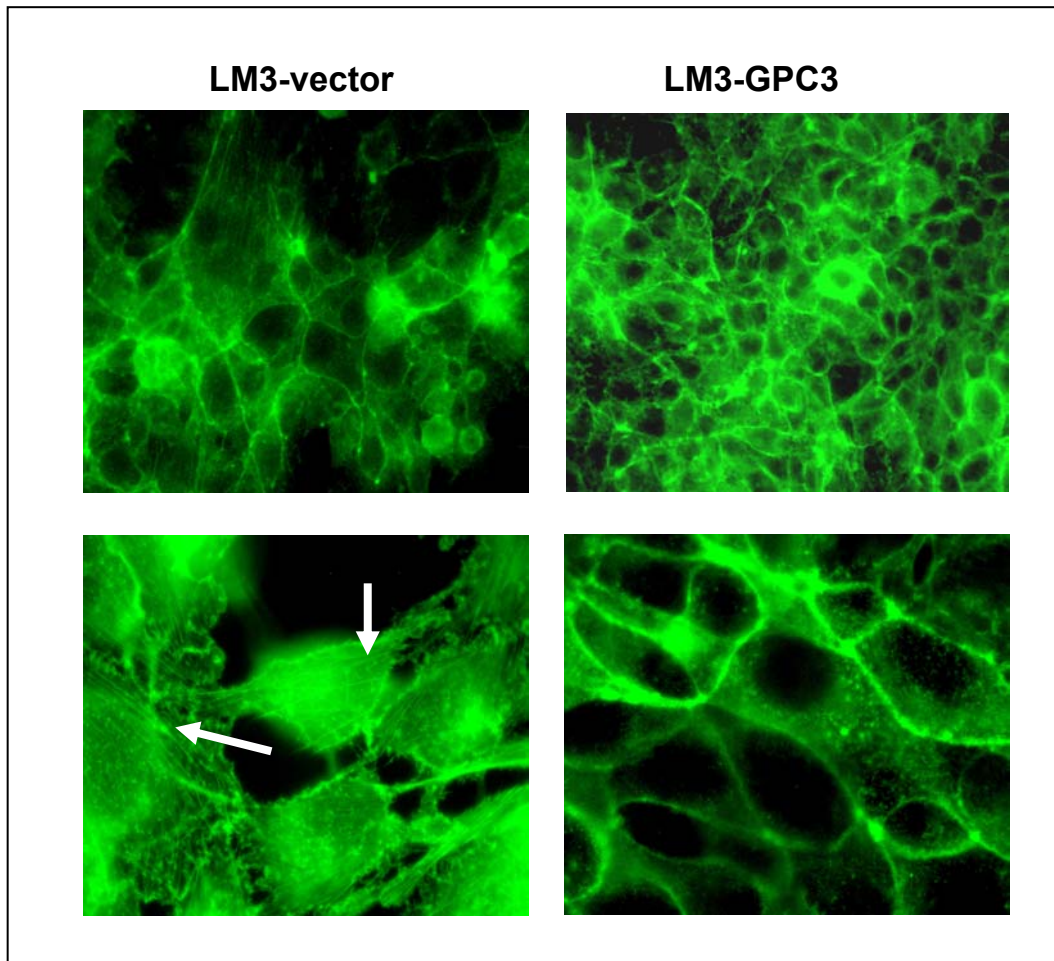
a  $p < 0,05$  vs. células control, Test ANOVA Scheffe.

Debido a la disminución de la invasión y la metástasis observada *in vivo* en las células LM3-GPC3, se decidió analizar *in vitro* si estas células presentan también alteraciones en la capacidad migratoria. Para esto se empleó el ensayo de cicatrización de herida sobre monocapa (*wound healing*). Mientras que después de 6 horas de realizada la herida las células LM3-vector cubrieron el 85% del área libre, las células LM3-GPC3 mostraron una menor capacidad migratoria, ya que sólo cubrieron el 60% de la herida original (Figura 36 A y B). Por lo tanto, la reexpresión de GPC3 produce una reducción de la invasión y la metástasis de las células LM3, probablemente debida, al menos en parte, a una disminución en la capacidad migratoria.

#### **h- Organización del citoesqueleto**

La transición epitelio-mesenquimática (TEM) de las células tumorales tiene un importante papel en el fenotipo invasivo. La organización del citoesqueleto en las células epiteliales ubica a la actina en posición preferentemente cortical. Sin embargo, en las células tumorales que sufren TEM la actina forma fibras de estrés. Con el objetivo de establecer si GPC3 es capaz de modular la organización del citoesqueleto de las células LM3, se realizaron los ensayos descritos a continuación.

Para visualizar el citoesqueleto de actina, las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron incubadas con faloidina-FITC y analizadas con microscopía de fluorescencia. Dado que se trata de células de estirpe epitelial, en ambos grupos experimentales la actina se localizó principalmente en la zona cortical. Sin embargo fue interesante observar que las células LM3-vector también presentaron F-actina organizada en largas fibras de estrés que atravesaban el cuerpo celular. En contraste, la reexpresión de GPC3 indujo un cambio en la distribución de la F-actina, desapareciendo las fibras de estrés y conservándose exclusivamente la localización cortical (Figura 37).



**Figura 37. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la organización del citoesqueleto de actina de las células LM3**

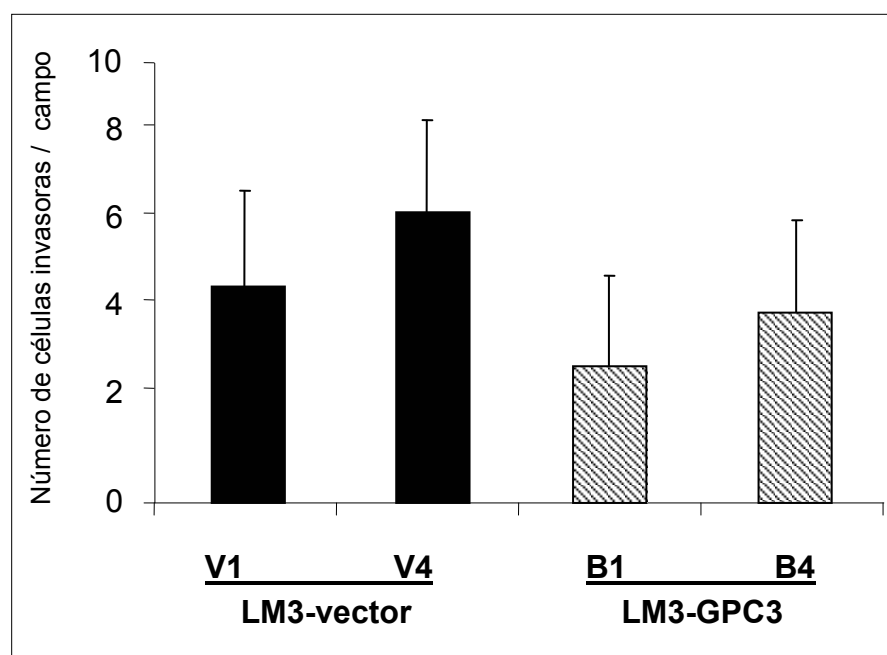
Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron incubadas con faloidina-FITC y analizadas con microscopía de fluorescencia. Las flechas señalan fibras de estrés (arriba: X400, abajo: X1000).

La inducción de TEM en las células epiteliales de mama va acompañada de cambios fenotípicos reversibles que alteran la forma celular y las uniones intercelulares modificando la expresión de moléculas como la vinculina e induciendo la expresión *de novo* de marcadores fibroblásticos, como la vimentina. Dado que la reexpresión de GPC3 produce una redistribución de la actina en las células LM3, se decidió analizar si otras características de la TEM estaban también presentes. La vinculina es una proteína que por lo general aparece localizada en los puntos de adhesión focal, en contacto con las fibras de estrés de F-actina. Al estudiar esta proteína por IF, se vio que ninguno de los

clones parece expresarla (datos no mostrados). La falta de tinción para vinculina en las células LM3 probablemente representa la ausencia o expresión baja de esta proteína, ya que el mismo anticuerpo marcó intensamente en fibroblastos normales usados como control positivo (datos no mostrados). Por otro lado, se analizó también mediante IF si las células LM3 eran capaces de expresar vimentina. Sin embargo, ninguno de los clones fue capaz de expresar este marcador (datos no mostrados).

### i- Ensayos de invasión

Debido a las diferencias observadas en la invasión *in vivo* entre las células LM3-GPC3 y las LM3-vector, se decidió analizar este parámetro también *in vitro*. Así, en primer lugar se utilizaron cámaras *transwell*, consistentes en filtros cubiertos con una membrana basal reconstituida (Matrigel). Si bien las células que expresan GPC3 presentaron menor número de células invasoras por campo analizado, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística (Figura 38).



**Figura 38. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la capacidad invasiva *in vitro* de las células LM3**

Las células LM3-GPC3 y las LM3-vector fueron sembradas en cámaras *transwell*, permitiéndose la invasión de la matriz reconstituida matrigel. El número de células que atravesó la membrana del transwell fue contado bajo microscopio óptico. El histograma representa el número de células

(media±DS) que invadió para cada clon. El experimento es representativo de otros 3 independientes. NS, Test ANOVA Scheffe.

Se decidió entonces probar la actividad invasora de estas células en geles de colágeno. Para ello, los clones LM3-GPC3 y los LM3-vector fueron sembrados sobre geles de colágeno, dejándolos invadir esta matriz durante distintos tiempos (48 o 96 horas). Posteriormente fueron coloreados con yoduro de propidio y analizados mediante la utilización de microscopía confocal. Se determinó que las células LM3-GPC3 y las LM3-vector tampoco presentaron diferencias en su capacidad invasiva de geles de colágeno a ninguno de los tiempos estudiados (datos no mostrados).

#### **j- Secreción de proteasas y su modulación por factores de crecimiento**

Las proteasas son expresadas durante procesos normales, pero también en una forma no regulada en eventos patológicos como la invasión y la metástasis. En general, en los tumores las proteasas están sobreexpresadas, sus inhibidores están disminuidos y las formas inactivas de estas enzimas son convertidas en activas [364]. Entre las principales proteasas asociadas con la capacidad invasiva de las células tumorales se encuentran las metaloproteasas (como la MMP-9 y la MMP-2) y las serino proteasas (como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)). Se decidió estudiar entonces las actividades basales de uPA, MMP-9 y MMP-2, así como también su regulación por factores de crecimiento, para establecer si GPC3 es capaz de ejercer algún tipo de efecto sobre ellas.

- *MMPS*: Para detectar si GPC3 es capaz de modular la producción de las MMPs, los medios condicionados de las células LM3-GPC3 y de las LM3-vector fueron analizados mediante zimografía cuantitativa. Se observó que todas las células estudiadas secretan constitutivamente MMP-9, sin encontrarse diferencias entre los clones que expresan GPC3 y los control. A partir de las zimografías también pudo cuantificarse la actividad constitutiva de la MMP-2, sin encontrarse tampoco diferencias entre los distintos clones.

Para estudiar si el TGF- $\beta$  o el IGF-II eran capaces de modular la secreción de MMP, se utilizaron los medios condicionados de las células LM3-GPC3 y de las LM3-vector tratadas por 24 horas con TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 o - $\beta$ 3 o con IGF-II. Cuando

cualquiera de las isoformas de TGF- $\beta$  fue adicionada, se observó un pronunciado incremento en la actividad MMP-9, tanto en las células LM3-GPC3 como en las controles (Figura 39 A, izquierda). En cambio, no se encontraron diferencias en la actividad de MMP-2 (Figura 39 B, izquierda).

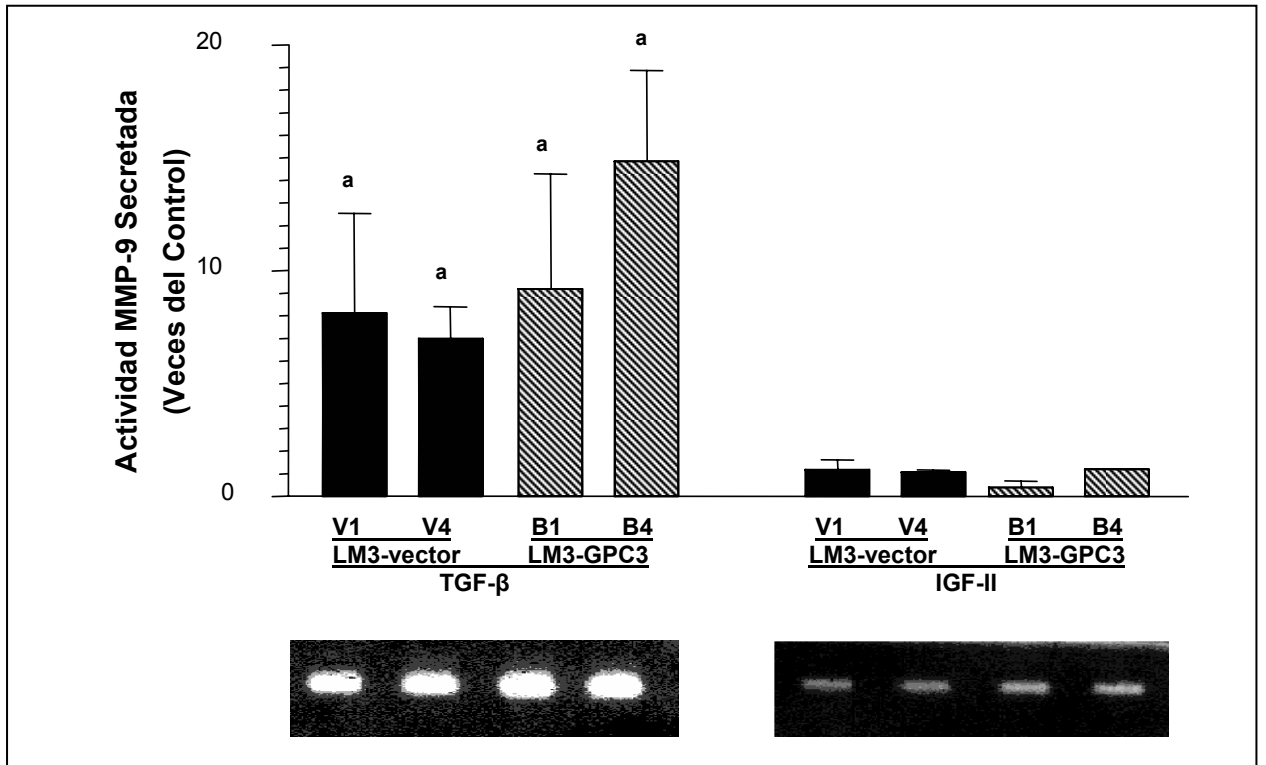
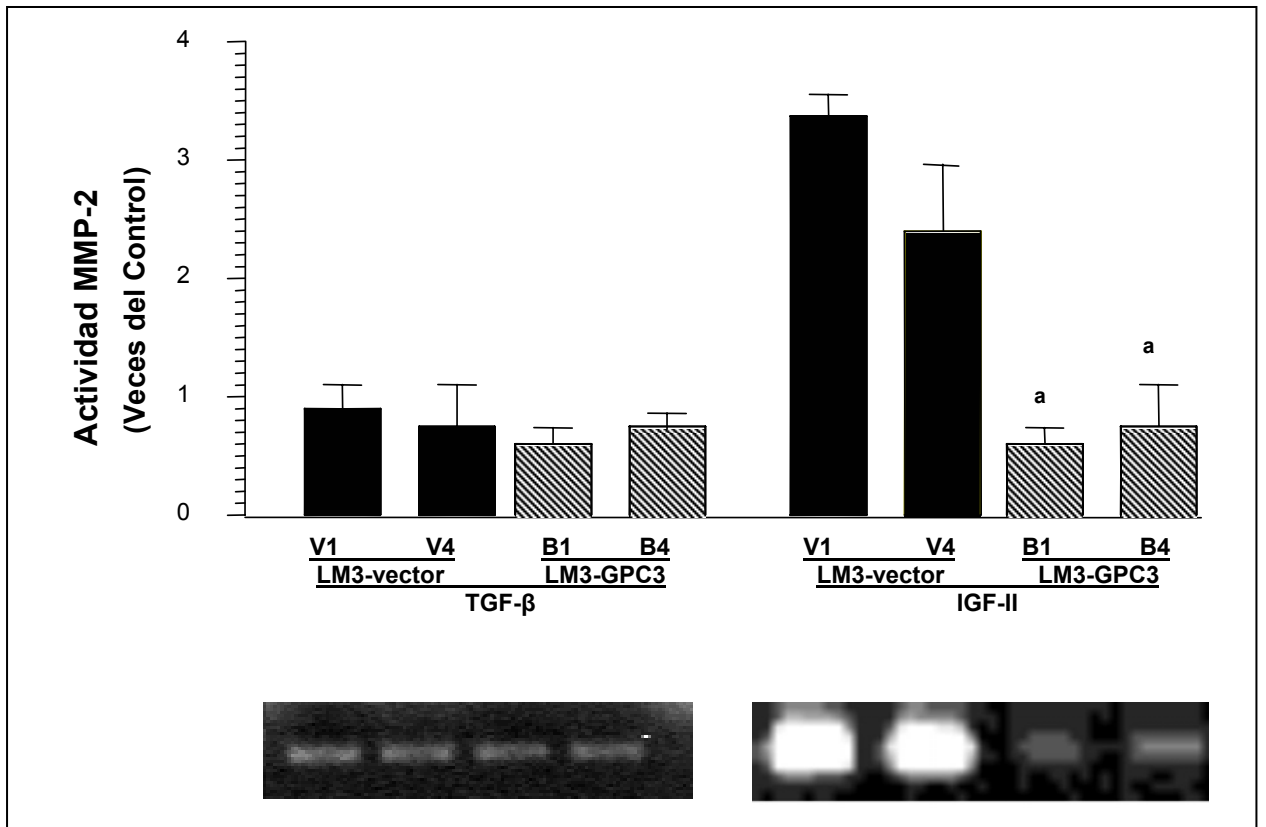
El tratamiento con IGF-II no moduló la actividad de MMP-9 en ninguna de las células estudiadas (Figura 39 A, derecha). En cambio, fue muy interesante la observación de que las células LM3-vector presentaron un aumento de la actividad de MMP-2 cuando fueron tratadas con IGF-II, mientras que este efecto no fue observado en las células LM3-GPC3 (Figura 39 B, derecha).

Además, con el fin de confirmar que la actividad proteolítica se debía exclusivamente a la acción de las MMPs, se realizó el mismo ensayo en presencia de distintos inhibidores de proteasas. Mientras que el PMSF o la aprotinina no alteraron el patrón de bandas en la zimografía, 25 mM de EDTA fueron suficientes para bloquear totalmente la actividad proteolítica detectada (datos no mostrados). Estos resultados confirman que las bandas observadas corresponden a las MMP calcio-dependientes.

- *uPA*: Mediante caseinólisis radial se analizó el efecto de GPC3 sobre la actividad del uPA secretado por las células LM3. Se determinó que la actividad constitutiva de uPA es similar en las células LM3-GPC3 y LM3-vector (Figura 39 C, izquierda).

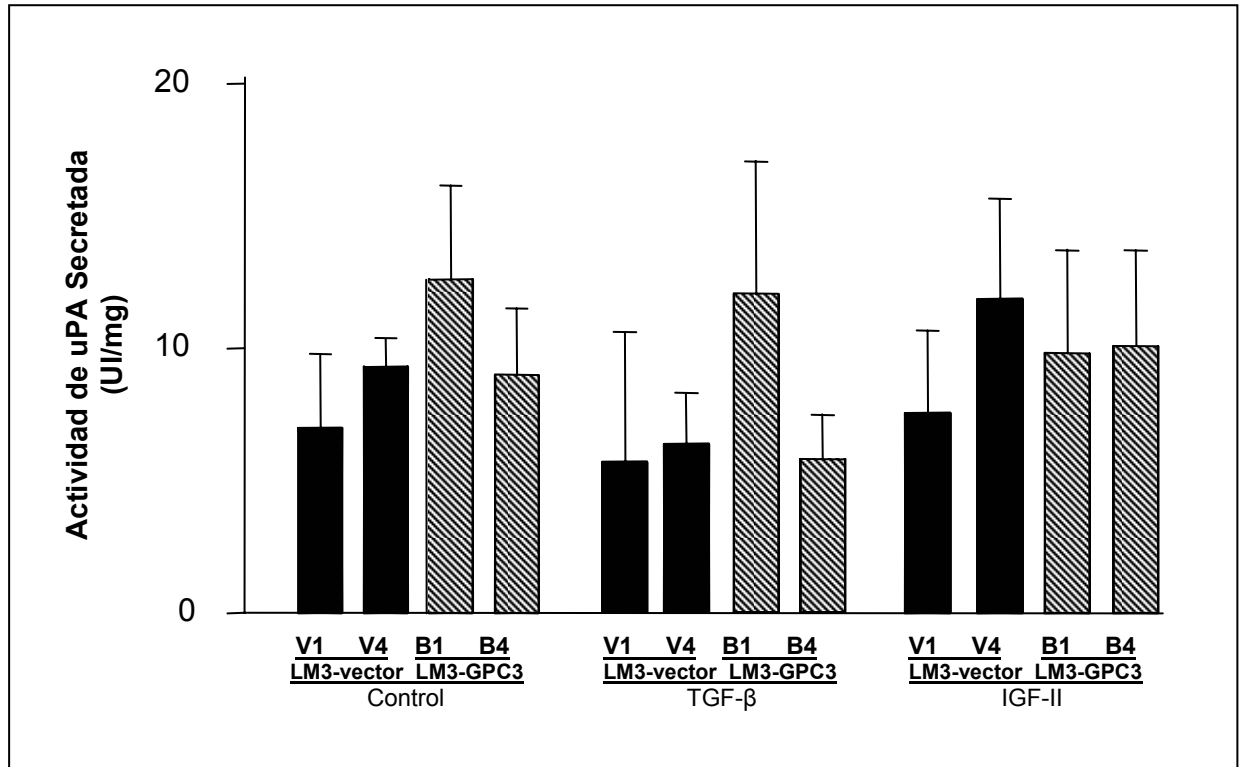
El tratamiento de las células con cualquiera de las isoformas de TGF- $\beta$  o con IGF-II no moduló la actividad de esta enzima en ninguna de las células estudiadas (Figura 39 C).

Para analizar si la expresión de GPC3 era capaz de modular la producción de uPA en las células LM3, se prepararon extractos proteicos a partir de los distintos clones. Mediante WB se pudo determinar que la expresión de uPA celular fue similar en todas las células estudiadas (datos no mostrados).

**A****B**



C



**Figura 39. Efecto de la reexpresión de GPC3 sobre la secreción de proteasas de las células LM3. Regulación por diferentes factores de crecimiento**

Se cosecharon medios condicionados a partir de las células LM3-GPC3 y de las LM3-vector. Para establecer si los TGF-βs o el IGF-II tenían algún efecto sobre la producción de proteasas, los medios condicionados fueron también preparados en presencia de estos factores.

*Zimografías cuantitativas de MMPs (A- MMP-9, B- MMP-2).* Las bandas gelatinolíticas fueron visualizadas por tinción negativa y medidas con un analizador de imágenes. Los valores se expresan en Unidades Arbitrarias (UA) normalizadas por el contenido proteico celular, como la media±DS de duplicados, y son representativos de tres experimentos independientes. Resultados similares se obtuvieron en respuesta a TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3.

a  $p < 0,01$  vs. clones control, Test ANOVA Scheffe.

**C- Caseinólisis radial.** Midiendo los halos de degradación y relativizándolos con una curva estándar, se cuantificó la actividad del uPA secretado al medio condicionado. Los datos se expresan en Unidades Internacionales (UI) normalizadas por proteína celular, como la media±DS de triplicados, y son representativos de cuatro experimentos distintos. Resultados similares se obtuvieron en respuesta a las tres isoformas de TGF-βs.

**PARTE II: Estudio de la expresión de GPC3 y de proteínas  
reguladoras del ciclo celular en pacientes con cáncer de mama  
Utilidad como marcadores tumorales**

**A- Estudio de la expresión de GPC3**

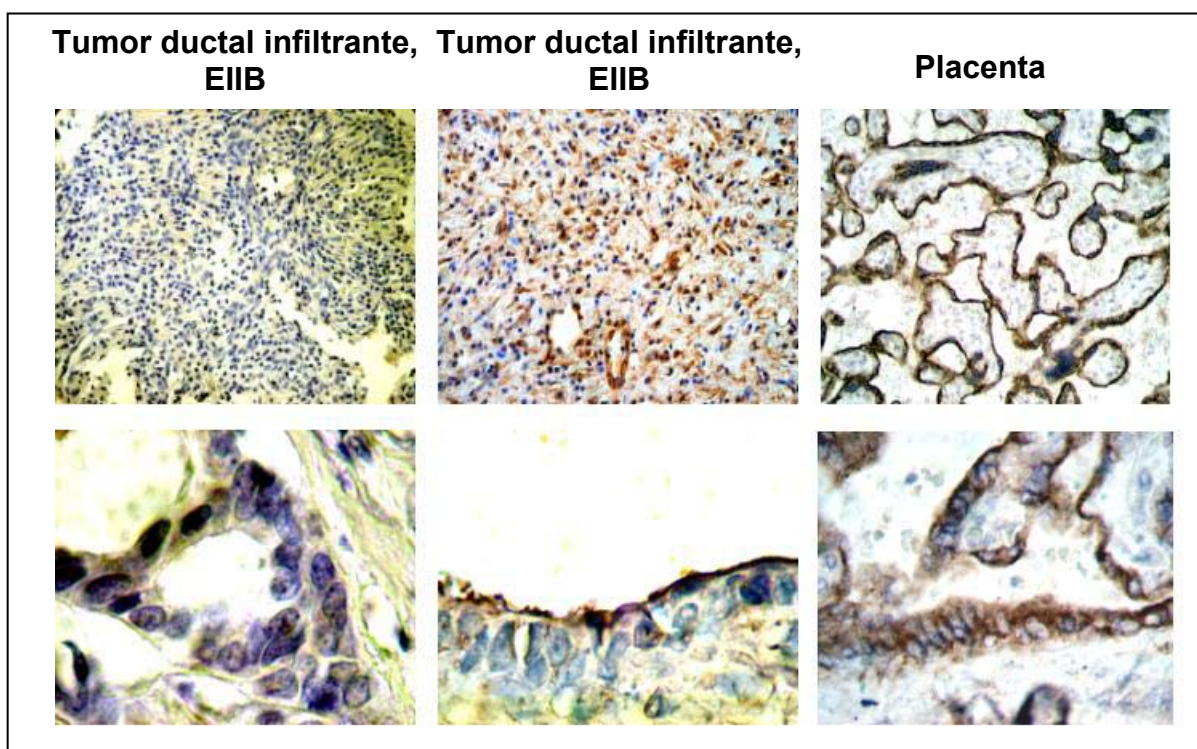
La capacidad de anticiparse a la evolución del cáncer de mama es un objetivo clave en la clínica. La identificación de marcadores tumorales sensibles y específicos para esta patología podría mejorar extremadamente el pronóstico del paciente, ya que permitiría seleccionar más adecuadamente las terapias a seguir en cada caso en particular. Ha sido reportado que el ARNm de GPC3 está disminuido en una gran proporción de tumores de mama [333], pero debido a la inexistencia de anticuerpos anti-GPC3 humano esta disminución no fue investigada a nivel proteico. Sin embargo, actualmente se dispone de un anticuerpo monoclonal específico anti-GPC3 humano desarrollado en el laboratorio del Dr. Jorge Filmus [365], capaz de detectar esta proteína en cortes de tejidos parafinados. Es así que se decidió utilizar al anticuerpo anteriormente mencionado para analizar mediante IHQ la expresión y localización de GPC3 en tumores malignos de mama, así como también en patologías mamarias benignas. Además, se analizaron las posibles asociaciones entre los niveles de expresión de GPC3 y los parámetros clínico-patológicos utilizados de rutina en esta patología. Con el objetivo de establecer la utilidad de GPC3 como marcador de pronóstico en cáncer de mama de bajo estadio se analizó la posible asociación entre la expresión del proteoglicano y la supervivencia libre de enfermedad (SLE).

**Expresión de GPC3 por IHQ**

Debido a que trabajos previos informaron bajos niveles de GPC3 en tumores de mama, se tuvo que adecuar un protocolo de IHQ para este caso en particular. Así, se empleó un sistema de amplificación de la señal, basado en la deposición de tiramidas biotiniladas, como se describió en Materiales y Métodos.

Mediante esta técnica de IHQ adaptada se determinó que la expresión de GPC3 fue muy baja en todas las patologías estudiadas y estuvo principalmente restringida a la membrana plasmática, aunque en algunos casos también se detectó tinción a nivel citoplasmático (Figura 40). Inesperadamente, el tejido

"normal" peritumoral no presentó tinción específica, aunque ocasionalmente algunas células mostraron inmunopositividad. En la Figura 40 pueden verse algunas fotos representativas de los cortes analizados. Las fotos de la izquierda representan un caso negativo o de baja expresión, mientras que las del panel central corresponden a una caso positivo. Cortes de placenta humana fueron utilizados como control positivo, ya que es conocido que GPC3 se sobreexpresa en este tejido.



**Figura 40. Expresión de GPC3 en tumores de mama humanos y patologías mamarias benignas, medida por IHQ**

Cortes parafinados de tumores de mama humano, patologías mamarias benignas y placenta (control) fueron procesados como se indica en Materiales y Métodos. La expresión de GPC3 fue evaluada por recuento bajo microscopio óptico del número de células positivas sobre un total de 200 células contadas. (Panel superior: 200X, Panel inferior: 1000X).

Debido a que la cantidad de células positivas para GPC3 fue muy baja, no fue posible clasificar a las muestras en forma cuantitativa de acuerdo al porcentaje de células con tinción. Por lo tanto, las muestras se clasificaron como positivas (aquellas que mostraron expresión de GPC3) y negativas.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de GPC3 entre las patologías mamarias benignas y los tumores invasivos. En la Tabla XVI se resumen los resultados obtenidos en estos grupos de pacientes. Como se desprende de esta tabla, GPC3 se expresó únicamente en el 10% de las patologías benignas y en el 20% de los tumores malignos.

**Tabla XVI. Expresión de GPC3 en las patologías mamarias tumorales malignas y benignas**

		<b>BENIGNO</b> n (%)	<b>MALIGNO</b> n (%)	<b>TOTAL</b> n (%)	<b>VALOR CHI</b> <b>CUADRADO</b>	<b>p</b>
GPC3	+	2 (10,0)	10 (20,4)	12 (17,4)	1,01	0,25
	-	18 (90,0)	39 (79,6)	57 (82,6)		

#### **Asociación entre la expresión de GPC3 y los parámetros clínico-patológicos**

Se analizaron las posibles relaciones entre la inmunopositividad para GPC3 y las características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama, como edad, estatus, tamaño tumoral, número de ganglios axilares positivos para metástasis, estadio, presencia de receptores estrogénicos, tipo histológico, grado histológico, grado nuclear e índice mitótico. Todas estas características son de aceptada utilidad como factores de pronóstico, y como tales son tenidas en cuenta para la toma de decisiones durante el manejo clínico del paciente con cáncer de mama (Tabla XVII). Ninguna de estas asociaciones resultó ser significativa en el análisis univariado.

**Tabla XVII. Características clínico-patológicas de la población de pacientes con cáncer de mama y su relación con la expresión de GPC3**

Análisis univariado, Test Chi cuadrado.

CARACTERÍSTICAS	POSITIVOS/ NEGATIVOS	PORCENTAJE DE POSITIVOS	CHI CUADRADO	p
<b>Edad (años)</b>				
<50	5/14	26,3	0,67	0,72
51-60	2/10	16,7		
>61	3/15	16,7		
<b>Estatus</b>				
<i>Pre-menopáusica</i>	4/9	30,8	1,73	0,42
<i>Peri-menopáusica</i>	1/2			
<i>Post-menopáusica</i>	5/28	15,2		
<b>Estadío</b>				
<i>I</i>	4/8	33,3	2,41	0,30
<i>IIA</i>	2/17	10,5		
<i>IIB</i>	4/14	22,2		
<b>Tamaño Tumoral (cm)</b>				
< 1,0	0/4		1,35	0,72
1,1-2,0	4/15	21,11		
> 2,1	6/20	30,0		
<b>Número de Ganglios Linfáticos con Metástasis</b>				
0	6/14	30,0	2,48	0,29
1-3	2/18	10,0		
≥4	2/7	22,2		
<b>Grado Histológico</b>				
<i>I</i>	0/2		2,02	0,57
<i>II</i>	2/14	12,5		
<i>III-IV</i>	6/15	33,3		
<b>Grado Nuclear</b>				
<i>I</i>	1/4	20,0	2,34	0,31
<i>II</i>	3/21	12,5		
<i>III</i>	6/13	31,6		

Índice Mitótico				
<i>I</i>	5/10	33,3		
<i>II</i>	4/21	16,0		
<i>III</i>	1/6	14,3	1,92	0,38
Tipo Histológico				
<i>Lobulillar</i>	2/7	22,2		
<i>Ductal</i>	7/30	18,9		
<i>Otros</i>	1/2		0,38	0,83
Receptores Estrogénicos				
<i>Positivos</i>	6/31	16,2		
<i>Negativos</i>	3/8	27,3	0,68	0,33

Los mismos datos fueron también analizados mediante una Prueba de Correlación de Pearson. Como puede verse en la Tabla XVIII, y al igual que lo observado en el análisis univariado con la Prueba de Chi cuadrado, la expresión de GPC3 no mostró estar correlacionada con ninguno de los parámetros estudiados.

**Tabla XVIII. Correlación entre la expresión de GPC3 y las características clínico-patológicas de la población de pacientes con cáncer de mama**

Test de correlación de Pearson.

CARACTERÍSTICAS	CORRELACIÓN DE PEARSON	P
Edad (años)	0,10	0,49
Estatus	0,18	0,22
Estadío	0,08	0,58
Tamaño tumoral (cm)	-0,12	0,39
Ganglios con MTS (n)	0,11	0,44
Grado histológico	-0,19	0,23
Grado nuclear	-0,16	0,26
Índice mitótico	0,18	0,22
Tipo histológico	-0,02	0,87
Receptores estrogénicos	-0,16	0,26

### **Relación entre la expresión de GPC3, HER-2 y Ki-67**

Se analizó también si existía alguna relación entre la expresión de GPC3 y la de otras moléculas utilizadas frecuentemente como marcadores de cáncer de mama. Específicamente, se estudiaron Ki-67 (antígeno de proliferación celular) y el producto del oncogen erbB2/Her-2 neu. Mediante el análisis univariado se estableció que GPC3 es independiente de la sobreexpresión del receptor HER-2/neu como así también del número de células ciclando, determinado por Ki-67. El mismo resultado fue obtenido tanto con el test Chi cuadrado como con un estudio de correlación (Pearson) (datos no mostrados).

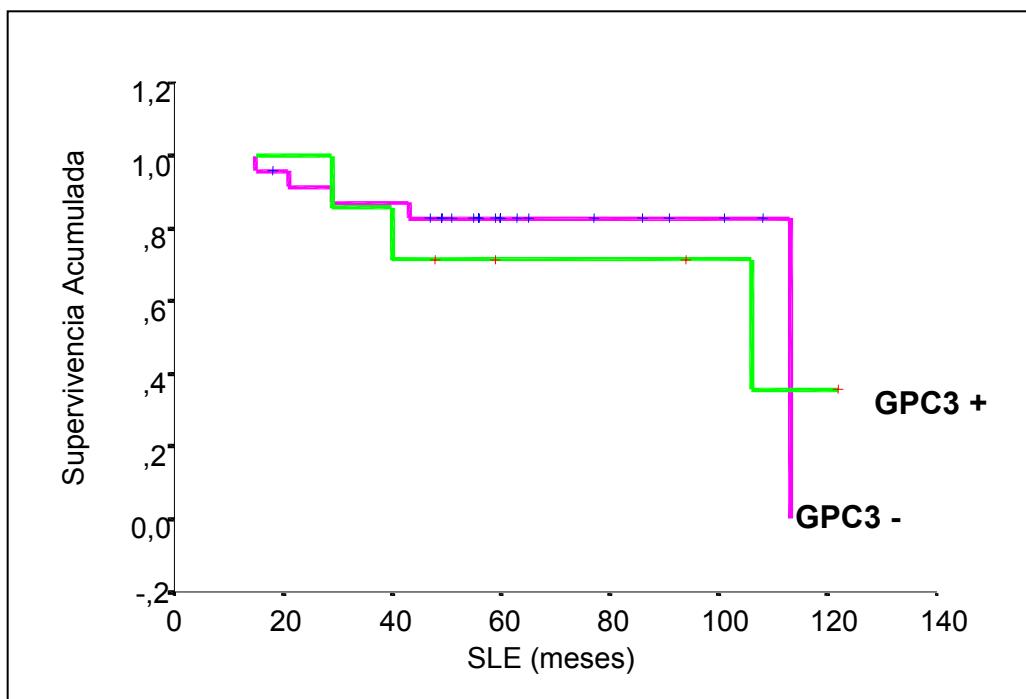
### **Evaluación de la expresión de GPC3 como factor de pronóstico en pacientes con cáncer de mama**

La evaluación de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se llevó a cabo en un grupo de 27 de las pacientes con cáncer de mama estudiadas. Con respecto al estatus clínico de la paciente, se definió como enfermedad en progresión:

- a- Un aumento del diámetro de las lesiones clínicamente evidentes.
- b- La recaída local (en la misma mama, ésta recibe el nombre de recidiva si se presenta en el transcurso de los dos primeros años posteriores a la cirugía del tumor primario de mama, y recurrencia, si su aparición supera el período de tiempo mencionado).
- c- Recaída a distancia (aparición de nuevos focos metastásicos en sitios alejados de la localización del tumor primario, incluidos los ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales).

El diagnóstico de enfermedad en progresión se realizó semiológicamente y a través de estudios complementarios tales como radiografía de tórax, centellograma óseo y hepático, TAC cerebral u otros, dependiendo del cuadro clínico que presentara cada paciente.

Las curvas de supervivencia de Kaplan y Meier mostraron que no existe asociación entre la expresión de GPC3 y el tiempo de SLE en la población analizada de pacientes con cáncer de mama (Log rank test 1,64,  $p=0,20$ , NS) (Figura 41).



**Figura 41. Curva de Kaplan y Meier para el análisis de SLE según la expresión de GPC3 en pacientes con cáncer de mama**

A partir de los datos obtenidos de las IHQ para GPC3, se confeccionaron curvas de Kaplan y Meier con el objetivo de determinar la utilidad de este proteoglicano como marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Se indican los pacientes con niveles positivos (-----) y aquellos con niveles negativos (-----) de GPC3. Log rank test: NS.

Es importante aclarar que no fue posible realizar un análisis de la supervivencia global (SG) debido a que sólo 3 de las pacientes con cáncer de mama fallecieron a causa de la enfermedad durante el período de seguimiento (1995 a 1999).

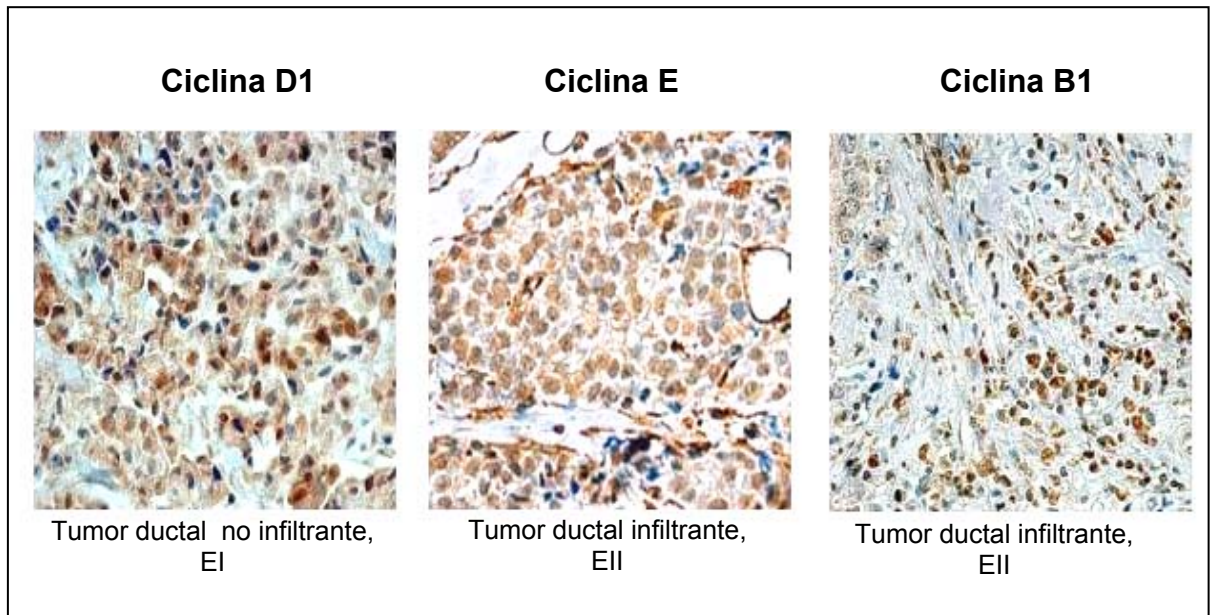


## **B- Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular**

Como se explicó con anterioridad, la búsqueda de marcadores tumorales de pronóstico es uno de los objetivos principales de la investigación clínica. El desarrollo y la progresión del cáncer de mama son procesos de múltiples pasos que involucran la inactivación de genes supresores tumorales y la activación de oncogenes, ambos relacionados con los mecanismos de proliferación y diferenciación. En la última década fue ampliamente descrito el papel de las ciclinas/CDKs/CDKIs en la progresión del ciclo celular. No es sorprendente que alteraciones en la regulación de estas moléculas hayan sido involucradas en cáncer. Es por ello, que se decidió analizar la expresión de las ciclinas D1, E y B1, así como también de los CDKIs p16 y p21 en la población de pacientes con cáncer de mama y patologías mamarias benignas. La expresión antigénica de estas moléculas fue también correlacionada con los parámetros clínico-patológicos utilizados de rutina, así como también con el tiempo de SLE, para establecer así el valor pronóstico de estas proteínas. Finalmente, y en función de que en la primera parte de este trabajo de tesis se encontraron ciertas asociaciones entre la expresión de GPC3 y algunos reguladores del ciclo celular en el modelo murino, se decidió analizar si la expresión de las ciclinas y las CDKs aquí estudiadas guardan alguna relación con el patrón de expresión de GPC3 en las patologías mamarias benignas e invasivas.

### **Expresión de las ciclinas D1, E y B1 por IHQ**

Mediante la utilización de la técnica de IHQ pudo observarse una tinción granular y difusa para la ciclina D1, estando la misma restringida casi exclusivamente al núcleo. En cambio, las ciclinas E y B1, además de la tinción nuclear, presentaron positividad citoplasmática, no encontrándose correlación entre estas tinciones (Figura 42). Generalmente, no se detectó expresión de las ciclinas en el tejido "normal" peritumoral aunque ocasionalmente algunas células (menos del 5%) mostraron inmunopositividad.



**Figura 42. Expresión de las ciclinas D1, E y B1 por IHQ**

Cortes parafinados de tumores de mama y patologías benignas fueron procesados como se indica en Materiales y Métodos. El número de células positivas para la expresión de las ciclinas D1, E y B1 fue determinado por recuento bajo microscopio óptico (200X). Las fotos son representativas de las tinciones obtenidas para estos antígenos.

Como primer análisis, sólo se consideró tinción positiva a aquella asociada al núcleo. Se definió el 10% de núcleos teñidos como valor de corte para determinar niveles aumentados de ciclinas (positivos). No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de las ciclinas D1 y B1 entre las patologías benignas y las malignas. Sin embargo, se pudo observar que los tumores invasivos presentan mayor expresión de ciclina E que el tejido benigno, aunque esta diferencia no fue significativa (Tabla XIX).

**Tabla XIX. Expresión de las ciclinas D1, E y B1 en las patologías benignas y en los tumores mamarios malignos**

		<b>BENIGNO</b> n (%)	<b>MALIGNO</b> n (%)	<b>TOTAL</b> n (%)	<b>VALOR CHI</b> <b>CUADRADO</b>	<b>p</b>
Ciclina D1	+	14 (60,9)	37 (71,2)	51 (68,0)	0,77	0,26
	-	9 (39,1)	15 (28,8)	24 (32,0)		
Ciclina E	+	7 (43,8)	33 (64,7)	40 (59,7)	2,22	0,17
	-	9 (56,3)	18 (35,3)	27 (40,3)		
Ciclina B1	+	9 (42,9)	23 (46,0)	32 (45,1)	0,06	0,51
	-	12 (57,1)	27 (54,0)	39 (54,9)		

**Asociación entre la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y los parámetros clínico-patológicos**

Las posibles relaciones entre la expresión de los antígenos estudiados y los parámetros clínico-patológicos se muestran en la Tabla XX. Sorprendentemente, en el análisis univariado, la sobreexpresión de las ciclinas se asoció con fenotipos menos malignos. En este sentido, la sobreexpresión de la ciclina D1 fue significativamente mayor en los tumores que expresan receptores estrogénicos. Asimismo, la sobreexpresión de la ciclina E estuvo significativamente asociada al estadio, a los grados nuclear e histológico, y a la presencia de receptores estrogénicos. Más aún, la sobreexpresión de la ciclina B1 se asoció inversamente con el número de nódulos linfáticos metastásicos. Cuando se realizó el análisis multivariado, sólo las asociaciones entre la ciclina D1 y los receptores estrogénicos y entre la ciclina E y el estadio permanecieron significativas (Tabla XXI).

**Tabla XX. Características clínico-patológicas de la población estudiada y su relación con la expresión de las ciclinas D1, E y B1**

Análisis univariado, #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,001$ , Test Chi cuadrado.

CARACTERÍSTICAS	CICLINA D1 POSITIVO/ NEGATIVO (%)	CICLINA E POSITIVO/ NEGATIVO (%)	CICLINA B1 POSITIVO/ NEGATIVO (%)
Edad (años)			
<50	14/4 (77,8)	12/6 (66,6)	10/8 (55,5)
51-60	7/7 (50,0)	8/6 (57,1)	5/9 (35,7)
>61	15/4 (78,9)	13/6 (68,4)	8/10 (44,4)
Estadio			
I	7/4 (63,6)	9/2 (81,8)	7/4 (63,6)
IIA	15/6 (71,4)	16/4 (80,0)	9/10 (47,4)
IIB	15/5 (75,0)	8/12 (40,0)#	7/13 (35,0)
Tamaño Tumoral (cm)			
< 1,0	2/2	3/1	2/2
1,1-2,1	14/4 (77,8)	14/4 (77,8)	9/9 (50,0)
>2,0	21/9 (70,0)	16/12 (57,1)	12/16 (42,9)
Número de Ganglios Linfáticos con Metástasis			
0	13/9 (59,1)	17/4 (81,0)	13/7 (65,0)
1-3	16/5 (76,2)	11/10 (52,4)	9/12 (42,9)
≥4	8/1 (88,9)	6/4 (60,0)	1/8 (11,1)#
Grado Histológico			
I	1/1	2/0	2/0
II	13/4 (76,5)	14/2 (87,5)	8/8 (50,0)
III-IV	12/10 (54,5)	10/12 (45,4)#	8/14 (36,4)
Grado Nuclear			
I	6/0 (100)	4/2 (66,7)	4/1 (80,0)
II	18/7 (72,0)	19/5 (79,2)	13/11 (54,2)
III	11/8 (57,9)	8/11 (42,1)#	6/13 (31,6)

Índice Mitótico			
<i>I</i>	14/3 (82,4)	13/4 (76,5)	9/7 (56,3)
<i>II</i>	18/6 (75,0)	15/9 (62,5)	11/13 (45,8)
<i>III</i>	3/5 (37,5)	2/5 (28,6)	2/5 (28,6)
Tipo Histológico			
<i>Lobulillar</i>	10/0 (100)	6/4 (60,0)	4/5 (44,4)
<i>Ductal</i>	23/15 (60,5)	24/14 (63,2)	17/21 (44,7)
<i>Especial</i>	4/0 #	3/0	2/1
Estatus			
<i>Pre-menopáusica</i>	11/4 (73,3)	9/6 (60,0)	7/8 (46,7)
<i>Post-menopáusica</i>	26/11 (70,3)	24/12 (66,7)	16/19 (45,7)
Receptores Estrogénicos			
<i>Positivo</i>	32/6 (84,2)	27/10 (73,0)	18/18 (50,0)
<i>Negativo</i>	3/9 (25,0)##	5/7 (41,7)#	4/8 (33,3)

En un segundo análisis, se consideró como positiva a la tinción citoplasmática de las ciclinas E y B1, utilizando los mismos valores de corte que los descritos para la tinción a nivel nuclear. No se observó ninguna asociación entre la expresión citoplasmática de las ciclinas E y B1 y los parámetros clínico-patológicos estudiados al realizar el estudio univariado. Tampoco se encontró correlación entre la expresión a nivel citoplasmático o nuclear de estas dos ciclinas (datos no mostrados).

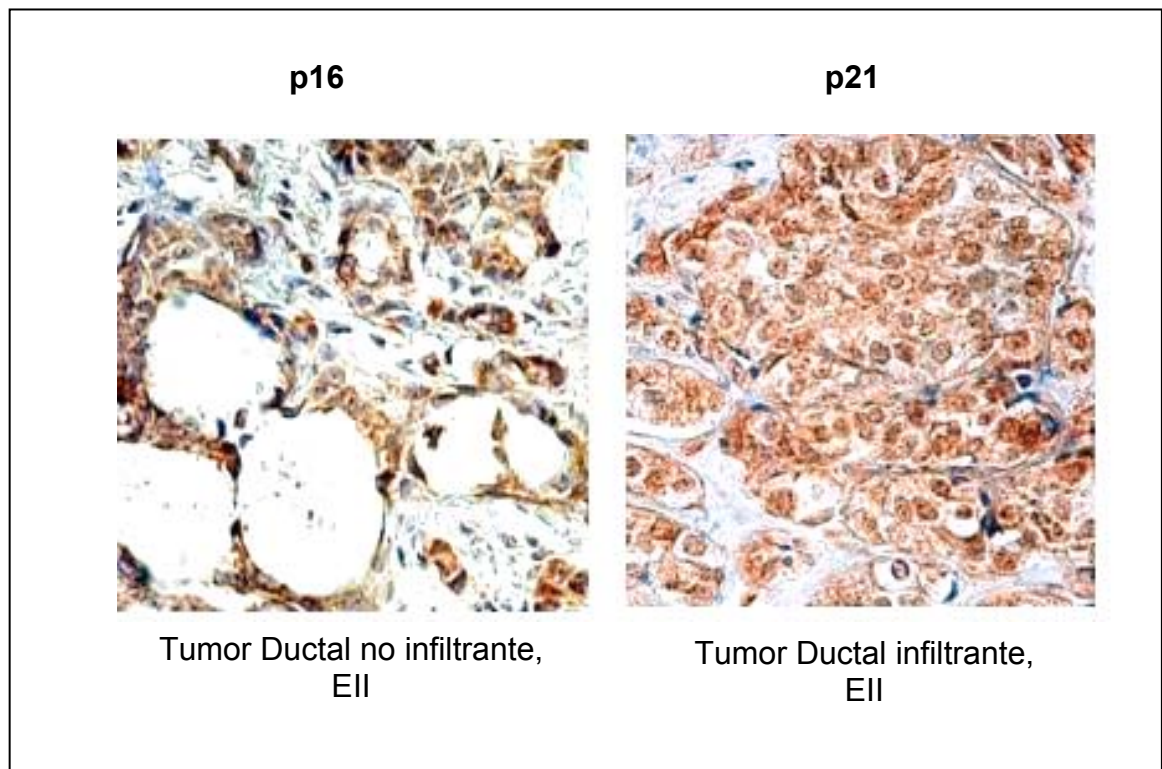
**Tabla XXI. Factores de pronóstico y expresión de las ciclinas D1 y E. Estudio multivariado**

Regresión logística, # p<0,05 y ## p<0,001.

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>CICLINA D1 COEFICIENTE <math>\beta</math> (p)</b>	<b>CICLINA E COEFICIENTE <math>\beta</math> (p)</b>
Receptores estrogénicos	3,67 (0,01) ##	-0,53 (0,17)
Estadío	1,75 (0,07)	-2,44 (0,03) #
Edad	-0,21 (0,74)	0,76 (0,36)
Grado Histológico	0,69 (0,52)	-0,09 (0,93)
Grado Nuclear	-1,24 (0,26)	-2,26 (0,09)
Índice Mitótico	-1,32 (0,20)	-0,137 (0,88)
Tipo Histológico	8,71 (0,87)	5,27 (0,90)
Estatus	-0,39 (0,68)	0,38 (0,71)

### **Expresión de p21 y p16 por IHQ**

A continuación se analizó la expresión de los CDKIs p21 y p16. La tinción de p16 fue predominantemente nuclear, pero en algunos casos se observó también tinción citoplasmática. Contrariamente, p21 presentó una intensa tinción citoplasmática (Figura 43) aunque ésta no guardó correlación alguna con la tinción a nivel nuclear (datos no mostrados). El tejido "normal" adyacente fue principalmente negativo para ambos antígenos, aunque se observaron algunas células positivas aisladas.



**Figura 43. Expresión de los CDKIs p16 y p21 por IHQ**

Cortes parafinados de tumores de mama y patologías benignas fueron procesados como se indica en Materiales y Métodos. El número de células positivas para la expresión de p16 y p21 fue determinado por recuento bajo microscopio óptico (200X). Las fotos muestran una tinción representativa para estos dos antígenos, donde se ve a p16 localizado principalmente en el núcleo, mientras que a p21 se lo encuentra también en el citoplasma.

Para establecer qué casos habían perdido la expresión de los inhibidores en estudio, se definió un valor de corte. Se determinó así que cuando menos del 10% de las células presentaban tinción nuclear positiva, la expresión de ese antígeno estaba disminuida (negativo). El análisis mostró niveles similares de expresión de p16 en las patologías benignas y en las tumorales. Aunque esta observación no fue estadísticamente significativa, se encontró un mayor porcentaje de patologías benignas que expresaban p21, comparado con el porcentaje de expresión en los tumores malignos (Tabla XXII).

**Tabla XXII. Expresión de los CDKIs p16 y p21 en las patologías malignas y benignas**

		<b>BENIGNO</b> n (%)	<b>MALIGNO</b> n (%)	<b>TOTAL</b> n (%)	<b>VALOR CHI</b> <b>CUADRADO</b>	<b>p</b>
p16	+	15 (65,2)	26 (51,0)	41 (55,4)	1,30	0,19
	-	8 (34,8)	15 (28,8)	33 (44,6)		
p21	+	11 (52,4)	15 (29,4)	26 (36,1)	3,40	0,06
	-	10 (47,6)	36 (70,6)	46 (63,9)		

**Asociación entre la expresión de los CDKIs p16 y p21 y los parámetros clínico patológicos**

La Tabla XXIII resume las asociaciones entre algunos parámetros claves en las patologías mamarias y la expresión de p21 y p16. Mientras que el estudio univariado reveló la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p21 y el tamaño tumoral, esta asociación se perdió en el estudio multivariado (Tabla XXIV). Por otro lado, no se encontró asociación significativa entre p16 y ninguno de los parámetros analizados.

**Tabla XXIII. Características clínico-patológicas de la población estudiada y su relación con la expresión de los CDKIs p21 y p16**

Análisis univariado, # p<0,05, Test Chi cuadrado.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>P21</b> <b>POSITIVO/NEGATIVO</b> <b>(%)</b>	<b>P16</b> <b>POSITIVO/NEGATIVO</b> <b>(%)</b>
<b>Edad (años)</b>		
<-50	5/13 (27,7)	13/5 (72,2)
51-60	3/11 (21,4)	8/6 (57,1)
>61	7/12 (36,8)	5/14 (26,3)
<b>Estadío</b>		
I	4/7 (36,4)	5/6 (45,5)
IIA	7/13 (35,0)	12/9 (57,1)
IIB	4/16 (20,0)	9/10 (47,4)



Tamaño Tumoral (cm)		
< 1,0	0/4	3/1
1,1-2,0	9/9 (50,0)	10/8 (55,6)
>2,1	6/23 (20,7)#	13/19 (40,6)
Número de Ganglios Linfáticos con Metástasis		
0	7/14 (33,3)	9/13 (40,9)
1-3	6/18 (25,0)	14/13 (51,8)
≥4	2/4 (33,3)	3/3 (50,0)
Grado Histológico		
I	0/2	2/0
II	6/10 (37,5)	7/9 (43,7)
III-IV	5/17 (22,7)	10/12 (45,4)
Grado Nuclear		
I	2/4 (33,3)	4/2 (66,7)
II	8/16 (33,3)	11/13 (45,8)
III	4/15 (21,0)	11/8 (57,9)
Índice Mitótico		
I	6/11 (35,3)	7/10 (41,2)
II	3/18 (25,0)	14/9 (60,9)
III	2/5 (28,6)	4/4 (50,0)
Tipo Histológico		
<i>Lobulillar</i>	3/7 (30,0)	6/4 (60,0)
<i>Ductal</i>	10/28 (26,3)	18/19 (48,6)
<i>Especial</i>	2/1	2/2
Estatus		
<i>Pre-menopáusica</i>	5/10(33,3)	10/5 (66,7)
<i>Post-menopáusica</i>	10/26 (27,8)	16/20 (44,4)
Receptores estrogénicos		
<i>Positivo</i>	11/26 (29,7)	19/18 (51,3)
<i>Negativo</i>	4/8 (33,3)	6/6 (50,0)

**Tabla XXIV. Factores de pronóstico y expresión de p21. Estudio multivariado**

Regresión logística.

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>P21 COEFICIENTE <math>\beta</math> (p)</b>
Receptores estrogénicos	-0,37 (0,24)
Edad	-0,28 (0,66)
Grado Histológico	-0,22 (0,81)
Grado Nuclear	-1,61 (0,17)
Índice Mitótico	-0,45 (0,53)
Tipo Histológico	6,69 (0,87)
Estatus	-0,22 (0,79)
Tamaño Tumoral	-0,33 (0,50)
Número de Ganglios Linfáticos con Metástasis	-0,10 (0,80)

### **Relación entre las ciclinas, los CDKIs, HER-2 y Ki-67**

Se analizaron también las posibles asociaciones entre las ciclinas y sus inhibidores. De esta manera, se estableció que la inmunotinción nuclear de las de la ciclina B1 y el CDKI p16 se encuentran asociadas (Pearson  $p < 0,01$ ).

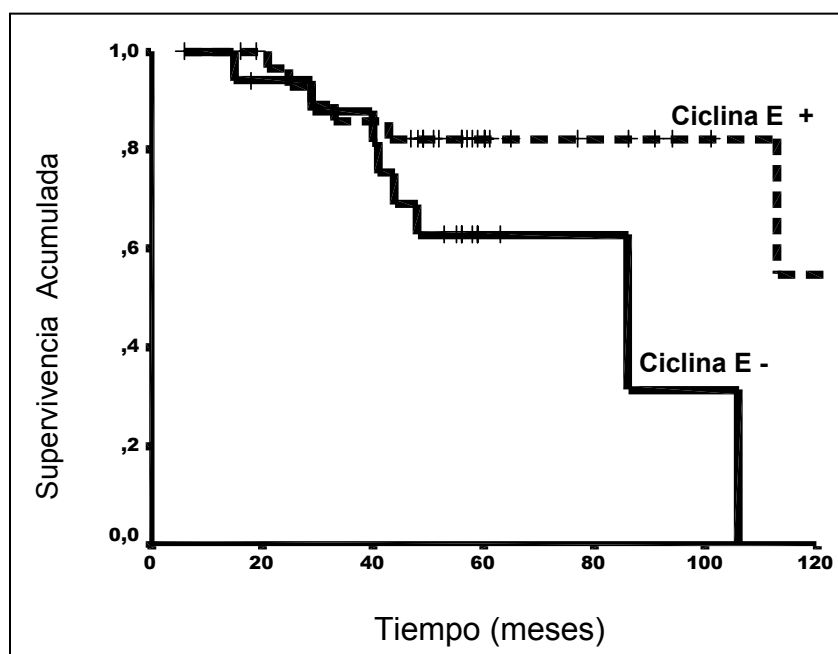
Se buscó también alguna relación entre la expresión de las ciclinas, los CDKIs y otras moléculas utilizadas frecuentemente como marcadores de cáncer de mama. Sin embargo, tampoco se encontró correlación entre ninguno de los antígenos estudiados y la sobreexpresión del receptor HER-2/neu o el número de células ciclando, medido por la expresión de Ki-67.

Para validar los resultados y excluir errores surgidos a partir de la selección arbitraria del valor de corte, se analizaron las relaciones entre las

ciclinas y los CDKIs como variables discretas. Se encontró una fuerte asociación entre la expresión de ciclina la D1 y el p16 ( $r=0,41$ ,  $p<0,01$ ) y entre la ciclina B1 y el p21 ( $r=0,47$ ,  $p<0,001$ ). Por último, los CDKIs p16 y p21, la ciclina B1 y el p16, la ciclina E y el p21, y las ciclinas E y B1 se correlacionaron significativamente con coeficientes de Pearson entre 0,31 y 0,38.

### **Evaluación de la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y de los CDKIs p16 y p21 como factores de pronóstico en pacientes con cáncer de mama**

Para estudiar la utilidad de estas proteínas como marcadores tumorales de pronóstico, se decidió analizar el papel de las ciclinas y de los CDKIs de manera independiente, ya que las interacciones entre las distintas moléculas podrían interferir con el estudio. El análisis univariado mostró que en la población estudiada el tiempo de SLE no se asoció con la expresión de las ciclinas D1 y B1, ni con los CDKIs p16 y p21. En cambio, la expresión de ciclina E mostró una significativa correlación con el tiempo de SLE, como se ve en las curvas de Kaplan y Meier (Figura 44). A pesar de ello, el análisis multivariado reveló que esta asociación no era significativa cuando otras variables de pronóstico fueron incluidas en el modelo.

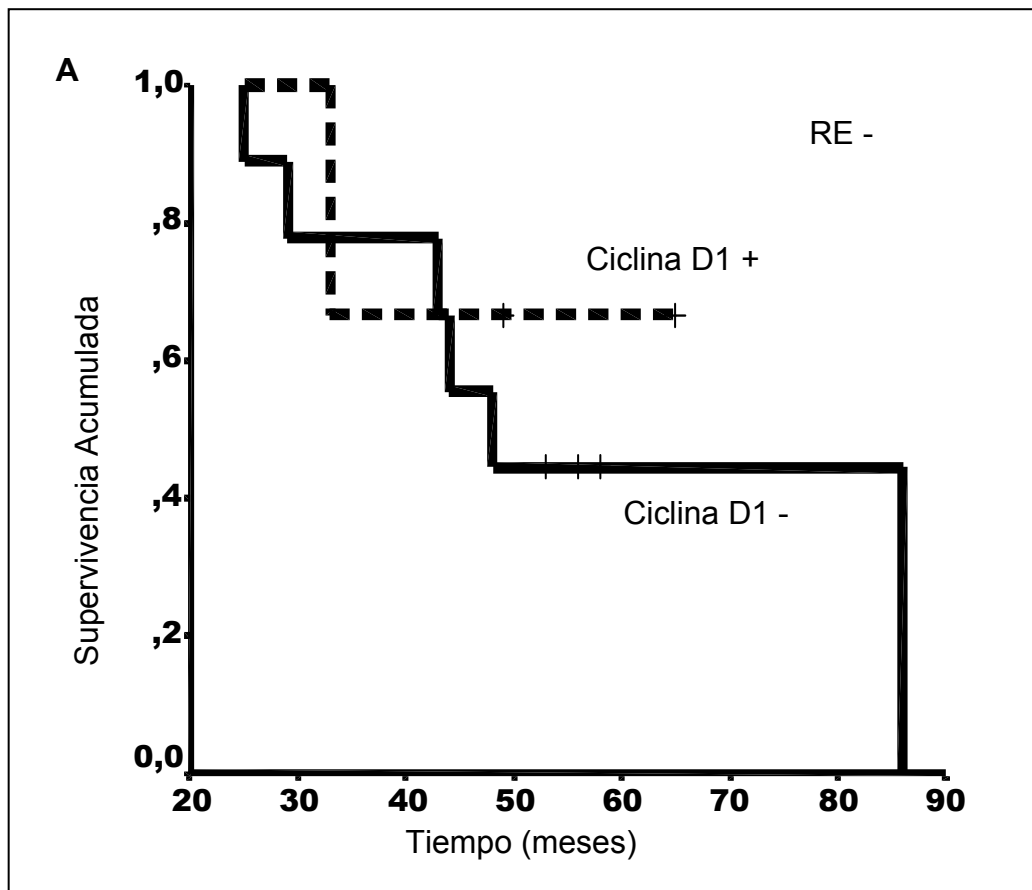


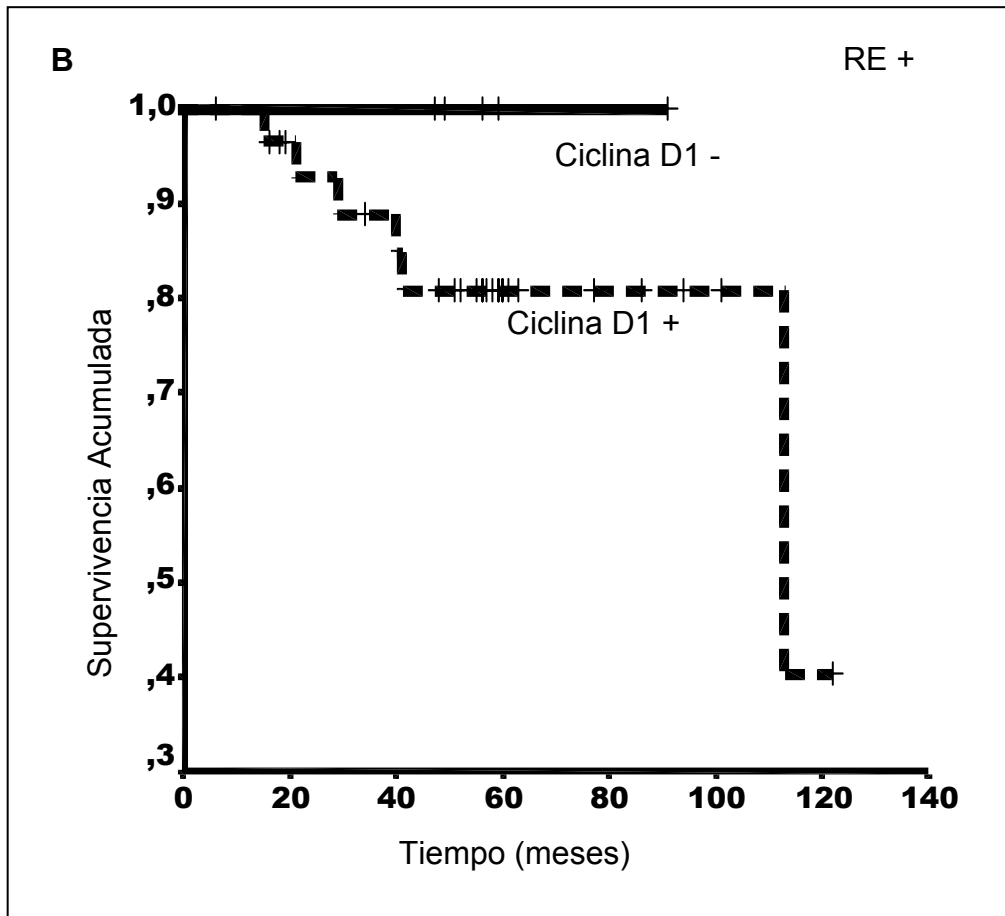
**Figura 44. Curva de Kaplan y Meier para el análisis de la SLE de acuerdo a los valores de expresión de la ciclina E en pacientes con cáncer de mama**

A partir de los datos obtenidos de las IHQ, se confeccionaron curvas de Kaplan y Meier con el objetivo de determinar el papel de la ciclina E como marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Se indican los pacientes con niveles positivos (- - - -) y aquellos con niveles negativos (—) de expresión de la ciclina E. Log rank test: 4,63 (p=0,031)

También se analizó si distintas combinaciones, tales como sobreexpresión de las ciclinas y pérdida (o sobreexpresión) de los CDKIs, estaban asociadas con el tiempo de SLE. Ninguna de estas combinaciones mostró ser indicativa de la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama.

Finalmente, la población en estudio fue estratificada según la expresión de los receptores estrogénicos (RE). En la Figura 45 B se observa que en los pacientes que expresan RE, la sobreexpresión de la ciclina D1 se asoció con un tiempo de SLE más corto, aunque el log rank test no fue significativo.





**Figura 45. Curva de Kaplan y Meier para el análisis de la SLE de acuerdo a los valores de expresión de la ciclina D1 en pacientes con tumores de mama negativos (A) y positivos (B) para la presencia de receptores estrogénicos**

Se indican los pacientes con niveles positivos (—) y aquellos con niveles negativos (- - - - -) de expresión de la ciclina D1. Log rank test, NS.

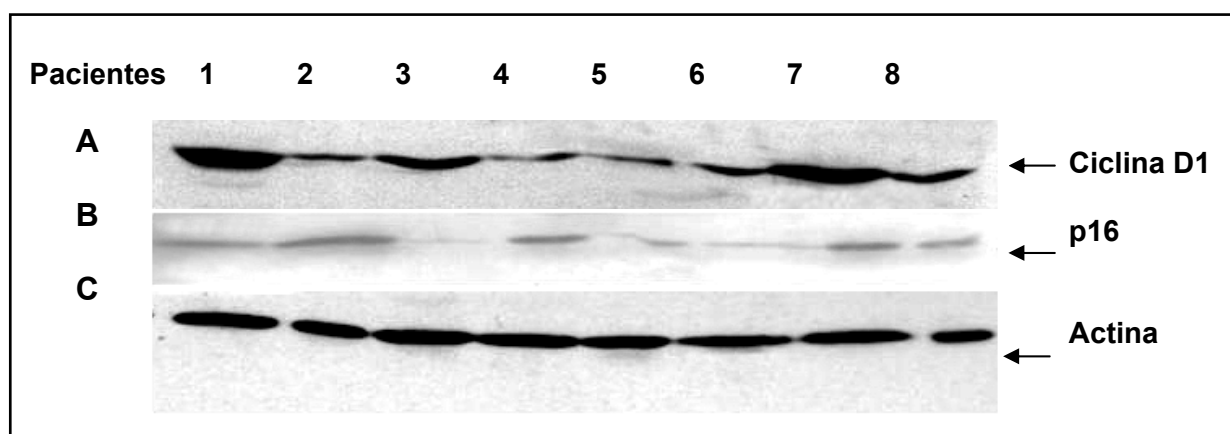
### **Expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16 por WB. Asociación con los parámetros clínico-patológicos y el tiempo de SLE**

La expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16, fue determinada tanto por IHQ, como se describió con anterioridad, como así también a partir de homogenatos tumorales mediante la técnica de WB. El objetivo fue correlacionar los niveles de expresión de estos antígenos determinados por dos técnicas inmunológicas diferentes.

La Figura 46 A muestra el patrón típico de expresión de la ciclina D1 en las muestras estudiadas, observándose una banda principal de 36 kDa. El análisis densitométrico reveló que no existen diferencias significativas en la expresión de la ciclina D1 entre las patologías benignas y malignas (Md (rango) 0,69 (0,11-1,00) vs. 0,7 (0,03-35,28) respectivamente). Por otro lado, se determinó que la expresión de la ciclina D1 medida por WB no correlaciona con ninguno de los parámetros clínico-patológicos estudiados, incluyendo el tiempo SLE (datos no mostrados).

De manera similar, se estudió la expresión del p16, obteniéndose una única banda de 16 kDa (Figura 46 B). Tampoco se encontraron asociaciones entre el nivel de expresión del p16, medido por WB, y las características histo-clínico-patológicas relevantes en cáncer de mama (datos no mostrados).

Finalmente, se determinó que los valores de expresión de la ciclina D1 y del p16 obtenidos por dos técnicas inmunológicas distintas (WB e IHQ) no estuvieron correlacionados.



**Figura 46. Análisis de la expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16 por WB**

Se analizaron los extractos proteicos de las distintas muestras tumorales. Pacientes 1-5: carcinoma; Pacientes 6-8: patología benigna. La expresión de la ciclina D1 (A) y del p16 (B) fue determinada mediante anticuerpos específicos. Marcadores de peso molecular fueron empleados en cada gel para estimar el peso de las bandas. La Actina (C) fue utilizada como control de siembra.

**C- Relación entre la expresión de GPC3 y de proteínas reguladoras del ciclo celular, medida por IHQ**

Como último objetivo, a partir de los valores de expresión antigénica obtenidos por IHQ, se decidió estudiar si existían asociaciones entre la expresión de GPC3 y la de moléculas reguladoras del ciclo celular. Para ello se realizaron los correspondientes análisis univariados que se presentan en la Tabla XXV.

**Tabla XXV. Asociación entre los niveles de expresión de GPC3 y el de las ciclinas D1, E y B1 y el de los CDKIs p21 y p16**

		GPC3 n (%)		VALOR CHI CUADRADO	p
		+	-		
Ciclina D1	+	5 (14,7)	29 (85,3)	2,65	0,11
	-	5 (35,7)	9 (64,3)		
Ciclina E	+	5 (16,7)	25 (83,3)	1,05	0,25
	-	5 (29,4)	12 (70,6)		
Ciclina B1	+	4 (19,0)	17 (81,0)	0,11	0,51
	-	6 (23,1)	20 (76,9)		
p21	+	1 (7,7)	12 (92,3)	1,98	0,16
	-	9 (26,5)	25 (73,5)		
p16	+	3 (12,0)	22 (88,0)	2,74	0,09
	-	7 (31,8)	15 (68,2)		

Tal como se desprende de la tabla, la expresión de GPC3 fue independiente de la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y de los inhibidores p16 y p21. El mismo resultado se obtuvo al realizar un estudio de correlación (Tabla XXVI).

**Tabla XXVI. Correlación entre los niveles de expresión de GPC3 y el de las ciclinas D1, E y B1 y el de los CDKIs p21 y p16**

	<b>CORRELACIÓN DE PEARSON (<math>\beta</math>)</b>	<b>p</b>
<b>CICLINA D1</b>	0,23	0,11
<b>CICLINA E</b>	0,15	0,31
<b>CICLINA B1</b>	0,05	0,74
<b>p21</b>	0,20	0,17
<b>p16</b>	0,24	0,10

Por último, se analizó si los tumores que expresan GPC3 presentan algún patrón particular de expresión de las ciclinas y de los CDKIs. Sin embargo, no se encontró ninguna combinación determinada en la expresión de las ciclinas y de los CDKIs en los tumores GPC3 positivos (datos no mostrados).



# DISCUSIÓN

**PARTE I: Papel de GPC3 en la progresión tumoral**  
**Estudios en el modelo experimental de adenocarcinoma**  
**mamario murino LM3**

Después de 25 años de avances rápidos, la investigación en cáncer ha generado un amplio y complejo conjunto de conocimientos, que revelan los cambios dinámicos que ocurren en el genoma durante el desarrollo de la enfermedad. Las bases de estas afirmaciones radican en el descubrimiento de mutaciones que activan oncogenes y otras que silencian a genes supresores de tumor, con la consecuente pérdida de su función. Ambos tipos de genes involucrados en el desarrollo tumoral han sido identificados a través de sus alteraciones en células tumorales de origen humano y animal, así como también en modelos de cáncer experimental [366].

Como se sabe el cáncer es una enfermedad muy compleja, sin embargo pueden enunciarse una serie de principios básicos. Durante las últimas décadas se ha descubierto un pequeño número de propiedades moleculares, bioquímicas y celulares que son características de la mayoría de los tipos de cáncer. Las células tumorales tienen defectos en los circuitos regulatorios que gobiernan la proliferación normal y la homeostasis. Entre las alteraciones esenciales en la fisiología celular, que colectivamente dirigen el crecimiento maligno pueden citarse: **A. Invasión de los tejidos y metástasis; B. Alteración en las propiedades de proliferación: Autosuficiencia en señales de crecimiento e Insensibilidad a señales inhibitorias; C. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)** [239].

En este trabajo de tesis, se intentó analizar el papel de GPC3 en las propiedades arriba enumeradas. Mientras que algunos estudios han involucrado a GPC3 en el control de la proliferación de las células tumorales y en la apoptosis, no existe información acerca de la participación de esta molécula en la regulación de otros aspectos del fenotipo maligno. Es por ello que se decidió analizar el efecto de la reexpresión de GPC3 sobre el comportamiento de células de la línea de adenocarcinoma mamario murino LM3, caracterizada por ser GPC3 negativa (Figura 21). Dada la capacidad de GPC3 de modular la supervivencia de varios tipos celulares, es de esperarse que la adquisición de un

fenotipo maligno vaya acompañada de alteraciones en la expresión de esta glicoproteína. Como la pérdida de la expresión de GPC3 parece ser un evento clave en el desarrollo de los tumores de mama, en este trabajo de tesis se planteó como hipótesis que la reexpresión de GPC3 en las células tumorales mamarias LM3 induciría cambios en el comportamiento celular tendientes a un fenotipo menos agresivo. Para poder comprobar esta hipótesis, se realizaron una serie de estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, comparando el comportamiento de las células control con el de las transfectadas con el gen de GPC3. Así, las células que reexpresan GPC3 y las control fueron inoculadas en ratones BALB/c, para evaluar su capacidades tumorigénica, invasiva y metastásica. En contraparte, ensayos de proliferación, muerte celular, adhesión, migración, spreading, invasión, organización del citoesqueleto y secreción de proteasas, entre otros, fueron realizados *in vitro* con el objetivo de establecer el efecto de GPC3 sobre estas propiedades celulares. Si la reexpresión de esta glicoproteína fuera capaz de modular al menos una de las capacidades tumorales adquiridas, se transformaría en un posible blanco terapéutico.

### **A. Invasión de los tejidos y metástasis**

Durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer humanos, tarde o temprano la masa de tumor primario genera células que migran, invaden los tejidos adyacentes y viajan a sitios distantes donde fundan nuevas colonias. Estos focos alejados de células tumorales –metástasis- son los responsables del 90% de las muertes por cáncer [367]. La capacidad de invasión y metástasis posibilita que la célula tumoral escape de la masa tumoral primaria y colonice nuevos terrenos donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitantes.

El proceso metastásico de los tumores de mama ha sido muy bien estudiado *in vivo* en animales inmuno competentes. En este trabajo de tesis, con el objetivo de evaluar el papel de GPC3 en el proceso metastásico de las células LM3, se inocularon s.c. células transfectadas con este proteoglicano, comparándose sus capacidades tumorigénica, invasiva y metastásica con las de las células LM3-vector. Se determinó así que todas las células son capaces de formar tumores s.c. al ser inoculadas en animales singeneicos. Los tumores

originados a partir de las células LM3-GPC3 presentaron un período de latencia y una tasa de crecimiento tumoral similares a las de los tumores LM3-vector (Figura 23).

Al analizar las capacidades invasiva y metastásica de las células de adenocarcinoma de mama transfectadas con GPC3 o con el vector vacío, se demostró que GPC3 inhibe el fenotipo maligno confiriendo un comportamiento menos invasivo y metastásico (Tabla XV, Figura 24 y Figura 25). Aunque la reexpresión de GPC3 no moduló la velocidad de crecimiento del tumor s.c., fue capaz de reducir tanto la capacidad de las células LM3 de invadir los tejidos adyacentes (dermis y músculo) como la de formar metástasis pulmonares espontáneas y experimentales. Por lo tanto, la función de GPC3 en las células mamarias estaría asociada a la inhibición de la invasión y la metástasis.

En lo que respecta a este último punto, hace varios años ha sido propuesto que el desarrollo metastásico podría estar regulado en forma independiente de la tumorigénesis, por genes promotores (**metastogenes**) o inhibidores (**supresores de metástasis**) de la diseminación. El primer gen supresor de metástasis, Nm23, fue identificado en 1988. Desde entonces han sido confirmados ocho genes supresores de metástasis. Éstos se caracterizan por poseer baja o nula expresión en las células tumorales metastásicas, comparada con su expresión en las células tumorigénicas no metastásicas. Aparentemente, los supresores de metástasis participarían en varios aspectos de la transducción de señales, incluyendo los caminos que están involucrados en la invasión, la señalización mediada por receptores de factores de crecimiento, la comunicación célula a célula y la transcripción [368]. Cuando los genes supresores de metástasis son reexpresados en líneas celulares tumorales, la metástasis *in vivo* es inhibida, sin observarse un impacto directo sobre el tamaño del tumor primario [369]. En base a estas observaciones, podría hipotetizarse que GPC3 estaría actuando como un supresor de metástasis en el sistema aquí analizado.

Debido a que la invasión y la metástasis son procesos de varios pasos, se decidió realizar una serie de estudios *in vitro* para poder comprender, al menos en parte, los mecanismos involucrados en el efecto inhibitorio de la diseminación metastásica ejercido por GPC3. Las células malignas muestran algunas características comunes como desregulación del **crecimiento**, alta **capacidad**

**migratoria**, alteraciones en las **propiedades de adhesión** y aumento en la **producción de proteasas** [70]. Todas estas características están involucradas en uno o más pasos del proceso metastásico. En el modelo aquí presentado, mientras que la reexpresión de GPC3 fue incapaz de modular la velocidad de **proliferación** *in vitro* de monocapas no sincronizadas (Figura 26 B), se evidenció un marcado efecto inhibitorio cuando las células crecieron en condiciones más restringidas, como lo es el ensayo de clonogenicidad (Figura 26 C). Se especula que la cooperación entre factores de crecimiento y/o supervivencia, que es muy activa cuando las células son sembradas en alta densidad, habría ocasionado la evasión de la inhibición sobre la proliferación celular inducida por GPC3. Por otro lado, existen evidencias que indican que el proceso de progresión tumoral puede ser favorecido y/o inhibido por otras respuestas no relacionadas con la proliferación celular. Por lo tanto, el hecho de que GPC3 sea incapaz de regular la proliferación de las células creciendo en monocapa no implica que este glicoproteína no esté modulando el desarrollo tumoral. Las condiciones impuestas por el ensayo de clonogenicidad pueden ser asimiladas como aquellas que sufre la célula tumoral en el órgano blanco después de su extravasación. Es posible que GPC3 pueda actuar en este paso de la cascada metastásica previniendo la proliferación de la célula tumoral extravasada cuando ésta se encuentra aislada, y evitando así el desarrollo del foco metastásico.

Por otro lado, se encontraron importantes diferencias en la capacidad de **adherirse** y **migrar** de las células que expresan GPC3. Así, las células LM3-GPC3 fueron más adherentes que los controles a la FN, una proteína extracelular involucrada en la adhesión (Figura 31). Sumado a esto, se detectó una reducción en la capacidad migratoria de las células LM3-GPC3 cuando se realizó un ensayo de cicatrización de heridas (Figura 36). El hecho de que las células LM3-GPC3 presenten una disminución en la capacidad migratoria podría deberse a su mayor adhesión al sustrato, dificultándose así la motilidad celular. Las diferencias encontradas en las capacidades adhesiva y migratoria, junto con la inhibición de la proliferación cuando las células se encuentran en baja densidad, pueden explicar el comportamiento menos invasivo y metastásico que presentan las células que expresan GPC3.

Relacionado con la motilidad celular, se determinó que si bien las células LM3 presentan mayormente una distribución cortical del **citoesqueleto de actina**, aparecen también fibras de estrés. Durante la transformación maligna se producen alteraciones en la morfología celular, una de cuyas manifestaciones es la transición epitelio-mesenquimática (TEM). La TEM se evidencia, entre otros cambios, por la formación de fibras de estrés estables, similares a las observadas en las células LM3 sin transfectar y en las LM3-vector. En el trabajo de tesis aquí presentado se demostró que la reexpresión de GPC3 induce la desaparición de estas fibras (Figura 37). Entonces, el hecho de que las células LM3-GPC3 presenten una reducción en su capacidad migratoria podría deberse a la disminución de las fibras de estrés de F-actina.

La vinculina es una proteína citoplasmática que se localiza en las placas de adhesión focal en contacto con las fibras de estrés y que permite establecer una interacción entre los filamentos de actina y las integrinas. En este trabajo se estudió mediante IF la expresión de esta proteína, determinándose que ninguno de los clones parece expresarla (datos no mostrados). Los resultados obtenidos coinciden con los publicados anteriormente por Aguirre-Ghiso y colaboradores [370]. Los autores demostraron que las células LM3 no expresan vinculina y que en realidad no forman los típicos contactos de adhesión focal, sino lo que previamente fue descrito como “contactos de adhesión puntual” [371]. Estos contactos puntuales parecen coexistir con los contactos focales en los astrocitos normales, aunque sólo los primeros prevalecen en las célula transformadas [371]. La existencia de estos contactos puntuales podrían estar favoreciendo el fenotipo maligno de las células LM3.

La invasión y la metástasis son procesos sumamente complejos, y sus determinantes genéticos y bioquímicos aún no son totalmente conocidos. Ambos utilizan estrategias operacionales similares, involucrando **cambios en la relación de las células con su microambiente** y en la **activación de las proteasas extracelulares** [239].

Muchas moléculas involucradas en las interacciones de las células con su entorno aparecen alteradas en los procesos de invasión y metástasis. Entre las proteínas afectadas se encuentran las moléculas de adhesión celular (**CAMs**),

las que establecen uniones entre las células y los diferentes componentes de la ME. Es importante destacar que todas estas interacciones basadas en la adhesión generan señales regulatorias que afectan la diferenciación, la proliferación, la migración y la supervivencia celular [372].

La alteración más ampliamente observada de las interacciones celulares en cáncer involucra a la **E-cadherina**, una molécula de adhesión homotípica y homofílica que se expresa en las células epiteliales. La unión entre células adyacentes por la E-cadherina resulta, entre otras, en la transmisión de señales inhibitorias del crecimiento por medio de contactos citoplasmáticos con la  **$\beta$ -catenina** intracelular [363]. La función de la E-cadherina aparentemente se pierde en la mayoría de los tipos de cáncer de origen epitelial, por mecanismos que incluyen la inactivación mutacional de los genes de E-cadherina o  $\beta$ -catenina, la represión transcripcional o la proteólisis del dominio extracelular de la cadherina [363]. La expresión forzada de E-cadherina en células tumorales en cultivo y en un modelo de carcinogénesis murino induce una reducción de las capacidades invasiva y metastásica. Por otro lado, las modificaciones de E-cadherina que llevan a alteraciones de su función aumentan la capacidad metastásica de estas células [363]. Por lo tanto, la E-cadherina actuaría como un supresor de la invasión y la metástasis en cáncer de origen epitelial, y la eliminación de su función constituye un paso clave en la adquisición de estas capacidades. En este trabajo de tesis se observó que la reexpresión de GPC3 en las células LM3 induce un incremento en la expresión de E-cadherina (Figura 34 C). Coincidentemente, se determinó también que la expresión de  $\beta$ -catenina está aumentada en las células LM3 que expresan GPC3 (Figura 34 D). Por lo tanto, y en función de los datos bibliográficos arriba enunciados, es posible que la reducción en las capacidades invasiva y metastásica observada en las células LM3-GPC3 sea debida, al menos en parte, al aumento de la expresión de estas dos moléculas claves en el proceso metastásico.

En concordancia con la elevada expresión de E-cadherina en las células LM3-GPC3, se encontró un importante incremento de la **adhesión homotípica** de estos clones (Figura 32). Por lo tanto, la reexpresión de GPC3 indujo un aumento de la capacidad de adhesión a componentes de la matriz (como FN) como así también de la adhesión célula a célula. Hace varios años, Leung-Tack

y colaboradores reportaron la existencia de una correlación inversa entre las capacidades adhesiva y metastásica de líneas celulares de rata transformadas con poliomavirus [373]. Más recientemente, y en líneas celulares de carcinoma de colon humano, Shen y colaboradores reforzaron estas observaciones. El potencial metastásico de estas células correlacionó negativamente con su capacidad de agregación homotípica *in vitro* [374]. Podría hipotetizarse entonces que la reducción de la capacidad metastásica observada en los clones que expresan GPC3 se debería, al menos parcialmente, al aumento de su adhesión homotípica.

Existen numerosas evidencias que indican la presencia de cambios en la expresión de las **integrinas** asociados con la adquisición del fenotipo maligno. Durante el proceso de invasión y metástasis el microambiente celular es modificado, pudiendo presentarse nuevos componentes de la ME. De acuerdo a esto, el éxito en la colonización de nuevos sitios (tanto locales como distantes) demanda la adaptación de las células migrantes, que puede activarse a través de cambios en el espectro de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las integrinas. Así se generan distintos tipos de integrinas, que poseen diferentes preferencias de sustratos. Por lo tanto, las células de los carcinomas facilitan la invasión cambiando la expresión de las integrinas que favorecen la interacción con la ME presente en el epitelio normal, por aquellas que preferentemente se unen a componentes del estroma degradado por las proteasas extracelulares [375]. Particularmente, en el modelo presentado en este trabajo de tesis, no se encontraron diferencias en la expresión de  **$\beta$ 1-integrina** entre las células control y las que expresan GPC3, a pesar de que estas últimas presentan más adhesión a FN (Figura 34 A). Los intentos de justificar los efectos en la biología celular de las subunidades de las integrinas en términos de un pequeño número de leyes mecánicas han fallado debido al alto número de genes de integrinas existentes, a la gran cantidad de receptores heterodiméricos resultantes de la combinación las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y a las complejas señales emitidas por el dominio citoplasmático de estos receptores [372]. Por lo tanto, una posible explicación para la discrepancia encontrada entre la adhesión a FN y la expresión de  $\beta$ 1-integrina sería que otras integrinas (independientemente de la  $\beta$ 1) estarían influyendo en el comportamiento adhesivo a FN de las células LM3.



Otro factor importante es el relacionado con la existencia de diferentes estados de activación de las integrinas. El estado de activación es definido como el cambio de un receptor individual en la afinidad por su ligando. El proceso regulatorio capaz de modificar la afinidad es disparado a través de un sistema de señales, siendo entonces una forma rápida para regular las funciones adhesivas en respuesta a varios estímulos fisiológicos [376]. Entre los mecanismos involucrados en la regulación de la interacción con el ligando se encuentra la presencia de iones metálicos. Por ejemplo, el  $Mn^{+2}$  conlleva al aumento de la afinidad del receptor por su ligando, mientras que  $Ca^{+2}$  estabiliza a las conformaciones de baja afinidad o estados de reposo. Adicionalmente, se considera el fenómeno de *clustering* o agrupamiento de receptores como otra forma de aumentar la afinidad por su ligando [376]. De esta manera, la presencia de ligandos multivalentes o la asociación de los receptores con el citoesqueleto podrían limitar la difusión de las moléculas por la membrana incrementando de así la fuerza adhesiva de la interacción. Por lo tanto, en el modelo presentado en este trabajo de tesis las diferencias en la adhesión a FN podrían deberse a distintos estados de activación de las integrinas, sin necesidad de encontrarse modificaciones en la expresión de éstas últimas. Aunque no existen dudas del papel central que poseen las integrinas en las capacidades de invasión y metástasis, más estudios serían necesarios para determinar su función específica en el comportamiento *in vivo* de los clones LM3-GPC3.

Como la expresión de  $\beta 1$ -integrina no se ve regulada por GPC3, otra explicación alternativa para la mayor adhesión a FN encontrada en los clones LM3-GPC3 podría implicar la participación de la glicoproteína transmembrana **CD44**. CD44 es el principal receptor del glicosaminoglicano hialuronato (HA). Algunas modificaciones post-traduccionales pueden afectar la especificidad de unión al ligando, permitiendo que CD44 interactúe con proteínas de la ME, como FN, y secuestre factores de crecimiento [362]. Por otro lado, cambios en la expresión de CD44 han sido asociados con una gran variedad de tipos tumorales. Estos cambios pueden ser el aumento de su expresión, pero también la disminución y/o la alteración en el patrón de isoformas expresado [362]. En este trabajo de tesis se determinó que GPC3 es capaz de inducir un aumento en la expresión de CD44 en las células LM3 (Figura 34 B). Si se toma en cuenta el

antiguo postulado que sugiere que CD44 facilita la invasión y la metástasis, el hecho de que las células LM3-GPC3 expresen mayor cantidad de este glicosoaminoglicano estaría en contradicción con los resultados *in vivo*, que demostraron una reducción en las capacidades invasiva y metastásica de estas células. Sin embargo, datos más recientes han reportado el papel supresor de la invasión y/o de la metástasis de CD44 [377-380]. Entre éstos, Sato y colaboradores [379] afirman que la sobreexpresión de una variante de CD44 (CD44v9) en un carcinoma de células escamosas, inhibe el potencial invasivo por un aumento en la adhesión célula a célula, observación idéntica a la encontrada en las células LM3-GPC3. Por su parte, Navaglia y colaboradores [380] concluyen que la variante CD44v10 media la adhesión a FN *in vitro* e inhibe las metástasis *in vivo* de líneas celulares de cáncer pancreático. Estos resultados son también similares a los obtenidos con las células LM3-GPC3. Podría concluirse que la reexpresión de GPC3 en las células LM3 induce un cambio en el patrón de expresión de CD44, favoreciendo la mayor adhesión a FN, el aumento de la adhesión célula a célula, y la consecuente inhibición de la invasión y la metástasis *in vivo*. El anticuerpo utilizado en este trabajo de tesis para la detección de CD44 reconoce todas las isoformas de la glicoproteína, por lo que es imposible discriminar qué isoformas están involucradas en los efectos biológicos detectados en las células que reexpresan GPC3. Futuros experimentos serían necesarios para esclarecer este punto.

El segundo parámetro general que participa en la regulación del comportamiento invasivo y metastásico involucra a las **proteasas extracelulares** [381]. Así, se ha demostrado que los genes de las proteasas pueden estar sobreexpresados, las formas inactivas de las enzimas son convertidas en activas y la cantidad de sus inhibidores es disminuida. Las proteasas que degradan la ME están característicamente asociadas a la superficie celular, ya sea porque poseen un dominio transmembrana, porque se unen a receptores específicos o porque se asocian con integrinas [364]. Es erróneo atribuir a las proteasas únicamente la capacidad de degradar los componentes de la ME, ya que también poseen funciones en otras capacidades claves para la progresión tumoral, como la angiogénesis [382], y son capaces de

señalar en las vías de crecimiento [364], las que por otro lado pueden influir directa o indirectamente en el fenotipo invasivo y metastásico.

Las proteasas son expresadas de manera regulada en diversos procesos normales, pero su actividad se ve alterada en eventos patológicos tales como la invasión y la metástasis [120]. Entre las proteasas asociadas con la capacidad invasiva de las células tumorales, se encuentran las metaloproteasas (MMPs) y la serino proteasa uPA. Sin embargo, y a pesar de las diferencias encontradas en las capacidades invasiva y metastásica *in vivo*, la expresión de GPC3 no fue capaz de modular los niveles basales de actividad de MMP-9, MMP-2 ni uPA de las células LM3 (Figura 39). Parte de la complejidad del proceso de invasión y metástasis deriva de los múltiples tipos celulares involucrados en la expresión de estas proteasas. En muchas clases de carcinomas, las proteasas que degradan la ME no son producidas por las células tumorales epiteliales, sino por las células estromales e inflamatorias asociadas al tumor [364]. Por lo tanto, la falta de diferencias en la secreción de proteasas observada *in vitro* podría no estar reflejando totalmente lo que ocurre con el tumor *in vivo*. En el modelo aquí presentado podría hipotetizarse que otras células, independientemente de las epiteliales que se mantienen en cultivo, serían las responsables de producir las proteasas que regulan el comportamiento invasivo/metastásico de los tumores LM3. Por otro lado, además de las metalo y las serino proteasas, otras enzimas (como las cisteíno proteasas) intervienen en el proceso de invasión y metástasis. Es posible que estas últimas enzimas sean las responsables del fenotipo agresivo de las células LM3.

Una de las características principales de la mayoría de las proteasas es que sus genes son inducibles. Su expresión es regulada a nivel transcripcional por factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, agentes químicos, estrés físico, transformación oncogénica celular, etc. El aumento en la expresión de las proteasas puede ser inhibido por factores supresores, como por ejemplo TGF- $\beta$ , ácido retinoico y glucocorticoides [82]. En este trabajo de tesis se analizó el efecto de los factores de crecimiento TGF- $\beta$  e IGF-II sobre la secreción de MMP-9, MMP-2 y uPA. Ninguno de estos factores moduló la capacidad de secretar uPA de los distintos clones (Figura 39 C). Por otro lado, TGF- $\beta$  indujo un notable

incremento en la secreción de MMP-9, pero este efecto fue independiente de la expresión de GPC3 (Figura 39 A). Fue interesante observar que IGF-II indujo un marcado aumento en los niveles secretados de MMP-2 sólo en los clones control, mientras que la reexpresión de GPC3 previno este aumento (Figura 39 B). La MMP-2 está implicada en la invasión de la ME en líneas celulares de carcinomas mamarios [383-385]. Recientemente, Park y colaboradores [386] demostraron que el fenotipo invasivo inducido por Akt1 en una línea celular mamaria murina correlacionó con un incremento en la expresión y activación de MMP-2. Más aún, algunos trabajos vinculan la vía de Akt1 con los efectos inducidos por la interacción de IGF-II con su receptor IGF-IR [387]. Los resultados aquí presentados sugieren que la modulación de los niveles de MMP-2 podría tener un importante papel en la progresión maligna de las células LM3, y que GPC3 podría estar bloqueando, de una manera aún desconocida, la vía de señalización de IGF-II. Sin embargo, un estudio genético reciente concluyó que la vía de señalización de IGF-II no se encuentra alterada de manera directa por GPC3 [303]. En resumen, GPC3 estaría inhibiendo la activación ejercida por IGF-II sobre uno de los sistemas principales que regulan la degradación de las membranas basales durante las distintas etapas de la cascada metastásica. Dado el importante papel de las proteasas en muchas de las etapas de la progresión maligna, podría hipotetizarse que el efecto inhibitorio de GPC3 sobre el aumento de la actividad de MMP-2 inducida por IGF-II refuerza la idea de una actividad supresora de la progresión tumoral ejercida por este proteoglicano.

### **B. Alteración en las propiedades de proliferación: Autosuficiencia en señales de crecimiento e Insensibilidad a señales inhibitorias**

Las células normales requieren **señales mitogénicas de crecimiento** para poder pasar de un estado quiescente a otro de proliferación activa. Estas señales son transmitidas a las células a través de receptores transmembrana que unen distintas clases de moléculas de señalización como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión célula a célula. No existe ningún tipo de célula normal capaz de proliferar sin estas señales de estímulo. En cáncer, muchos oncogenes actúan mimetizando las señales regulatorias del crecimiento normal [239].

Dada la habilidad de los glicicanos de regular la actividad de factores de crecimiento [388], no es sorprendente que estudios recientes hayan asociado cambios en la expresión de GPC3 con el crecimiento tumoral. Así, por ejemplo, la expresión de GPC3 está disminuida en líneas celulares de cáncer de ovario, mesotelio y mama [333, 389, 390], sugiriendo que esta molécula podría ser considerada como un supresor tumoral [391].

La dependencia de las señales de crecimiento se hace evidente cuando se propagan células normales en cultivo, ya que típicamente sólo proliferan cuando se les proveen los factores mitogénicos apropiados. Este comportamiento contrasta fuertemente con el de la célula tumoral, que invariablemente muestra menor dependencia a la estimulación exógena del crecimiento. La conclusión es que la célula tumoral genera muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciéndose de esta manera la dependencia sobre la estimulación proveniente del microambiente normal. La liberación de la dependencia sobre la señales exógenas disrumpe críticamente el importante mecanismo homeostático que normalmente opera para garantizar el apropiado comportamiento celular [239]. En el trabajo de tesis aquí presentado, algunas observaciones sugieren que las células LM3 presentan cierta independencia de crecimiento, y que esta capacidad de crecer en ausencia de mitógenos es disminuida por la reexpresión de GPC3. En este sentido, cuando los clones fueron cultivados en ausencia de suero (que es la principal fuente de factores de crecimiento exógenos) las células LM3-GPC3 se mostraron mucho más sensibles que las controles, presentando 75% de muerte celular a las 96 horas de tratamiento (Figura 28).

Dentro del tejido normal, múltiples **señales antiproliferativas** operan para mantener la quiescencia celular y la homeostasis del tejido. Estas señales pueden incluir inhibidores solubles del crecimiento e inhibidores inmovilizados en la matriz o sobre la superficie de las células vecinas. Las señales inhibitorias del crecimiento, como su contraparte que actúa positivamente, son recibidas por receptores de superficie transmembrana acoplados al circuito de señalización intracelular.

Las señales inhibitorias del crecimiento son capaces de bloquear la proliferación por dos mecanismos distintos. Las células pueden ser forzadas a

salir del ciclo celular, entrando en un estado de quiescencia (G0) del cual son rescatadas cuando las señales extracelulares así lo permiten. Alternativamente, las células pueden ser inducidas a perder de manera permanente su potencial proliferativo, entrando en estados post-mitóticos, usualmente asociados con la diferenciación [239].

Las células cancerosas capaces de prosperar son aquellas que evaden las señales antiproliferativas. Gran parte de este circuito está asociado con el reloj del ciclo celular. El control de la progresión del ciclo celular es ejercido a través de la actividad de unos complejos formados por las ciclinas, que son las subunidades regulatorias, y por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que son las subunidades catalíticas. Además de la unión a las ciclinas, la actividad de las CDKs puede ser regulada de tres maneras diferentes. Primero, las ciclinas sólo están disponibles en el momento apropiado del ciclo celular debido a un proceso que controla su abundancia. Segundo, la actividad de las CDKs es regulada post- transcripcionalmente mediante fosforilaciones activantes y desactivantes. Finalmente, los complejos ciclina/CDK pueden interactuar con pequeñas proteínas conocidas como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) que bloquean su actividad [392].

Con el objetivo de dilucidar el papel de GPC3 en el control del crecimiento celular, en este trabajo de tesis se decidió analizar el nivel de expresión de distintos componentes de la maquinaria reguladora del ciclo celular. No se encontraron diferencias en el nivel basal de expresión de las ciclinas D1 y B1 ni del CKI p16 entre las células LM3-GPC3 y las control (Figura 30 A, B y C). En cambio, se observó que la reexpresión de GPC3 indujo un significativo aumento en el nivel basal de los inhibidores p21 y p27 (Figura 30 D y E). El incremento en la expresión de estos CKIs podría ser responsable, al menos en parte, del fenotipo menos agresivo de los clones que expresan GPC3. Podría hipotetizarse que un aumento en la expresión de los CKIs tendería a frenar la progresión del ciclo celular, conduciéndose así a un crecimiento más controlado.

Sorprendentemente, la privación de suero indujo un aumento significativo en la expresión de todas las proteínas reguladoras del ciclo celular analizadas, tanto en las células que expresan GPC3 como en las transfectadas con el vector vacío (Figura 30). Estas observaciones resultaron en un principio contradictorias,

ya que en ausencia de nutrientes es de esperar que se detenga la progresión del ciclo celular con la consiguiente disminución en la expresión de las ciclinas. Sin embargo, otros investigadores informaron resultados similares a los aquí obtenidos. Entre ellos, Imoto y colaboradores [393] encontraron que cuando se cultivan fibroblastos embrionarios de rata R6 en ausencia de suero, la expresión de las ciclinas D1 y E aparece fuertemente incrementada. Otros trabajos también asocian al aumento en la expresión de las ciclinas con la inhibición del crecimiento celular. Así, cuando la ciclina E es sobreexpresada en células de la línea mamaria epitelial de ratón no transformada HC11, aumenta significativamente la expresión del CDKI p27. Estos hallazgos indican que la sobreexpresión de la ciclina E en estas células inhibe el crecimiento celular en lugar de estimularlo, y que esto sería debido al aumento de la expresión del inhibidor p27 [394]. De manera similar, el incremento de la expresión de la ciclina D1 en líneas celulares mamarias epiteliales humanas puede inhibir la proliferación, probablemente debido a la prolongación de la fase S [395]. Un año después, el mismo grupo de investigadores informó que en algunas células mamarias epiteliales el aumento de la expresión de ciclina D1 puede inhibir el crecimiento, inducir la diferenciación y aumentar la apoptosis. Estos efectos podrían deberse, al menos en parte, al aumento de la proteína inhibitoria p27 [396]. Una asociación semejante entre la expresión de ciclinas e inhibidores fue informado por Doki y colaboradores [397]. Así, las líneas celulares de cáncer esofágico humanas que sobreexpresan la ciclina D1 tienen aumentada la expresión de p27. Por lo tanto, el hecho de que las células LM3-GPC3 y LM3-vector creciendo en ausencia de suero expresen mayores niveles de las ciclinas D1 y B1, no está en oposición con la inhibición del crecimiento celular encontrada bajo estas condiciones de cultivo. Así, el aumento de la expresión de estas ciclinas, al menos de la D1, y de los CDKIs podría explicar la inhibición del crecimiento inducida por la falta de nutrientes. Las diferencias en la susceptibilidad a la muerte celular encontradas entre las células control y las que expresan GPC3 serán discutidas en el siguiente punto, pero se hipotetiza que la mayor expresión basal de los CDKIs p21 y p27 en las células LM3-GPC3 podría estar interviniendo en este fenómeno.

En resumen, aunque las interconexiones entre varias de las señales que controlan la proliferación celular con los integrantes de la maquinaria del ciclo no han sido totalmente delineadas, si es claro que se encuentran alteradas en el desarrollo del cáncer. En el modelo presentado en este trabajo de tesis se encontró cierta independencia de las señales exógenas de crecimiento y una expresión alterada de varios componentes que controlan la progresión del ciclo celular. Se demostró que la reexpresión de GPC3 es capaz de recuperar algunos parámetros del mecanismo homeostático que opera normalmente.

### **C. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)**

La capacidad de una población de células tumorales de expandirse en número no sólo está determinada por la tasa de proliferación, sino también por la tasa de muerte celular, siendo la **apoptosis** la más representativa de ellas. Evidencias provenientes de modelos animales, líneas celulares y biopsias de tumores humanos, indican que la resistencia adquirida a la apoptosis es uno de los puntos comunes de la mayoría y tal vez de todos los tipos de cáncer.

El programa apoptótico está presente de manera latente en virtualmente todas las células del cuerpo humano. Una vez que es gatillado por una variedad de señales fisiológicas, este programa despliega una serie de pasos consecutivos que concluyen en la fragmentación celular, formándose los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas [398].

En este trabajo se evaluó el efecto de GPC3 sobre la sensibilidad a la apoptosis gatillada por el estrés inducido por la falta de nutrientes. Para ello, los distintos clones fueron incubados en ausencia de suero. Así, como se mencionó con anterioridad, se determinó que las células LM3-GPC3 presentan mayor muerte celular por apoptosis que las controles (Figura 28). En otras palabras, la reexpresión de GPC3 indujo una disminución de la resistencia a la apoptosis adquirida por las células LM3. Estos resultados coinciden con los reportados para la línea mamaria humana MCF7, donde la transfección con GPC3 genera menor número de clones que la transfección con una mutante del proteoglicano [293]. El papel de GPC3 en la apoptosis fue también sugerido por el fenotipo de los pacientes con el Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, quienes presentan mutaciones en el gen de GPC3 [298]. Estos pacientes sufren sindactilia y



presencia de mamas supernumerarias, características que pueden ser consecuencia de una deficiencia en la apoptosis durante el desarrollo. El mecanismo por el cual GPC3 puede actuar como inhibidor de la supervivencia no es claro. Sumado a la reducción en la capacidad clonogénica, es posible que la inhibición de la metástasis causada por la reexpresión de GPC3 pueda ser explicada por un aumento en la susceptibilidad a la muerte inducida por condiciones de estrés.

La maquinaria molecular apoptótica puede ser dividida en dos componentes principales: los **sensores** y los **efectores**. Los sensores son los responsables de monitorear el ambiente extra e intracelular, detectando las señales que determinan que una célula viva o muera. Estas señales regulan al segundo tipo de componentes de la maquinaria apoptótica, los efectores. Muchas de las señales que inducen apoptosis convergen en la mitocondria, la que responde liberando al citocromo c, un potente catalizador de la muerte celular [399]. Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 pueden tener funciones **pro-apoptóticas** (Bax, Bak, Bid, Bim) o **anti-apoptóticas** (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w). Estas proteínas son las que actúan conduciendo las señales mitocondriales de muerte a través de la liberación del citocromo c.

Dadas las diferencias encontradas entre los clones LM3-GPC3 y LM3-vector en la respuesta a la apoptosis inducida por la eliminación de nutrientes, se decidió analizar la expresión de las proteínas sensoras: Bax (pro-apoptótica), Bcl-2 y Bcl-xl (anti-apoptóticas). Se determinó que la reexpresión de GPC3 indujo un aumento significativo en el nivel de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax (Figura 29 B). En cambio, su reexpresión causó la disminución de los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl (Figura 29 C y D). Los cambios encontrados en estas moléculas son consistentes con la observación de que GPC3 inhibe la resistencia a la apoptosis adquirida por las células LM3.

Los efectores finales de la apoptosis incluyen una serie de proteasas intracelulares denominadas caspasas [400]. Las caspasas 8 y 9 son activadas por receptores como Fas y por la liberación del citocromo c, respectivamente. Estas caspasas activan a su vez a otras caspasas efectoras que ejecutan el programa de muerte celular programada, a través de la destrucción selectiva de

estructuras subcelulares y organelas, como también del genoma. En el modelo aquí presentado, GPC3 indujo un aumento significativo en los niveles de expresión basal del efector caspasa-9 (Figura 29 A).

En resumen, se ha propuesto que la apoptosis sería la principal barrera para el desarrollo del cáncer, dado que alteraciones en los componentes de la maquinaria apoptótica pueden afectar dramáticamente la dinámica de la progresión tumoral. En relación a esta maquinaria, la inhibición de la resistencia a la apoptosis que presentan las células LM3-GPC3 podría ser ejercida, al menos en parte, por el aumento de la expresión de las moléculas pro-apoptóticas Bax y caspasa-9 y la disminución de las anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl.

## **CONCLUSION GENERAL PARTE I**

En resumen, en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral ha sido demostrado, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, que la línea celular de adenocarcinoma mamario murino LM3 constituye un modelo experimental interesante para analizar el efecto de GPC3 sobre la progresión tumoral. Los resultados aquí presentados sugieren que GPC3 podría ser considerado un **regulador negativo** de la progresión del cáncer de mama, ya que la pérdida de su expresión estaría contribuyendo al establecimiento de un fenotipo más agresivo. Se estableció que GPC3 puede inhibir las capacidades invasiva y metastásica de las células LM3, afectando diversos procesos biológicos esenciales en las etapas de la cascada metastásica. Aunque esta inhibición inducida por GPC3 podría estar asociada con la reducción del crecimiento y supervivencia en condiciones de estrés, con la disminución de la motilidad celular, y con el incremento en la adhesión, el mecanismo preciso y las vías de señalización activadas por este proteoglicano quedan todavía por ser investigadas. Sin embargo, los resultados obtenidos aportan importantes datos sobre los mecanismos mediante los cuales GPC3 ejerce sus distintos efectos biológicos.

Dado que GPC3 inhibe el desarrollo de la metástasis pero no afecta el crecimiento del tumor primario, podría hipotetizarse que este proteoglicano estaría actuando como un **supresor de metástasis** en el modelo aquí presentado. La posible función de GPC3 como supresor de metástasis revierte especial importancia, ya que como es sabido la adquisición de la capacidad metastásica es la que transforma al cáncer en una enfermedad clínicamente incurable [401]. Aunque el proceso metastásico requiere de muchos pasos para ser completado, la eliminación de uno solo de estos pasos podría alterar el proceso. Por lo tanto, la recuperación de la expresión de los genes supresores de metástasis en las células tumorales podría producir un beneficio clínico en aquellos pacientes en los que el proceso metastásico no ha sido completado. Se considera que si bien son necesarios más análisis para esclarecer la participación de GPC3 en el proceso metastásico, los resultados presentados en este trabajo de tesis abren la posibilidad de utilizar a GPC3 como un nuevo blanco de estudio para posibles terapias contra el cáncer.

**PARTE II: Estudio de la expresión de GPC3 y de proteínas  
reguladoras del ciclo celular en pacientes con cáncer de mama  
Utilidad como marcadores tumorales**

El cáncer de mama sigue siendo uno de los tumores malignos de presentación más frecuente en las mujeres occidentales. Por estos motivos resulta de interés la posibilidad de contar con marcadores que permitan predecir la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad al momento del diagnóstico. Estos marcadores deben ser lo suficientemente sensibles como para que su modificación se anticipe a la aparición de las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad en progresión. Para tal fin, gran parte de la investigación científica de los últimos años ha estado dedicada a la identificación de moléculas producidas por el tumor o por el huésped con potencial utilidad clínica. Este tipo de marcadores tumorales permitirían, entre otras cosas, anticiparse a las manifestaciones de déficit funcional del paciente, pudiendo encararse así un tratamiento cuando las posibilidades curativas son mucho mayores [402].

**A. Estudio de la expresión de GPC3 en pacientes con cáncer de mama. Utilidad como marcador tumoral**

Diversos antecedentes vinculan a los glicoproteínas con cáncer. En el caso particular de GPC3, se ha demostrado que su expresión está disminuida en una importante proporción de líneas celulares de cáncer de ovario [311], como así también en células de mesotelioma maligno [314]. En oposición a estos resultados que señalan a GPC3 como un inhibidor del desarrollo tumoral, otros investigadores demostraron que favorece el establecimiento del fenotipo maligno. Por ejemplo, ha sido informado que la expresión de GPC3 está aumentada en la mayoría de los hepatocarcinomas [315-319, 321, 322, 403] y en los tumores colorrectales [271]. Teniendo en cuenta que el hígado y el intestino embrionarios expresan este glicoproteína, y que su expresión es silenciada en el tejido normal adulto, GPC3 ha sido postulado como una proteína oncofetal en estos órganos. En este sentido, y en comparación con el uso clínico de las

proteínas oncofetales, GPC3 podría tener alguna utilidad como marcador tumoral o como “blanco” terapéutico.

En síntesis, la expresión de GPC3 ha sido analizada por diferentes grupos en una gran variedad de tipos tumorales, como adenocarcinoma pulmonar [323, 324], cáncer gástrico [325, 326] y esofágico [326], así como también en una serie de tumores embrionarios, como neuroblastoma, meduloblastoma y tumor de Wilms, obteniéndose resultados variables acerca de su participación en el desarrollo maligno [327-332]. En general, se puede concluir que los tumores derivados de tejidos normales adultos GPC3 positivos pierden la expresión de esta glicoproteína. En cambio, si el tejido adulto no la expresa, el tumor tiende a reexpresar GPC3.

En el caso particular de la mama, se determinó que el tejido normal conserva la expresión de GPC3, mientras que los tumores la pierden [333]. Estos resultados fueron obtenidos a partir del análisis del ARNm de GPC3 ya sea por hibridación *in situ* como por RT-PCR [333], no existiendo hasta el momento ningún estudio a nivel proteico que confirme estas observaciones. En general, el nivel transcripcional y el nivel proteico no necesariamente correlacionan [404].

En referencia a la utilidad de GPC3 como marcador tumoral, recientemente se han realizados varios estudios. Así, ha sido informado que la sobreexpresión de GPC3 en carcinomas hepatocelulares puede ser utilizada como un marcador tumoral en esta patología [403-408]. Nakatsura y colaboradores determinaron también el posible uso de este glicoproteína como marcador de diagnóstico en pacientes con melanoma, especialmente de bajos estadios [409]. Por otro lado, algunos investigadores han postulado que la expresión reducida de los genes supresores de metástasis sería indicadora de la agresividad clínica, encontrándose relacionada con la supervivencia del paciente, el desarrollo de metástasis, el estadio y el grado tumoral [410, 411]. Considerando que en la primera parte de este trabajo de tesis se demostró el posible papel de GPC3 como supresor de metástasis, podría hipotetizarse que este glicoproteína tendría utilidad como marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Hasta el momento no existen trabajos que hayan analizado si la disminución de la expresión de GPC3 en los tumores de mama puede ser capaz de predecir la evolución de la enfermedad.

En base a las observaciones enunciadas anteriormente, en este trabajo de tesis se decidió investigar la utilidad potencial de la expresión de GPC3 como marcador tumoral en pacientes con cáncer de mama. Para tal fin, la expresión de GPC3 se cuantificó mediante inmunohistoquímica (IHQ) a partir de secciones de tejidos mamarios malignos como así también de patologías benignas. Como se sabe por bibliografía, la expresión de esta glicoproteína es baja en el tejido mamario normal y disminuye aún más en los tumores, por lo que fue necesario poner a punto una técnica de IHQ más sensible. La misma se basa en la deposición de tiramidas acopladas a biotina (como reactivo de amplificación), tal como fue explicado en la sección de Materiales y Métodos. Es importante destacar que únicamente fueron incluidos en este estudio pacientes con bajo estadio tumoral (EI y EII), lo que conjuntamente con el hecho de ser el primer análisis de la expresión de GPC3 utilizando un anticuerpo, aumenta la importancia del trabajo.

De esta manera, se determinó que tanto las patologías benignas (n=20) como los tumores invasivos (n=49) presentan baja expresión de GPC3. Así, únicamente el 10% de las patologías benignas fue positivo para este proteoglicano, mientras que el 20% de los tumores malignos presentaron inmunopositividad, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos analizados (Tabla XVI). Coincidentemente con la literatura, GPC3 se localizó principalmente en la membrana plasmática, aunque ocasionalmente también se encontró tinción a nivel citoplasmático (Figura 40). Inesperadamente, el tejido "normal" peritumoral, presente en algunos cortes, fue mayormente negativo.

A partir de los datos de expresión de GPC3 obtenidos por IHQ, se analizaron sus posibles relaciones con las características clínico-patológicas de las pacientes estudiadas. Ninguna de estas asociaciones resultó ser significativa en el análisis univariado (Tabla XVII). El hecho de no encontrar asociación significativa entre la inmunopositividad para GPC3 y parámetros tales como edad, estatus, tamaño tumoral, número de ganglios axilares positivos para MTS, estadio, presencia de receptores estrogénicos, tipo histológico, grado histológico, grado nuclear e índice mitótico, podría indicar que se trata de un marcador tumoral independiente. Esto le confiere especial interés ya que la cuantificación de la expresión de GPC3 estaría proporcionando una información diferente de la que se obtiene con los parámetros ya conocidos, siendo ésta una de las

características que se espera encontrar al proponer una nueva cuantificación como probable marcador tumoral.

A continuación se decidió analizar nuevamente las posibles asociaciones entre la expresión de GPC3 y las características clínicas de las pacientes, pero esta vez mediante una Prueba de Correlación de Pearson. Los resultados fueron coincidentes con los obtenidos en el análisis univariado, ya que la expresión de GPC3 no mostró estar correlacionada con ninguno de los parámetros clínico-patológicos incluidos en el estudio (Tabla XVIII).

Además de estudiar las posibles asociaciones entre la expresión de GPC3 y los parámetros clínicos arriba enumerados, se analizó también si existía alguna relación con otras moléculas utilizadas frecuentemente como marcadores de cáncer de mama. Particularmente se focalizó la atención en dos moléculas: Ki-67 (antígeno de proliferación celular, presente en todos los tumores con células en división) y el producto del oncogen erbB2/Her-2neu. La expresión de estas proteínas, que fue determinada también por IHQ, permite además de caracterizar a la estirpe celular, establecer el grado de diferenciación. Se realizaron entonces análisis de Chi cuadrado y un estudio de correlación de Pearson, no encontrándose asociación entre GPC3 y la sobreexpresión del receptor HER-2/neu ni con el número de células ciclando, determinado por Ki-67. Por lo tanto, la expresión de GPC3 sería independiente de los parámetros clínico-patológicos usados de rutina en pacientes con cáncer de mama, como así también de otras moléculas marcadoras para esta patología como son Ki-67 y HER-2/neu.

Finalmente se analizó la utilidad de la expresión de GPC3 como marcador de pronóstico, en un grupo de 27 de las pacientes con cáncer de mama de estadíos I y II. Las curvas de supervivencia de Kaplan y Meier mostraron que no existe asociación significativa entre la expresión de GPC3 y el tiempo de SLE en la población analizada (Figura 41). Si bien las pacientes con inmunopositividad para GPC3 tuvieron un tiempo de SLE más largo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. Es posible que el bajo número de datos incluidos en esta última parte del estudio haya sido el responsable de la no significancia estadística obtenida.

En base a los resultados descriptos en los párrafos precedentes, se puede concluir que la expresión de GPC3 en pacientes con cáncer de mama de bajo

estadío no resulta de utilidad como marcador de pronóstico, ya que no es capaz de predecir el tiempo de SLE. Sin embargo, sería importante realizar nuevos estudios con un mayor número de pacientes y con un período de seguimiento más prolongado, ya que siendo la expresión de GPC3 independiente de los parámetros considerados actualmente como marcadores de pronóstico, su potencial aplicabilidad es de gran interés.



## **B. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en pacientes con cáncer de mama. Utilidad como marcador tumoral**

Ha sido bien establecido que el cáncer es una enfermedad proliferativa y que varios tipos tumorales surgen a partir de alteraciones en las moléculas reguladoras de las CDKs, tales como las ciclinas (reguladores positivos), o los CDKIs (reguladores negativos) [412, 413]. En este trabajo de tesis se estudió mediante IHQ la expresión de tres ciclinas distintas (D1, E y B1) y de dos CDKIs (p16 y p21) a partir de muestras de tejido provenientes de pacientes con patologías mamarias, 56 con carcinomas infiltrantes invasivos y 23 con lesiones benignas. La expresión de estas moléculas fue también examinada en relación a los parámetros clínico-patológicos, a la supervivencia del paciente, a la proliferación celular (Ki67) y a la expresión de Her2/neu. Únicamente pacientes con cáncer de mama estadio I y II, exitosamente tratados por cirugía, fueron incluidos en este trabajo. Por otro lado, la expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16 fue determinada también por otro método inmunológico, el WB.

La bibliografía muestra pocos estudios referidos a la expresión de reguladores del ciclo celular en patologías mamarias benignas [414]. Aunque en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la expresión de las ciclinas y los CDKIs entre los tejidos malignos y benignos, se observó que los tumores invasivos presentan mayor expresión de la ciclina E y disminución del p21 (Tabla XIX y Tabla XXII). Como las patologías benignas han sido también asociadas con alteraciones en las tasas de proliferación, no es sorprendente que la expresión de algunas moléculas que controlan la división normal de las células esté desregulada. Estudios con un mayor número de pacientes son necesarios para determinar el valor real de la sobreexpresión de la ciclina E y la pérdida de su regulador negativo p21 en la adquisición del fenotipo maligno.

El punto de restricción G1/S se encuentra bien caracterizado. Es controlado principalmente por ciclina D1/CDK4,6/p16 [415]. La **ciclina D1** une las señales mitogénicas al ciclo de progresión celular a través del incremento de la fosforilación de Rb [416]. Se encuentra comúnmente sobreexpresada en los carcinomas, debido generalmente a la amplificación del gen que la codifica junto a fallas en la degradación de la proteína [415, 417]. En la serie de cáncer de

mama aquí presentada, la ciclina D1 apareció sobreexpresada en alrededor del 60% de los casos, encontrándose en el rango previamente informado (25-73%) [418]. El análisis multivariado indicó que la sobreexpresión de la ciclina D1 está únicamente asociada a la presencia de los receptores estrogénicos (RE) (Tabla XXI), como otros autores han reportado previamente [419-421]. Es sabido que la ciclina D1 es inducida por los estrógenos, como también por los factores de crecimiento, y que actúa como un sensor de la presencia de los mismos [422]. Datos recientes apoyan la idea de que la ciclina D1 también contribuye significativamente a la activación de los RE en cáncer de mama [423]. Esto podría implicar una retroalimentación positiva entre la ciclina D1 y los RE. Más aún, este trabajo de tesis confirmaría las observaciones anteriores, ya que las pacientes con tumores que expresan RE y sobreexpresan a la ciclina D1 presentan menor tiempo de SLE (Figura 45).

La otra molécula central capaz de regular G1/S es **p16**. En este trabajo de tesis se demostró que p16 posee un alto nivel de expresión en todos los tumores de mama analizados, y que esta expresión no está asociada con los parámetros clínico-patológicos (Tabla XX). Esto indicaría que la supresión de p16 no sería un evento relevante en la población tumoral aquí presentada. La baja expresión de este inhibidor en el tejido “normal” peritumoral sugiere que p16 no es requerido para mantener el orden del ciclo en la mama normal, como otros autores también han reportado [424]. Otros datos indican que el arresto celular inducido por p16 es más complejo y que requiere la presencia de otros CDKIs [164]. En este sentido, en este trabajo se muestra una correlación positiva entre la inmunotinción para p16 y p21. Esta correlación es insuficiente, al menos en la población estudiada, para limitar la velocidad de proliferación de las células tumorales.

La sobreexpresión de **ciclina E** resulta en un incremento de la actividad CDK2, que gatilla el pasaje a la fase S a través de la fosforilación de pRb [425] y la proteólisis del CDKI p27 [426]. La ciclina E se encuentra frecuentemente sobreexpresada en cáncer de mama, asociada principalmente a alteraciones en sus vías de degradación [427]. Lodén y colaboradores [428] propusieron un modelo en el cual la alta expresión en los tumores de las ciclinas D1 y E representa dos caminos alternativos para cáncer de mama. Sin embargo, en

este trabajo de tesis se encontró que alrededor del 45% de los tumores sobreexpresan ambas ciclinas simultáneamente (Tabla XIX).

La asociación entre la sobreexpresión de la ciclina E y los factores de pronóstico en cáncer de mama es controvertida. Algunos autores han encontrado una asociación entre la sobreexpresión de la ciclina E y la ausencia de RE [429]. En los tumores estudiados en este trabajo de tesis, el análisis multivariado demostró que los pacientes con mayor estadio (EIIIB) presentan un porcentaje de sobreexpresión de ciclina E significativamente menor que los pacientes EI o EIIA (Tabla XXI).

Es sabido que el complejo ciclina E/CDK2 es el responsable de la transición de la fase G1 a la fase S, y que p21 es un regulador negativo de esta actividad CDK. En este trabajo de tesis se encontró una correlación positiva entre la expresión de p21 y la de la ciclina E. El epitelio mamario normal se caracteriza por poseer baja expresión del p21, lo que es indicativo de su baja tasa de recambio [430]. En este trabajo, como en los de otros autores [424], se encontró una alta inmunopositividad para p21 en el tejido tumoral, tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático (Figura 43, Tabla XXII). Aunque el aumento de la expresión de p21 está asociado a un normal funcionamiento de p53, recientemente se ha sugerido que la acumulación nuclear de este CDKI promueve el arresto celular, mientras que su acumulación en el citoplasma inhibe la apoptosis [431]. Esto transformaría a p21 en un importante marcador de pronóstico [432]. Sin embargo, en la serie de casos estudiados en este trabajo de tesis no se encontró asociación alguna entre el tiempo de SLE y la expresión de p21, tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático.

En relación con p21 y su asociación con los factores de pronóstico clásicos, los datos existentes hasta el momento no muestran consenso. Así, se han demostrado tanto correlaciones positivas como negativas con el grado tumoral [433]. En este trabajo, no se encontró ninguna asociación entre la inmunopositividad para p21 y los parámetros clínico-patológicos (Tabla XXIII).

Sumado a lo expuesto anteriormente, se conoce que el CDKI p21 también puede asociarse al complejo ciclina B1/CDK1, impidiendo el transporte de este complejo al núcleo [434]. Este trabajo de tesis demuestra que existe una correlación entre la presencia de ciclina B1 y p21 a nivel nuclear, mientras que otros autores encuentran esta co-localización en el citoplasma [432].

La **ciclina B1** es el principal regulador de la fase G2/M. El tejido mamario normal muestra una tinción predominantemente citoplasmática para esta ciclina durante la interfase. En la mitosis, la ciclina B1 es transportada al núcleo conjuntamente con otras moléculas responsables de la división celular. Por su parte, los tumores de mama suelen presentar un alto porcentaje de tinción nuclear para esta molécula [414]. En este trabajo de tesis se encontró que alrededor del 45% de los tumores de mama sobreexpresan a la ciclina B1 a nivel nuclear, mientras que el 58% presenta tinción citoplasmática, sin existir correlación entre ellas (Figura 42 y Tabla XIX). No se encontró asociación estadísticamente significativa con los parámetros de pronóstico (Tabla XX), aunque algunos autores informaron que la ciclina B1 aparece más frecuentemente sobreexpresada en las mujeres pre-menopáusicas, en los tumores RE positivos, en los tumores con alto índice mitótico o en los casos con mayor incidencia de metástasis en nódulos linfáticos [435, 436].

Se ha informado que la sobreexpresión del receptor Her2/neu estimula enormemente la actividad del complejo ciclina E/CDK2 [437] y algunos autores han encontrado una correlación significativa entre la expresión de la ciclina E y la de Her2/neu en las mujeres post-menopáusicas con cáncer de mama [435]. Sin embargo, en este trabajo no se observó asociación entre las ciclinas y los CDKs con la sobreexpresión de Her2/neu .

En este trabajo de tesis se intentó también estimar el valor pronóstico de la expresión de los factores biológicos que actúan sobre las distintas fases del ciclo celular. La información publicada acerca de la utilidad de las ciclinas y los CDKs como marcadores de pronóstico es muy contradictoria. El análisis univariado de los resultados aquí obtenidos indicó que únicamente la sobreexpresión de la ciclina E se asocia con un menor riesgo de recurrencia en las pacientes con cáncer de mama estudiadas (Figura 44). Sin embargo, cuando otras co-variables fueron incluidas en el modelo de regresión de Cox, la sobreexpresión de ciclina E no se comportó como un marcador de pronóstico independiente.

A pesar de que la ciclina D1 ha sido ampliamente estudiada, no existe consenso acerca del valor pronóstico de su expresión [418, 419, 421]. En este trabajo de tesis se determinó que en las pacientes con RE la sobreexpresión de la ciclina D1 es indicativa de una menor supervivencia, aunque, probablemente

debido al bajo número de casos analizados, sin significación estadística (Figura 45).

En este trabajo de tesis se analizó también el efecto combinado de alteraciones en la expresión de las ciclinas y los CDKIs sobre el tiempo de SLE. Ninguna de las combinaciones estudiadas mostró tener valor pronóstico.

Finalmente, la expresión de la ciclina D1 y del CDKI p16 fue medida en la misma población tumoral mediante WB (Figura 46). No se encontraron diferencias en los valores de expresión obtenidos a partir de estas cuantificaciones entre el tejido maligno y las patologías benignas. Tampoco se encontró asociación alguna con los parámetros clínico-patológicos incluidos en el estudio ni con el tiempo de SLE.

Por otro lado, se analizó también si la expresión de la ciclina D1 y del p16 medida en la misma muestra por dos métodos inmunológicos diferentes (IHQ y WB) mostraba alguna asociación. Sin embargo, no se encontró correlación entre ambas técnicas. Las razones de esta discrepancia podrían deberse a: a) heterogeneidad tumoral, que puede ser la causante de diferentes resultados en dos muestras de tejidos separadas del mismo carcinoma, b) diferencias en la sensibilidad de las técnicas, c) variaciones en la proporción de tumor-estroma en la muestra de tejido utilizada para la extracción proteica y WB.

Si bien la IHQ se ha convertido en el principal método utilizado en la patología moderna, la misma puede incurrir en errores técnicos. Un ejemplo de esto son los estudios del p16, donde la interpretación de la IHQ es muy dificultosa a causa de la frecuente tinción citoplasmática encontrada [438]. Debido a que se ha demostrado que p16 actúa como inhibidor del ciclo celular y como supresor tumoral en el núcleo, la reactividad citoplasmática fue en general considerada como inespecífica e ignorada por la mayoría de los autores [439-441]. Sorprendentemente, otros investigadores encontraron una fuerte tinción citoplasmática para p16 en carcinomas mamarios, que fue asociada con factores de pronóstico negativos como bajo grado de diferenciación, pérdida de receptores de estrógeno y progesterona, y alta expresión de Ki67 y p53 [442].

Varios trabajos han puesto énfasis en las diferencias obtenidas al analizar una expresión proteica por métodos distintos. Entre ellos, Milde-Langosch y colaboradores utilizaron WB para estudiar la expresión de p16 en tumores de mama y compararla con su tinción IHQ. Los autores encontraron diferencias en las correlaciones entre la expresión de p16 obtenida por las dos técnicas con el receptor de progesterona, la expresión de Ki67 y el desarrollo de nódulos. Estas contradicciones podrían derivar de diferencias en la sensibilidad de los métodos utilizados o de variaciones en el agrupamiento de los casos para el análisis estadístico [438].

En conclusión, en este trabajo de tesis se confirma que las relaciones entre las ciclinas y los CDKs son mucho más complejas de lo que previamente se pensaba. Se estableció también que, aunque algunos reguladores del ciclo celular están alterados en un gran número de pacientes con tumores de mama de bajo estadio, estas anormalidades no son indicativas de un peor pronóstico.

### **C. Relación entre la expresión de GPC3 y proteínas reguladoras del ciclo celular**

La primera parte de este trabajo de tesis reveló una expresión alterada de varias proteínas reguladoras del ciclo celular en aquellas células que expresaban GPC3. Estos estudios, como se explicó anteriormente, fueron realizados en un modelo experimental murino. El último objetivo de la segunda parte de este trabajo fue estudiar si existen asociaciones entre GPC3 y las moléculas reguladoras del ciclo celular en la población de tumores de mama humanos aquí analizada.

El análisis univariado reveló que la expresión de GPC3 es independiente de la expresión de las ciclinas D1, E y B1 y de los inhibidores p16 y p21 (Tabla XXV). Este mismo resultado fue obtenido al realizar un estudio de correlación de Pearson (Tabla XXVI).

En resumen, los resultados presentados en esta segunda parte del trabajo de tesis demostraron que la expresión de GPC3 no tiene asociación con los parámetros clínico-patológicos utilizados de rutina en la clínica, como así tampoco con otros marcadores de tumores de mama (Ki-67 y HER2-neu), ni con la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclinas D1, E y B1 y CDKs p16 y p21).

## **CONCLUSION GENERAL PARTE II**

En conclusión, en este trabajo de tesis se confirmó, mediante inmunodetección, que la expresión de GPC3 es muy baja o ausente en los tumores de mama. Esta observación es válida tanto para carcinomas ductales infiltrantes como para las patologías benignas. A pesar de que en un principio GPC3 parecía ser un marcador de pronóstico prometedor, porque su expresión es independiente de otros marcadores utilizados en la clínica, no fue capaz de predecir el tiempo de SLE de las pacientes. Por lo tanto, la expresión de GPC3 carecería de valor como marcador de pronóstico en pacientes con cáncer de mama de bajo estadío.

Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclinas D1, E y B1 y CDKIs p21 y p16) en la misma población de pacientes con cáncer de mama. Aunque los tumores malignos mostraron un aumento en la expresión de la ciclina E y una disminución del p21 cuando se los comparó con las patologías benignas, estas observaciones carecen de validez estadística. Al buscar las asociaciones con las características clínicas, la sobreexpresión de las ciclinas D1 y E estuvo asociada con la presencia de RE y el estadío tumoral respectivamente. Al analizar la SLE, ninguna de las moléculas reguladoras del ciclo celular estudiadas en este trabajo de tesis mostró tener utilidad como marcador de pronóstico independiente en pacientes con cáncer de mama de estadíos I y II. Sin embargo, se pudo observar que en las pacientes que poseen RE la sobreexpresión de la ciclina D1 estuvo asociada con un menor tiempo de SLE (NS). Por último, no se encontró asociación entre la expresión de los reguladores del ciclo celular estudiados en este trabajo y la expresión de GPC3.

Por lo tanto, a pesar de haber encontrado distintas alteraciones en la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular, estas no parecen ser de utilidad para predecir la supervivencia de pacientes con cáncer de mama de bajo estadío.



# REFERENCIAS

1. Evans DG, Burnell LD, Hopwood P, Howell A. *Perception of risk in women with a family history of breast cancer*. Br J Cancer, 1993. **67**: p. 612-614.
2. Matos E, Loria D, Vilenski D, García C. *Tasas de mortalidad para el período 1989-1992. Atlas de mortalidad por cáncer*, ed. cáncer Comité Argentino de Coordinación- Programa Latinoamericano contra el. 1997, Buenos Aires, Argentina. 12-30.
3. Matos E, Loria D, Zengarini N. *Atlas de Mortalidad por cáncer. Argentina 1997-2001*, ed. Matos E Loria D. 2003, Buenos Aires, Argentina.
4. Daniel C.W., Silberstein, G.B., ed. *The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Postnatal development of the rodent mammary gland., ed. Neville M.C. and Daniel, D.W. 1987, Plenum Press Publishing Corp., NY. 3-36.
5. Russo J, Tay LK, Russo IH. *Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis*. Breast Cancer Res Treat, 1982. **2**: p. 5-73.
6. Smalley M, Ashworth A. *Stem cells and breast cancer: a field in transit*. Nature Rev, 2003. **3**: p. 832-844.
7. Russo J, Rivera R, Russo IH. *Influence of age and parity on the development of the human breast*. Breast Cancer Res Treat, 1992. **23**: p. 211-218.
8. Ewing J. *A treatise on tumors*. 3 ed, ed. Saunders W. B. 1928, Philadelphia.
9. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. *An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to posible precancerous lesions*. J Natl Cancer Inst, 1975. **55**: p. 231-273.
10. Bumaschny B, Urtreger A, Diamente M, Krasnaposki M, Fiszman G, Klein S, Bal de Kier Joffé E. *Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. 116-129.
11. Morrison SJ, Wright DE, Chesier SH, Weissman IL. *Hematopoietic stem cells: challenges to expectations*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(2): p. 216-221.
12. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-111.
13. Lavker RM, Miller SJ, Sun TT. *Epithelial stem cells, hair follicles, and tumor formation*. Recent Results Cancer Res, 1993. **128**: p. 31-43.
14. Morrison SJ, Weissman IL. *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-673.
15. Potten CS, Loeffler M. *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. Development, 1990. **110**(4): p. 1001-1020.

16. Smith GH, Strickland P, Daniel CW. *Putative epithelial stem cell loss corresponds with mammary growth senescence*. Cell Tissue Res, 2002. **310**(3): p. 313-320.
17. Smith GH, Chepko G. *Mammary epithelial stem cells*. Microsc Res Tech, 2001. **52**(2): p. 190-203.
18. Sell S, Pierce GB. *Maturation arrest of stem cells differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers*. Lab Invest, 1994. **70**(1): p. 6-22.
19. Kordon EC, Smith GH. *An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell*. Development, 1998. **125**(10): p. 1921-1930.
20. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. *Breast cancer (1)*. N Engl J Med, 1992. **327**: p. 19-28.
21. *The World Health Organization Histological Typing of Breast Tumors*. Am J Clin Pathol, 1982. **78**: p. 806-816.
22. Lippman ME. *Growth regulation of human breast cancer*. Clin Res, 1985. **33**: p. 375-382.
23. Vorherr H, Messer RH. *Breast cancer: potentially predisposing and protecting factors. Role of pregnancy, lactation, and endocrine status*. Am J Obstet Gynecol, 1978. **130**: p. 335-358.
24. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. *'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer*. Nature, 1983. **303**: p. 767-770.
25. Franks LM, Bollen A, Seeger RC, Stram DO, Matthay KK. *Neuroblastoma in adults and adolescents: an indolent course with poor survival*. Cancer, 1997. **79**: p. 2028-2035.
26. Dickson RB, Lippman ME. *Growth factors in breast cancer*. Endocr Rev, 1995. **16**: p. 559-589.
27. Medina D. *The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996. **1**: p. 5-19.
28. Nandi S, Guzman RC, Yang J. *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 3650-3657.
29. King RJ. *William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis*. Breast Cancer Res Treat, 1993. **27**: p. 3-15.
30. Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB. *Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis*. Hum Reprod, 1994. **9 Suppl 1**: p. 162-173.
31. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP. *Lactation and reduced risk of premenopausal breast cancer*. N Engl J Med, 1994. **330**: p. 81-87.

32. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH. *Breast cancer associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia*. *Cancer*, 1993. **71**: p. 1258-1265.
33. Hulka BS, Liu ET, Lininger RA. *Steroid hormones and risk of breast cancer*. *Cancer*, 1994. **74**: p. 1111-1124.
34. IARC Scientific Publications, World Health Organization. *Hormonal contraception and postmenopausal hormonal therapy (2-9 June 1998)*. Vol. 72. 1999, Lyon, France.
35. Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Egan KM. *Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**: p. 593-600.
36. White E, Malone KE, Weiss NS, Daling JR. *Breast cancer among young U.S. women in relation to oral contraceptive use*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**: p. 505-514.
37. Breast Collaborative Group in Hormonal Factors in. *Breast cancer and hormonal replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer*. *Cancer Lancet*, 1997. **350**: p. 1047-1059.
38. Tamura K., Utsunomiya J., Iwama T., Furuyama J., Takagawa T., Takeda N., Fukuda Y., Matsumoto T., Nishigami T., Kusahara K., Sagayama K., Nakagawa K., Yamamura T. *Mechanism of carcinogenesis in familial tumors*. *Int J Clin Oncol*, 2004. **9**(4): p. 232-45.
39. Harms K., Nozell S., Chen X. *The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(7-8): p. 822-42.
40. Frebourg T, Malkin D, Friend S. *Cancer risks from germ line tumor suppressor gene mutations*. *Princess Takamatsu Symp*, 1991. **22**: p. 61-70.
41. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. *Science*, 1994. **266**: p. 66-71.
42. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. *Science*, 1994. **264**: p. 2088-2090.
43. Yoshida K, Miki Y. *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(11): p. 866-871.
44. Thomas DB. *The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives: the influence of combined oral contraceptives on risk of neoplasms in developing and developed countries*. *Contraception*, 1991. **43**: p. 695-710.
45. Thompson H. J., Zhu Z., Jiang W. *Weight control and breast cancer prevention: are the effects of reduced energy intake equivalent to those of increased energy expenditure?* *J Nutr*, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3407S-3411S.

46. Armstrong B, Doll R. *Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices*. Int J Cancer, 1975. **15**: p. 617-631.
47. Korach KS, McLachlan JA. *Techniques for detection of estrogenicity*. Environ Health Perspect, 1995. **103**(7): p. 5-8.
48. Mettlin C. *Global breast cancer mortality statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. **49**: p. 138-144.
49. Yamaguchi Y. [*Endocrine tumors and growth factors*]. Nippon Rinsho, 2004. **62**(5): p. 871-6.
50. V Schirmacher. *Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies*. Adv Cancer Research, 1985. **43**: p. 1-73.
51. S Paget. *Distribution of secondary growths in cancer of the breast*. Lancet, 1889. **1**: p. 571-573.
52. J Ewing. *A treatise on tumors*. 3 ed, ed. Saunders W. B. 1928, Philadelphia.
53. Rusciano D, Burger M. *Mechanisms of metastasis*. Molecular Genetics of Nervous System Tumors,, 1993: p. 357-369,.
54. Fidler IJ, Radinsky R. *Search for genes that suppress cancer metastasis*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**: p. 1700-1703.
55. C Lucke-Huhle. *Permissivity for methotrexate-induced DHFR gene amplification correlates with the metastatic potential of rat adenocarcinoma cells*. Carcinogenesis, 1994. **15**: p. 695-700.
56. Fais Stefano. *A role for ezrin in a neglected metastatic tumor function*. Trends Mol Med, 2004. **10**(6): p. 249-50.
57. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. *Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**: p. 200-204.
58. Yoshida B. A., Sokoloff M. M., Welch D. R., Rinker-Schaeffer C. W. *Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(21): p. 1717-30.
59. Cicek M., Samant R. S., Kinter M., Welch D. R., Casey G. *Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis-suppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(2): p. 149-57.
60. Welch D. R., Hunter K. W. *A new member of the growing family of metastasis suppressors identified in prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(12): p. 839-41.
61. Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL. *KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer*. Cancer Lett, 1997. **119**: p. 149-155.
62. PS Steeg. *Metastasis suppressors alter signal transduction of cancer cells*. Nature Rev, 2003. **3**: p. 55-63.

63. Harms J. F., Welch D. R., Miele M. E. *KISS1 metastasis suppression and emergent pathways*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(1): p. 11-8.
64. Meehan W. J., Welch D. R. *Breast cancer metastasis suppressor 1: update*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(1): p. 45-50.
65. Meehan W. J., Samant R. S., Hopper J. E., Carrozza M. J., Shevde L. A., Workman J. L., Eckert K. A., Verderame M. F., Welch D. R. *Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1562-9.
66. Welch D. R. *Microarrays bring new insights into understanding of breast cancer metastasis to bone*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(2): p. 61-4.
67. Miguez M, Davel L, Sacerdote de Lustig ES. *Lymphocyte- induced angiogenesis: Correlation with the metastatic incidence of two murine mammary adenocarcinomas*. Inv Met, 1986. **6**: p. 313.
68. Tripathy D, Benz C. *Growth factors and their receptors*. Hematol Oncol Clin Norht Am, 1994. **8**: p. 29-50.
69. Matrisian LM, Crawford HC, Fingleton B. *Matrix metalloproteinases in tumor progression*. Proc Am Ass Cancer Res, 1999. **40**: p. 769-770.
70. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. *The biochemistry of cancer dissemination*. Crit Rev biochem Mol Biol, 1997. **32**: p. 175-253.
71. GL Nicolson. *Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites*. Biochem Biophys Acta, 1998. **948**: p. 175-224.
72. Lee J, Ishihara A, Theriot J, Jacobson K. *Principles of locomotion for simple-shaped cells*. Nature, 1993. **362**: p. 167-171.
73. Lauffenburger D, Horwitz A. *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**: p. 359-369.
74. Stracke ML, Aznavoorian S, Beckner M. *Cell motility, a principal requirement for metastasis*, in *Cell motility factors*, ID Goldberg, Editor. 1991: Basel, Verlag.
75. Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H. *Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells*. J Cell Biol, 1990. **110**: p. 1427-1438.
76. J Folkman. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J N C I, 1990. **82**: p. 4-6.
77. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cell, 1991. **64**: p. 327-336.
78. Kalluri R. *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
79. Sund M., Xie L., Kalluri R. *The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis*. Apmis, 2004. **112**(7-8): p. 450-62.

80. Engbring JA, Kleinman HK. *The basement membrane matrix in malignancy*. J Pathol, 2003. **200**: p. 465-470.
81. Weinstat-Saslow D, Steeg P. *Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances*. FASEB J, 1994. **8**: p. 401-407.
82. Nagase H, Woessner JR. *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 21491-21494.
83. Morgunova E, Tuuttila A, Bergman U, et al. *Structure of human pro-MMP-2: activation mechanism revealed*. Science, 1999. **284**: p. 1667-1669.
84. ED Hay. *Cell Biology of extracellular matrix*. 2 ed, ed. ED Hay. 1991: Plenum.
85. Birk D.E., Siver, F.H., Trelstadt, R.L. *Matrix assembly*, in *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 1991, Plenum Press Publishing Corp: New York. p. 221-254.
86. Yurchenko PD, Schitnny JC. *Molecular architecture of basement membrane*. FASEB J, 1990. **4**: p. 1577-1590.
87. Stetler-Stevenson WC, Aznavoorian S, Liotta LA. *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 541-573.
88. Roche PH, Figarella-Branger D, Daniel L, Bianco N, Pellet W, Pellissier JF. *Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumor*. J Neurol Sci, 1997. **151**: p. 127-133.
89. Humphries MJ, Newham P. *The structure of cell-adhesion molecules*. Trends Cell Biol Rev, 1998. **8**: p. 78-83.
90. Cavallaro C, Christofori G. *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nature Rev, 2004. **4**: p. 118-132.
91. Foty R. A., Steinberg M. S. *The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation*. Dev Biol, 2005. **278**(1): p. 255-63.
92. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. *Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization*. Nature, 1996. **380**: p. 360-364.
93. Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S., Polakis P. *Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1023-6.
94. Willert K., Nusse R. *Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(1): p. 95-102.
95. Morin P. J. *beta-catenin signaling and cancer*. Bioessays, 1999. **21**(12): p. 1021-30.
96. Barth A. I., Nathke I. S., Nelson W. J. *Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(5): p. 683-90.

97. Morin P. J., Sparks A. B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K. W. *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
98. Korinek V., Barker N., Morin P. J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K. W., Vogelstein B., Clevers H. *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
99. Huber O., Korn R., McLaughlin J., Ohsugi M., Herrmann B. G., Kemler R. *Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1*. Mech Dev, 1996. **59**(1): p. 3-10.
100. Molenaar M., van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O., Clevers H. *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 1996. **86**(3): p. 391-9.
101. Behrens J., von Kries J. P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W. *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
102. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells*. J Cell Biol, 1991. **113**(1): p. 173-185.
103. Hirohashi S, Kanai Y. *Cell adhesion system and human cancer morphogenesis*. Cancer Sci, 2003. **94**: p. 575-581.
104. Birchmeier W, Behrens J. *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochem Biophys Acta, 1994. **1198**: p. 11-26.
105. Miyaki M., Tanaka K., Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Konishi M., Takeichi M. *Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells*. Oncogene, 1995. **11**(12): p. 2547-52.
106. St Croix B., Sheehan C., Rak J. W., Florenes V. A., Slingerland J. M., Kerbel R. S. *E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1)*. J Cell Biol, 1998. **142**(2): p. 557-71.
107. Zhu A. J., Watt F. M. *Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes*. J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 13): p. 3013-23.
108. Brinck U., Jacobs S., Neuss M., Tory K., Rath W., Kulle B., Fuzesi L. *Diffuse growth pattern affects E-cadherin expression in invasive breast cancer*. Anticancer Res, 2004. **24**(4): p. 2237-42.
109. Ley K. *The role of selectins in inflammation and disease*. Trends Mol Med, 2003. **9**(6): p. 263-8.
110. Borsig L. *Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 16-21.



111. Newham P, Humphries MJ. *Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine*. Mol Med Today, 1996. **2**: p. 304-313.
112. 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, 1995. **373**: p. 539-544.
113. Casasnovas JM, Springer TA, Liu JH, Harrison SC, Wang JH. *Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface*. Nature, 1997. **387**: p. 312-315.
114. Chung J., Mercurio A. M. *Contributions of the alpha6 integrins to breast carcinoma survival and progression*. Mol Cells, 2004. **17**(2): p. 203-9.
115. Taddei I., Faraldo M. M., Teuliere J., Deugnier M. A., Thiery J. P., Glukhova M. A. *Integrins in mammary gland development and differentiation of mammary epithelium*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(4): p. 383-94.
116. Hampel H, Schwarz MJ, Kötter HU, Schneider C, Müller E. *Cell Adhesion molecule in central nervous system*. DN&P, 1996. **9**: p. 69-81.
117. He W, Cowin P, Stokes DL. *Untangling desmosomal knots with electron tomography*. Science, 2003. **302**: p. 109-113.
118. Cavallaro C, Christofori G. *Cell adhesion in tumor invasion and metastasis*. Biochem Biophys Acta, 2001. **1552**: p. 39-45.
119. Mac Dougall JR, Matrisian LM. *Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinase to tumor progression, invasion and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1995. **14**: p. 351-362.
120. De Clerk YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE. *Protease and protease inhibitors in tumor progression*. Adv Exp Med Biol, 1997. **425**: p. 89-97.
121. Boyer MJ, Tannock IF. *Lysosomes, lysosomal enzymes, and cancer*. Adv Cancer Res Review, 1993. **60**: p. 269-291.
122. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. *Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed*. Science, 1999. **284**(5420): p. 1667-1670.
123. Nagase H. *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-160.
124. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol, 1997. **74**(2): p. 111-122.
125. Fata J. E., Werb Z., Bissell M. J. *Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(1): p. 1-11.
126. Werb Z, Yan Y. *A cellular striae act*. Science, 1998. **282**: p. 1279-1280.

127. Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, Di Francesco C, Caenazzo C, Onisto M, Micela M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. *Correlation of serum metalloproteases levels with lung cancer metastasis and response to therapy*. *Cancer Res*, 1992. **52**(16): p. 4548-4549.
128. Monteagudo C, Merino M, San Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. *Immunohistological distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue*. *Am J Pathol*, 1990. **136**: p. 585-592.
129. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**: p. 1135-1149.
130. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. *Matrix metalloproteinases: Structures, evolution and diversification*. *FASEB J*, 1998. **12**(12): p. 1075-1095.
131. Chambers AF, Matrisian LM. *Changing views of the role of matrix metalloproteases in metastasis*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. **89**: p. 1260-1270.
132. 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 Res*, 1998. **58**: p. 2240-2244.
133. Ossowski L. *In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell-surface bound urokinase*. *J Cell Biol*, 1988. **107**: p. 2435-2437.
134. Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. *ERK MAPK activity as a determinant of tumor growth and dormancy; Regulation by p38SAPK1*. *Cancer Res*, 2003. **63**: p. 1684-1695.
135. Aguirre Ghiso J, Alonso D, Farías E, Gómez D, Bal de Kier Joffé E. *Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype*. *Eur J Biochem*, 1999. **263**: p. 295-304.
136. Majno G, Joris I. *Cells, tissues and disease: Principles of general pathology*. 1 ed, ed. Inc Blackwell Science. 1996.
137. Howard A, Pelc SR. *Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relationship to chromosome breakage*. *Heredity*, 1953. **6**: p. 261-273.
138. R Baserga. *The cell cycle*. *N Engl J Med*, 1981. **304**: p. 453-459.
139. DO Morgan. *Principles of CDK regulation*. *Nature*, 1995. **374**: p. 131-134.
140. al Elledge et. *A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorogenesis*. *Trends Cell Biol*, 1996.
141. CJ Sherr. *Mammalian G1 cyclins*. *Cell*, 1993. **73**: p. 1059-1065.
142. Sweeney KJE, Musgrove E, Watts C, Sutherland R. *Cyclins and breast cancer*. 1996. **8**: p. 141-170.

143. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper WJ, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle*. Science, 1992. **257**: p. 1689-1694.
144. Dulic V, Lee E, Reed SI. *Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase*. Science, 1992. **257**: p. 1958-1961.
145. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J. *Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines*. Oncogene, 1994. **9**: p. 707-718.
146. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. *Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 1669-1679.
147. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato J-Y, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. *Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts*. Genes Dev, 1993. **7**: p. 1559-1571.
148. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang Y-J, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB. *Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression*. Oncogene, 1993. **8**: p. 3447-3457.
149. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato J-Y. *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**: p. 2066-2076.
150. Kato J-Y, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(331-342).
151. Muller H, Lukas J, Scheneider A, Warthoe P, Bartey J, Eilers M, Strauss M. *Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 2945-2949.
152. Hinds PW, Weinberg RA. *Tumor suppressor genes*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**: p. 135-141.
153. Dutta A, Stillman B. *cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication*. EMBO J, 1992. **11**: p. 2189-2199.
154. Fotedar R, Roberts JM. *Cell cycle regulated phosphorylation of RPA-32 occurs within the replication initiation complex*. EMBO J, 1992. **11**: p. 2177-2187.
155. Norbury C, Nurse P. *Animal cell cycles and their control*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 441-470.
156. Lamb NJ, Cavadore JC, Labbe JC, Maurer RA, Fernández A. *Inhibition of cAMP-dependent protein kinase plays a key role in the induction of mitosis and nuclear envelope breakdown in mammalian cells*. EMBO J, 1991. **11**: p. 1523-1533.

157. Hannon G, Beach D. *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**: p. 257-261.
158. Hunter T, Pines JC. *Cyclins and cancer*. Cell, 1991. **66**: p. 1071-1074.
159. Dutta A, Chandra R, Leiter L, Lester S. *Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 5386-5390.
160. Russo AA, Tong L, Lee LO, Jeffrey PD, Pavletich NP. *Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase cdk6 by the tumor suppressor p16INK4a*. Nature, 1998. **395**: p. 237-243.
161. Parry D, Bates S, Mann D, Peters G. *Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product*. EMBO J, 1995. **14**(503-511).
162. NP Pavletich. *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and Ink 4 inhibitors*. J Mol Biol, 1999. **287**: p. 821-828.
163. Russo AA, Jeffrey PD, Patten Ak, Massague J, Pavletich NP. *Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex*. Nature, 1996. **382**: p. 325-331.
164. Sherr CJ, Roberts JM. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**: p. 1501-1512.
165. Danen H, Yamada K. *Fibronectin, Integrins, and Growth Control*. J Cell Phys, 2001. **189**: p. 1-13.
166. Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Bronson RT, Sicinski P. *Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1- deficient mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**: p. 194-199.
167. Tong W, Pollard JW. *Genetic evidence for the interactions of cyclin D1 and p27(Kip1) in mice*. Mol Cell Biol, 2001. **21**: p. 1319-1328.
168. el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**: p. 817-825.
169. Xiong Y, Hannon GL, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-704.
170. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Exp Cell Res, 1994. **211**: p. 90-98.
171. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
172. Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J. *Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta*. Science, 1993. **260**: p. 536-539.

173. Hunter T, Pines JC. *Cyclins and cancer II: Cyclin D and Cdk inhibitors come of age*. Cell, 1994. **79**: p. 573-582.
174. Wang J, Chevinesse X, Henglein B, Brechot C. *Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma*. Nature, 1990. **343**: p. 555-557.
175. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg H, Arnold A. *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene*. Nature, 1991. **350**: p. 512-515.
176. Dickson RB, Lippman ME. *New approaches in the therapy of breast cancer--introduction*. Breast Cancer Res Treat, 1996. **38**(1): p. 1-2.
177. Prall OW, Rogan EM, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL. *c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 4499-44508.
178. Wang J, Cardiff R, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt E. *Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice*. Nature, 1994. **369**: p. 669-671.
179. Musgrove EA, Hui R, Sweeney J, Watts C, Sutherland R. *Cyclins and breast cancer*. Mammary Gland Biol and Neoplasia, 1996. **1**: p. 153-162.
180. Nielsen NH, Loden M, Cajander J, Emdin SO, Landberg G. *G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **56**: p. 105-112.
181. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Less E, Finger H, Pardee A. *Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer*. Cancer Res, 1994. **54**: p. 380-385.
182. Keyomarsi K, Pardee A. *Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 1112-1116.
183. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. *Simultaneous analysis of cell cycle kinetics at two different DNA ploidy levels based on DNA content and cyclin B measurements*. Cancer Res, 1993. **53**: p. 5096-5099.
184. Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. *Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines*. Cancer Res, 1994. **54**: p. 4285-4288.
185. Dickson RB, Lippman ME. *Mammary tumor cell cycle, differentiation and metastasis*. 1996. **8**: p. 141-170.
186. Miliani de Marval P, Gimenez-Conti I, LaCava M, Martinez M, Conti C, Rodriguez-Puebla M. *Transgenic expression of CDK4 results in epidermal hyperplasia and severe dermal fibrosis*. Am J Pathol, 2001. **159**: p. 369-379.
187. Miliani de Marval P, Macias E, Conti C, Rodriguez-Puebla M. *Enhanced malignant tumorigenesis in Cdk4 transgenic mice*. Oncogene, 2004. **23**: p. 1863-1873.

188. Rane SG, Cosenza S, Mettus RV, Reddy EP. *Germ line transmission of the Cdk4R24C mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence*. Mol Cell Biol, 2002. **22**: p. 644–656.
189. Sotillo R, Dubus P, Martin J, de la Cueva E, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. *Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors*. EMBO J, 2001. **20**: p. 6637–6647.
190. Miliani de Marval P, Macias E, Rounbehler R, Sicinski P, Kiyokawa H, Johnson D, Conti C, Rodriguez-Puebla M. *Lack of Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibits c-myc Tumorigenic Activities in Epithelial Tissues*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7538–7547.
191. He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS, James CD. *CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 homozygous deletion in glioma cell lines*. Cancer Res, 1994. **54**: p. 5804–5807.
192. An H, Beckmann MW, Reifenger G, Bender HG, Niederacher D. *Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation*. Am J Pathol, 1999. **154**: p. 113–118.
193. Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Hosaka T, Yamamoto H, Nakashima Y, Tsuboyama T, Nakamura T, Sasaki M, Toguchida J. *Amplification of CDK4 gene in sarcomas: tumor specificity and relationship with the Rb mutation*. Anticancer Res, 1998. **18**: p. 2317–2321.
194. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**: p. 1281–1284.
195. Zuo L. *Germline mutation in the p16Ink4a binding domain of cdk4 in familial melanoma*. Nat Genet, 1996. **12**: p. 97–99.
196. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 1994. **368**: p. 753-756.
197. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussian SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. *Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 11045-11049.
198. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science, 1994. **264**: p. 436-440.
199. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
200. Wyllie AH. *Apoptosis: an overview*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 451-65.

201. Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M. *Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis*. Biotechniques, 1993. **15**(6): p. 1032-40.
202. Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, Leblanc J, Chaly N. *The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes*. Exp Cell Res, 1992. **200**(2): p. 416-24.
203. Dusenbury CE, Davis MA, Lawrence TS, Maybaum J. *Induction of megabase DNA fragments by 5-fluorodeoxyuridine in human colorectal tumor (HT29) cells*. Mol Pharmacol, 1991. **39**(3): p. 285-9.
204. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. *Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes*. Cancer Res, 1991. **51**(4): p. 1078-85.
205. Sun XM, Cohen GM. *Mg(2+)-dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 14857-60.
206. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. Embo J, 1993. **12**(9): p. 3679-84.
207. Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. *Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death)*. Embo J, 1993. **12**(1): p. 371-7.
208. Barry MA, Reynolds JE, Eastman A. *Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification*. Cancer Res, 1993. **53**(10 Suppl): p. 2349-57.
209. Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA, Meyers J. *Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(7): p. 3060-9.
210. Hengartner MO, Horvitz HR. *The ins and outs of programmed cell death during C. elegans development*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1994. **345**(1313): p. 243-6.
211. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death*. Nature, 1992. **356**(6369): p. 494-9.
212. Yuan JY, Horvitz HR. *The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death*. Dev Biol, 1990. **138**(1): p. 33-41.
213. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell, 1993. **75**(4): p. 641-52.

214. Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. Cell, 1994. **76**(4): p. 665-76.
215. Leist M, Nicotera P. *The shape of cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(1): p. 1-9.
216. Raff MC. *Social controls on cell survival and cell death*. Nature, 1992. **356**(6368): p. 397-400.
217. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science, 1993. **262**(5134): p. 695-700.
218. Steller H, Grether ME. *Programmed cell death in Drosophila*. Neuron, 1994. **13**(6): p. 1269-74.
219. Robinow S, Talbot WS, Hogness DS, Truman JW. *Programmed cell death in the Drosophila CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform*. Development, 1993. **119**(4): p. 1251-9.
220. Yuan J. *Transducing signals of life and death*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 247-51.
221. Wallach D. *Apoptosis. Placing death under control*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 123, 125-6.
222. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
223. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
224. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
225. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
226. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
227. Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ, Hengartner MO. *Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED-4*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 653-6.
228. Nagata S. *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**: p. 355-365.
229. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.



230. Clawson GA, Norbeck LL, Hatem CL, Rhodes C, Amiri P, McKerrow JH, Patierno SR, Fiskum G. *Ca(2+)-regulated serine protease associated with the nuclear scaffold*. Cell Growth Differ, 1992. **3**(11): p. 827-38.
231. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature, 1994. **371**(6495): p. 346-7.
232. Danial N, Korsmeyer SJ. *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**: p. 205–219.
233. Lindholm D, Eriksson O, Korhonen L. *Mitochondrial proteins in neuronal degeneration*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**: p. 753–758.
234. Lindholm D, Arumäe U. *Cell differentiation: reciprocal regulation of Apaf-1 and the inhibitor of apoptosis proteins*. J Cell Biol, 2005. **167**(2): p. 193-195.
235. Hill MM, Adrain C, Duriez J, Creagh EM, Martin S. *Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes*. EMBO J, 2004. **23**: p. 2134–2145.
236. Wright KM, Linhoff MW, Ryan Potts P, Deshmukh M. *Decreased apoptosome activity with neuronal differentiation sets the threshold for strict IAP regulation of apoptosis*. J Cell Biol, 2004. **167**: p. 303–313.
237. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**: p. 1899–1911.
238. Hill MM, Adrain C, JM Seamus. *Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows*. Mol Inter, 2005. **3**(1): p. 19-26.
239. Hanahan D, Weinberg RA. *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
240. Harris CC. *p53 tumor supressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective*. Carcinogenesis, 1996. **17**: p. 1187-1198.
241. Strasser A, Huang DCS, Vaux D. *The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy*. Biochem Biophys Acta, 1997. **133**: p. F151-F178.
242. Hardingham TE , Fosang AJ. *Proteoglycans: many forms and many structures*. FASEB J, 1992. **6**: p. 861-870.
243. Kjellen L, Lindhal U. *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-475.
244. Gallagher JT. *Heparan sulphates as membrane receptors for fibroblast growth factors*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32**: p. 239-247.
245. Rapraeger AC, Guimond S, Krufka A, Olwin BB. *Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling*. Meth Enzym, 1994. **245**: p. 219-240.

246. Reichsman F, Smith L, Cumberledge S. *Glycosoaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction.* J Cell Biol, 1996. **135**: p. 819-827.
247. Schuger L, Johnson GR, Gilbride K, Polwman GD, Mandel R. *Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation.* Development, 1996. **122**: p. 1759-1767.
248. Sakata H, Sathl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sacaguchi K, Wingfield PT, Rubin JS. *Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms.* J Biol Chem, 1997. **272**: p. 9457-9263.
249. Mast AE, Higuchi DA, Huang ZF, Warshawsky I, Schwartz AL, Broze GJ. *Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for tissue factor pathway inhibitor.* Biochem J, 1997. **327 ( Pt 2)**: p. 577-83.
250. Ornitz DM, Herr AB, Nilsson M, Westman J, Svahn CM, Waksman G. *FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides.* Science, 1995. **268**: p. 432-236.
251. Schlessinger J, Lax I, M Lemmon. *Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?* Cell, 1995. **83**: p. 357-360.
252. David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman J, Van Den Berhe H. *Molecular cloning of a phsphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts.* J Cell Biol, 1990. **111**: p. 3165-3176.
253. David G, Bernfield M. *The emerging roles of cell surface heparan sulfate proteoglycans.* Matrix Biol, 1998. **17**: p. 461-463.
254. Watanabe K, Yamada H, Yamaguchi Y. *K-glypican: a novel GPI-linked heparan sulfate proteoglycan that is highly experssed in developing brain and kidney.* J Cell Biol, 1995. **130**: p. 1207-1218.
255. Veugelers M, Vermeesch J, Reekmans G, Steinfeld R, Marynen P, David G. *Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family.* Genomics, 1997. **40**: p. 24-30.
256. Niu S , Antin PB, Akimoto K, Morkin E. *Expression of avian glypican is developmentally regulated.* Dev Dyn, 1996. **207**: p. 25-34.
257. Mertens G, Cassiman JJ, Van Den Berghe H, Vermynen J, David G. *Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 20435-20443.
258. Carey DJ, Crumbling DM, Stahl RC, Evans DM. *Association of cell surface heparan sulfate proteoglycans of Schwann cells with extracellular proteins.* J Biol Chem, 1990. **265**: p. 20627-20633.
259. Stipp CS, Litwac ED, Lander AD. *Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differetiation.* J Cell Biol, 1994. **124**: p. 149-160.

260. Filmus J, Church J, Buick RN. *Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine*. Mol Cell Biol, 1988. **8**: p. 4243-4249.
261. Li M, Choo B, Wong ZM, Filmus J, Buick RN. *Expression of OCI-5/glypican 3 during intestinal morphogenesis: regulation by cell shape in intestinal epithelial cells*. Exp Cell Res, 1997. **235**: p. 3-12.
262. Huber R, Mazzarella R, Chen CN, Chen E, Ireland M, Lindsay S, Pilia G, Crisponi L. *Glypican 3 and glypican 4 are juxtaposed in Xq26.1*. Gene, 1998. **225**(1-2): p. 9-16.
263. Veugelers M, Vermeesch J, Watanabe K, Yamaguchi Y, Marynen P, David G. *GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on xq26: deletion of the GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome*. Genomics, 1998. **53**(1): p. 1-11.
264. Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. *Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain*. Dev Biol, 1997. **190**: p. 78-93.
265. Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Coomans C, Durr J, Vermeesch J, Marynen P, David G. *Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 26968-26977.
266. Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. *Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain*. Dev Biol, 1997. **190**: p. 78-93.
267. Litwack ED, Stripp CS, Kumbasar A, Lander AD. *Neuronal expression of glypican, a cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan, in the adult rat nervous system*. J Neurosci, 1994. **14**: p. 3713-3724.
268. Litwack ED, Ivins JK, Kumbasar A, Paine-Saunders S, Stipp CS, Lander AD. *Expression of heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent*. Dev Dyn, 1998. **211**(1): p. 72-87.
269. Pellegrini M, Pilia G, Pantano S, Lucchini F, Uda M, Fumi M, Cao A, Schlessinger D, Forabosco A. *Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome*. Dev Dyn, 1998. **213**: p. 431-439.
270. Nakato H, Futch TA, Selleck SB. *The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patternig during postembryonic development of the nervous system in Drosophila*. Development, 1995. **121**: p. 3687-3702.
271. Filmus J, Selleck SB. *Glypicans: proteoglycans with a surprise*. J Clin Invest, 2001. **108**: p. 497-501.
272. Tsuda M, Kamimura K, Nakato H, Archer M, Staatz W, Fox B, Humphrey M, Olson S, Futch T, Kaluza V, Siegfried E, Stam L, Selleck SB. *The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signaling in Drosophila*. Nature, 1999. **400**(6741): p. 276-280.

273. Jackson SM, Nakato H, Sugiura M, Jannuzi A, Oakes R, Kaluza V, Golden C, Selleck S. *Dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen Dpp*. Development, 1997. **124**(20): p. 4113-4120.
274. Baeg GH, Perrimon N. *Functional binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in Drosophila*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**: p. 575-580.
275. Lin X, Perrimon N. *Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signaling*. Nature, 1999. **400**: p. 281-284.
276. Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N. *Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless*. Development, 2001. **126**: p. 87-94.
277. Khare N, Baumgartner S. *Dally-like protein, a new Drosophila glypican with expression overlapping with wingless*. Mech Dev, 2000. **99**(1-2): p. 199-202.
278. Song HH, Shi W, Filmus J. *OCI-5/rat glypican-3 binds to fibroblast growth factor-2 but not to insulin-like growth factor-2*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 7574-7577.
279. Steinfeld R, Van Den Berghe H, David G. *Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell-surface-associated syndecans and glypicans*. J Cell Biol, 1996. **133**: p. 405-416.
280. Grisaru S, Cano-Gauci D, Tee J, Filmus J, Rosenblum ND. *Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis*. Dev Biol, 2001. **231**(1): p. 31-46.
281. Pilia G., Hughes-Benzie R. M., MacKenzie A., Baybayan P., Chen E. Y., Huber R., Neri G., Cao A., Forabosco A., Schlessinger D. *Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 241-7.
282. Veugelers M, Vermeesch J, Watanabe K, Yamaguchi Y, Marynen P, David G. *GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on xq26: deletion of the GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome*. Genomics, 1998. **53**(1): p. 1-11.
283. Song HH, Filmus J. *The role of glypicans in mammalian development*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1573**(3): p. 241-6.
284. Garganta CL, Bodurtha JN. *Report of another family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and a review of the literature*. Am J Med Genet, 1992. **44**: p. 129-135.
285. Neri G, Gurrieri F, Zanni G, Lin A. *Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome*. Am J Med Genet, 1998. **79**(4): p. 279-83.
286. Behmel A, Plochl E, Rosenkranz W. *A new X-linked dysplasia gigantism syndrome: identical with the Simpson dysplasia syndrome?* Hum Genet, 1984. **67**: p. 409-413.

287. Golabi M, Rosen L. *A new X-linked mental radiation overgrowth syndrome.* Am J Med Genet, 1984. **17**: p. 345-358.
288. Hughes-Benzie RM, Pilia G, Xuan JY, Hunter AG, Chen E, Golabi M, Hurst JA, Kobori J, Marymee K, Pagon RA, Punnett HH, Schelley S, Tolmie JL, Wohlferd MM, Grossman T, Schlessinger D, MacKenzie A. *Simpson-Golabi-Behmel Syndrome: genotype/phenotype analysis of 18 affected males from 7 unrelated families.* Am J Med Genet, 1996. **66**(2): p. 227-234.
289. Lindsay S, Ireland M, O'Brien O, Clayton-Smith J, Hurst JA, Mann J, Cole T, Sampson J, Slaney S, Schlessinger D, Burn J, Pilia G. *Large scale deletions in the GPC3 gene may account for a minority of cases of Simpson-Golabi-Behmel syndrome.* J Med Genet, 1997. **34**(6): p. 480-3.
290. Veugelers M, Cat BD, Muyldermans SY, Reekmans G, Delande N, Frints S, Legius E, Fryns JP, Schrandt-Stumpel C, Weidle B, Magdalena N, David G. *Mutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(9): p. 1321-8.
291. Xuan JY, Hughes-Benzie RM, MacKenzie AE. *A small interstitial deletion in the GPC3 gene causes Simpson-Golabi-Behmel syndrome in a Dutch-Canadian family.* J Med Genet, 1999. **36**(1): p. 57-8.
292. Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, Pullano R, Piscione TD, Grisaru S, Soon S, Sedlackova L, Tanswell AK, Mak TW, Yeger H, Lockwood GA, Rosenblum ND, Filmus J. *Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome.* J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 255-64.
293. Dueñas-Gonzalez A, Kaya M, Shi W, Song H, Test JR, Penn LZ, Filmus J. *OCI 5/ GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell-specific manner.* J Cell Biol, 1998. **141**: p. 1407-1414.
294. Weng EY, Mortier GR, Graham JM. *Beckwith-Wiedemann Syndrome.* Clin Pediat, 1995. **34**: p. 317-326.
295. Weksberg R, Squire JA. *Molecular biology of Beckwith-Wiedemann syndrome.* Med Pediatric Oncol, 1997. **27**: p. 462-469.
296. Filmus J, Song H, Shi W, Duenas Gonzalez A, Kaya M, Cano-Gauci D. *Glypican-3 is a novel inhibitor of insulin-like growth factor signaling.* Medicina (B Aires), 1999. **59**(5 Pt 2): p. 546.
297. Selleck SB. *Overgrowth syndromes and the regulation of signaling complexes by proteoglycans.* Am J Hum Genet, 1999. **64**(2): p. 372-7.
298. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D. *Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome.* Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 241-7.

299. Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, Efstratiadis A. *Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes.* Genes Dev, 1997. **11**: p. 3128-3142.
300. Wan ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF. *Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene.* Nature, 1994. **372**: p. 464-467.
301. Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. *Loss of imprinted IGF2/cation-independent-mannose 6 phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality.* Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 2953-2963.
302. Wilkie OAM, Morris-Kay GM, Jones EY, Heath JK. *Functions of fibroblast growth factors and their receptors.* Curr Biol, 1995. **5**: p. 500-507.
303. Chiao E, Fisher P, Crisponi L, Deiana M, Dragatsis I, Schlessinger D, Pilia G, Efstratiadis A. *Overgrowth of a mouse model of the Simpson-Golabi- Behmel syndrome is independent of IGF signaling.* Dev Biol, 2002. **243**(1): p. 185-206.
304. Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J. *The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2116-25.
305. Yenush L, White MF. *The IRS-signalling system during insulin and cytokine action.* Bioessays, 1997. **19**(6): p. 491-500.
306. Filmus J, Shi W, Wong ZM, Wong MJ. *Identification of a new membrane-bound heparan sulfate proteoglycan.* Biochem J, 1995. **311**: p. 561-565.
307. Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC. *Heparan sulfate proteoglycans and cancer.* Br J Cancer, 2001. **85**(8): p. 1094-8.
308. Kleff J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler MW, Lander AD, Korc M. *The cell surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer.* J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1662-1673.
309. Kleff J, Wildi S, Kumbasar A, Friess H, Lander AD, Korc M. *Stable transfection of glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells.* Pancreas, 1999. **19**(3): p. 281-288.
310. Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M. *Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells.* Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5562-9.
311. Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ. *Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines.* Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 807-10.
312. Huber R, Hansen RS, Strazzullo M, Pengue G, Mazzarella R, D'Urso M, Schlessinger D, Pilia G, Gartler SM, D'Esposito M. *DNA methylation in transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, GPC3 and SYBL1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 616-21.
313. Huber R, Hansen RS, Strazzullo M, Pengue G, Mazzarella R, D'Urso M, Schlessinger D, Pilia G, Gartler SM, D'Esposito M. *DNA methylation in*

- transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, GPC3 and SYBL1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 616-21.
314. Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, Lee WC, Ferriola PC, Jhanwar SC, Mossman BT, Filmus J, Testa JR. *Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma.* Oncogene, 2000. **19**(3): p. 410-6.
315. Hsu HC, Cheng W, Lai PL. *Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution.* Cancer Res, 1997. **57**: p. 5179-5184.
316. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmer A, Lander A. D, Korc M, Kleeff J, Buchler MW. *Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders.* Gut, 2001. **48**(4): p. 558-64.
317. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. *Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 89-97.
318. Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. *Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling.* Int J Cancer, 2003. **103**(4): p. 455-65.
319. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. *Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(1): p. 16-25.
320. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. *Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma.* Cancer Sci, 2003. **94**(3): p. 259-62.
321. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. *Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma.* Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2418-23.
322. Moriguchi H, Sato C. *The values and limitations of glypican-3 as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma from clinical and economic viewpoints.* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 679-80.
323. Powell CA, Xu G, Filmus J, Busch S, Brody JS, Rothman PB. *Oligonucleotide microarray analysis of lung adenocarcinoma in smokers and nonsmokers identifies GPC3 as a potential lung tumor suppressor.* Chest, 2002. **121**(3 Suppl): p. 6S-7S.
324. Kim H, Xu GL, Borczuk AC, Busch S, Filmus J, Capurro M, Brody JS, Lange J, D'Armiento JM, Rothman PB, Powell CA. *The heparan sulfate*

- proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **29**(6): p. 694-701.
325. Wichert A, Stege A, Midorikawa Y, Holm PS, Lage H. *Glypican-3 is involved in cellular protection against mitoxantrone in gastric carcinoma cells. Oncogene*, 2004. **23**(4): p. 945-55.
  326. Zhu Z, Friess H, Kleeff J, Wang L, Wirtz M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. *Glypican-3 expression is markedly decreased in human gastric cancer but not in esophageal cancer. Am J Surg*, 2002. **184**(1): p. 78-83.
  327. Saikali Z, Sinnott D. *Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. Int J Cancer*, 2000. **89**(5): p. 418-22.
  328. Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt R. W, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D. *Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. J Pediatr Hematol Oncol*, 2001. **23**(8): p. 496-9.
  329. White GR, Kelsey AM, Varley JM, Birch JM. *Somatic glypican 3 (GPC3) mutations in Wilms' tumour. Br J Cancer*, 2002. **86**(12): p. 1920-2.
  330. Gillan TL, Hughes R, Godbout R, Grundy PE. *The Simpson-Golabi-Behme gene, GPC3, is not involved in sporadic Wilms tumorigenesis. Am J Med Genet*, 2003. **122A**(1): p. 30-6.
  331. Baer C, Nees M, Breit S, Selle B, Kulozik AE, Schaefer KL, Braun Y, Wai D, Poremba C. *Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. Int J Cancer*, 2004. **110**(5): p. 687-94.
  332. Boily G, Saikali Z, Sinnott D. *Methylation analysis of the glypican 3 gene in embryonal tumours. Br J Cancer*, 2004. **90**(8): p. 1606-11.
  333. Xiang YY, Ladeda V, Filmus J. *Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. Oncogene*, 2001. **20**(50): p. 7408-12.
  334. Xiang YY, Ladeda V, Filmus J. *Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. Oncogene*, 2001. **20**(50): p. 7408-12.
  335. Yan PS, Chen CM, Shi H, Rahmatpanah F, Wei SH, Caldwell CW, Huang TH. *Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays. Cancer Res*, 2001. **61**(23): p. 8375-80.
  336. Filmus J. *Glypicans in growth control and cancer. Glycobiology*, 2001. **11**(3): p. 19R-23R.
  337. Costa José and Córdón - Cardo, Carlos. *Cancer diagnosis molecular pathology*, in *Principles of Oncology*, Vincent T. De Vita Jr, Samuel Hellman and Steven A. Rosenberg, Editor. 2001, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 641-657.
  338. H 1<sup>a</sup>. Bence Jones. *Philosophical transaction of the Royal Society of London*. 1848. **138**: p. 55-62.
  339. 1b. Ascheim S. *Early diagnosis of pregnancy, chorionepithelioma and hudatidiform mole by the Aschim -Zondek test. American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1930. **19**: p. 335.



340. Rustin GJS. *Circulating tumor markers in Oxford testbook of Oncology*. 2 ed, ed. Souchami RL Tannock I, Hohenberger P, Horiot J-C. Vol. 1. 2002, New York: Oxford University Press Inc. 303-314.
341. De Risi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. *Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer*. *Nat Genet*, 1996. **14**: p. 457-460.
342. Miller LD, McPhie P, Suzuki H, Kato Y, Liu ET, Cheng SY. *Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance*. *Genome Biol*, 2004. **5**: p. 31.
343. Schulz HL, Rahman FA, Fadl EI, Moula FM, Stojic J, Gehring A, Weber BH. *Identifying differentially expressed genes in the mammalian retina and the retinal pigment epithelium by supression subtractive hybridization*. *Cytogenet Genome Res*, 2004. **106**: p. 74-81.
344. Wulfschuhle JD, Paweletz CP, Steeg PS, Petricoin EF 3rd, Liotta L. *Proteomic approaches to the diagnosis, treatment and monitoring of cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **532**: p. 59-68.
345. Wulfschuhle JD, Liotta L, Petricoin EF 3rd. *Proteomic application for the early detection of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**: p. 267-275.
346. Celis JE, Gromov P. *Proteomics in translational cancer research: toward and integrated approach*. *Cancer Cell*, 2003. **3**: p. 9-15.
347. Fletcher R.H, Fletcher, SW and Wagner EH. *Clinical epidemiology. The essentials*. 2 ed, ed. al Fletcher RH et. Vol. Chapter 3. 1998, Baltimor: Williams and Wilkins,. 42-75.
348. Research Biomarkers ad-hoc Group of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer. *Biological markers: mantaining standards*. *British J Cancer*, 2000. **82**: p. 1627-1628.
349. Molina R, Jo J, Filella X, Zanón G, Farrus B, Muñoz M, Latre ML, Pahisa J, Velasco M, Fernandez P, Estape J, Ballesta AM. *C-erb-2, CEA and CA 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients*. *Anticancer Res*, 1999. **19**(4A): p. 2551-2556.
350. Molina R, Farrus B, Filella X, Jo J, Zanón G, Pahisa J, Latre ML, Muñoz M, Ballesta AM. *Carcinoembryonic antigen in tissue and serum from breast cancer patients relationships with steroid receptors and clinical applications in the prognosis and early diagnosis of relapse*. *Anticancer Res*, 1999. **19**: p. 2557-2562.
351. Ebeling FC, Schmitt UM, Untch M, Nagel D, Fateh-Moghadam A, Stieber P, et al. *Tumor markers CEA and CA 15.3 as prognostic factors on breast cancer- Univariate and multivariate analysis*. *Anticancer Res*, 1999. **19**: p. 2545-2550.
352. Sütterlin M, Bussen S, Trott S, Caffier H. *Predictive value of CEA and CA 15.3 in the follow-up of invasive breast cancer*. *Anticancer Res*, 1999. **19**: p. 2567-2570.

353. Lumacchi F, Brandes AA, Boccagni P, Polistina F, Favia G, D'Amico DF. *Long-term follow-up atudy in breast cancer patients using serum tumor markers CEA and CA 15.3*. *Anticancer Res*, 1999. **19**: p. 4485-4490.
354. Urtreger A, Ladeda V, Puricelli L, Rivelli A, Vidal MC, Lustig E, Bal de Kier Joffe E. *Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines*. *Int J Oncol*, 1997. **11**: p. 489-496.
355. Mizushima S, Nagata S. *pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**: p. 5322.
356. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochem*, 1976. **72**: p. 248-254.
357. Laemmli U. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**: p. 680-685.
358. Heffelfinger SC, Haukins H, Barrish J, Taylor L, Darlington G. *SK HEP-1: a human cell Line of endothelial origin*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992. **28A**: p. 136-142.
359. Pereyra-Alfonso S, Haedo A, Bal de Kier Joffé E. *Correlation between urokinase-type plasminogen activator production and the metastasizing ability of two murine mammary adenocarcinomas*. *Int J Cancer*, 1988. **42**: p. 59-63.
360. Pittman R. *Release of plasminogen activator and calcium dependent metalloprotease from cultured sympathic and sensor neurons*. *Dev Biol*, 1985. **110**: p. 91-101.
361. Alonso DF, Farías EF, Bal de Kier Joffé E. *Impairment of fibrinolysis during the growth of two murine mammary adenocarcinomas*. *Cancer Letters*, 1993. **70**: p. 181-187.
362. Lesley J, Hyman R, English N, Catterall JB, Turner GA. *CD44 in inflammation and metastasis*. *Glycoconj J*, 1997. **14**(5): p. 611-22.
363. Christofori G, Semb H. *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(2): p. 73-6.
364. Werb Z. *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 439-42.
365. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. *Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(1): p. 89-97.
366. Bishop JM, Weinberg RA. *Molecular Oncology*. 1996, New York: Scientific American, Inc.
367. Sporn MB. *The war on cancer*. *Lancet*, 1996. **347**(9012): p. 1377-81.
368. Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. *Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(21): p. 1717-30.

369. Steeg PS. *Metastasis suppressors alter signal transduction of cancer cells.* Nature Rev, 2003. **3**: p. 55-63.
370. Aguirre Ghiso JA, Farias EF, Alonso DF, Arregui C, Bal de Kier Joffe E. *A phospholipase D and protein kinase C inhibitor blocks the spreading of murine mammary adenocarcinoma cells altering f-actin and beta1-integrin point contact distribution.* Int J Cancer, 1997. **71**(5): p. 881-90.
371. Tawil N, Wilson P, Carbonetto S. *Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts.* J Cell Biol, 1993. **120**(1): p. 261-71.
372. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.* Pharmacol Rev, 1998. **50**(2): p. 197-263.
373. Leung-Tack J, Capo C, De Lapeyriere O, Benoliel AM, Arnaud D, P Bongrand. *Relationship between cellular adhesiveness and metastatic activity in polyomavirus-transformed R3T3 rat cell lines.* Int J Cancer, 1988. **42**(6): p. 946-951.
374. Shen Y, Vogel I, H Kalthoff. *Comparative study of metastasis-associated characteristics of tumor cells with different metastatic capacities.* Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2000. **22**(3): p. 201-204.
375. Varner JA, Cheresh DA. *Integrins and cancer.* Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(5): p. 724-30.
376. Dzamba B, Bolton M, Desimone D. *The Integrin family of Cell Adhesion Molecules*, in *Frontiers in Molecular Biology, Cell Adhesion*, Beckerle M, Editor. 2001, oxford university Press. p. 100-154.
377. Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S, Ponta H. *CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **910**: p. 106-18; discussion 118-20.
378. Wesley UV, Tiwari S, Houghton AN. *Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells.* Int J Cancer, 2004. **109**(6): p. 855-66.
379. Sato S, Miyauchi M, Kato M, Kitajima S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, Takata T. *Upregulated CD44v9 expression inhibits the invasion of oral squamous cell carcinoma cells.* Pathobiology, 2004. **71**(4): p. 171-5.
380. Navaglia F, Fogar P, Greco E, Basso D, Stefani AL, Mazza S, Zambon CF, Habeler W, Altavilla G, Amadori A, A Cecchetto, Plebani M. *CD44v10: an antimetastatic membrane glycoprotein for pancreatic cancer.* Int J Biol Markers, 2003. **18**(2): p. 130-8.
381. Coussens LM, Werb Z. *Matrix metalloproteinases and the development of cancer.* Chem Biol, 1996. **3**(11): p. 895-904.

382. Stetler-Stevenson WG. *Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1237-41.
383. Azzam H, Arand G, Lippman M, Thompson E. *Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**: p. 1758-1764.
384. Deryugina E, Luo G, Reisfeld R, Burdon M, Strongin A. *Tumor cell invasion through Matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2*. Anticancer Res, 1997. **17**: p. 3201-3210.
385. Egedblad M, Werb Z. *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nature Rev Cancer, 2002. **2**: p. 161-174.
386. Park B-K, Zeng X, Glazer R. *Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells*. Cancer Res, 2001. **61**: p. 7647-7653.
387. Kulig G, Weber M. *Akt-dependent and -independent survival signaling pathway utilized by Insulin-like growth factor I*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 6711-6718.
388. Bonnef-Barkay D, Shlissel M, Berman B, Shaoul E, Admont A, Vlodaysky I, Carey D, Asundi V, Reich-Slotky R, D Ron. *Identification of glypican as dual modulator of the biological activity of fibroblast growth factors*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 12415-12421.
389. Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ. *Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 807-10.
390. Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, Lee WC, Ferriola PC, Jhanwar SC, Mossman BT, Filmus J, Testa JR. *Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma*. Oncogene, 2000. **19**(3): p. 410-6.
391. Powell CA, Xu G, Filmus J, Busch S, Brody JS, Rothman PB. *Oligonucleotide microarray analysis of lung adenocarcinoma in smokers and nonsmokers identifies GPC3 as a potential lung tumor suppressor*. Chest, 2002. **121**(3 Suppl): p. 6S-7S.
392. Weinberg RA. *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
393. Imoto M, Doki Y, Jiang W, Han EK, Weinstein IB. *Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 173-80.
394. Sgambato A, Han EK, Zhou P, Schieren I, Weinstein IB. *Overexpression of cyclin E in the HC11 mouse mammary epithelial cell line is associated with growth inhibition and increased expression of p27(Kip1)*. Cancer Res, 1996. **56**(6): p. 1389-99.
395. Han EK, Sgambato A, Jiang W, Zhang YJ, Santella RM, Doki Y, Cacace AM, Schieren I, Weinstein IB. *Stable overexpression of cyclin D1 in a*

- human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth.* *Oncogene*, 1995. **10**(5): p. 953-61.
396. Han EK, Begemann M, Sgambato A, Soh JW, Doki Y, Xing WQ, Liu W, Weinstein IB. *Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis.* *Cell Growth Differ*, 1996. **7**(6): p. 699-710.
397. Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. *Increased expression of the P27KIP1 protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin D1.* *Carcinogenesis*, 1997. **18**(6): p. 1139-48.
398. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. *Cell death: the significance of apoptosis.* *Int Rev Cytol*, 1980. **68**: p. 251-306.
399. Green DR, Reed JC. *Mitochondria and apoptosis.* *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
400. Thornberry NA, Lazebnik Y. *Caspases: enemies within.* *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
401. Fidler IJ. *Critical determinants of metastasis.* *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(2): p. 89-96.
402. Costa J, Cordón - Cardo C. *Cancer diagnosis molecular pathology, in Principles of Oncology*, De Vita V, Hellman S, and Rosenberg S, Editors. 2001, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 641-657.
403. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. *Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma.* *Cancer Sci*, 2003. **94**(3): p. 259-62.
404. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. *Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma.* *Cancer Res*, 2004. **64**(7): p. 2418-23.
405. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. *Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **306**(1): p. 16-25.
406. Capurro M, Filmus J. *Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma.* *Cancer Res*, 2005. **65**(1): p. 372; author reply 372-3.
407. Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. *Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling.* *Int J Cancer*, 2003. **103**(4): p. 455-65.
408. Nakatsura T, Nishimura Y. *Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma.* *BioDrugs*, 2005. **19**(2): p. 71-7.

409. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y. *Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(19): p. 6612-21.
410. Heimann R, Ferguson D, Hellman S. *The relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer*. Cancer Res, 1998. **58**: p. 2766–2771.
411. Schindl M, Birner P, Breitnecker G, Oberhuber G. *Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer*. Gyn Oncol, 2001. **83**: p. 244–248.
412. Hunter T. *Oncogenes and cell proliferation*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**: p. 1-4.
413. Parwaresch R, Rudolph P. *The cell cycle-theory and applications to cancer*. Onkologie, 1996. **19**: p. 464-472.
414. Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. *Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in non-malignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses*. Am J Pathol, 1997. **150**: p. 15-23.
415. Sherr JS. *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**: p. 1672-1677.
416. Lukas J, Bartkova J, Bartek J. *Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint*. Mol Cell Biol, 1996. **16**: p. 6917-6925.
417. Russell A, Thompson MA, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. *Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer*. Oncogene, 1999. **18**: p. 1983-1991.
418. Geradts J, Ingram C. *Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinomas of the breast*. Mod Pathol, 2000. **13**: p. 945-953.
419. Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, R Klomp maker, Peterse J. *A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer*. Br J Cancer, 1996. **73**: p. 728-734.
420. Spyrtos F, Andrieu C, Vidaud D, Briffod M, Vidaud M, Lidereau R, Bieche I. *CCND1 mRNA overexpression is highly related to estrogen receptor positivity but not to proliferative markers in primary breast cancer*. Int J Biol Markers, 2000. **15**: p. 210-214.
421. Utsumi T, Yoshimura N, Maruta M, Takeuchi S, Ando J, Mizoguchi Y, Harada N. *Correlation of cyclin D1 mRNA levels with clinicopathological parameters and clinical outcome in human breast carcinomas*. Int J Cancer, 2000. **89**: p. 39-43.
422. Gao CY, Zelenka PS. *Cyclins, cyclins dependent kinases and differentiation*. Bioassays, 1997. **19**: p. 307-315.

423. Zwijsen RM, Bucle RS, Hijmans EM, Loomans CJ, Bernardis R. *Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1*. *Genes Dev*, 1998. **12**: p. 3488-3498.
424. Wong S, Chan J, Lee K, Hsiao W. *Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast*. *J Pathol*, 2001. **194**: p. 35-42.
425. Lodén M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Landberg G. *Cyclin E dependent kinase activity in human breast cancer in relation to cyclin E, p27 and p21 expression and retinoblastoma protein phosphorylation*. *Oncogene*, 1999. **18**: p. 2557-2566.
426. Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1*. *Genes Dev*, 1997. **11**: p. 1464-1478.
427. Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Wong KA, Sangfelt O, Reed SI. *Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line*. *Nature*, 2001. **413**: p. 316-322.
428. Lodén M, Stighall M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Ostlund H, Landberg G. *The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node*. *Oncogene*, 2002. **21**: p. 4680-4690.
429. Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R. *Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications*. *Hum Pathol*, 2001. **32**: p. 89-94.
430. Barbareschi M, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Dalla Palma P, Harris AL, Caffo O. *p21WAF1 and p53 immunohistochemical expression in breast carcinoma may predict therapeutic response to adjuvant treatment*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**: p. 2182-2123.
431. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. *Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocytic differentiation*. *EMBO J*, 1999. **18**: p. 1223-1234.
432. Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, Norbury CJ. *Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21 WAF1/CIP1 in breast cancer: association with prognosis*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**: p. 2405-2415.
433. Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. *The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer*. *Annu Rev Med*, 1999. **50**: p. 401-423.
434. Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI. *Nuclear accumulation of p21 cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**: p. 546-557.
435. Rudolph P, Kühling H, Alm P, Ferno M, Baldetorp B, Olsson H, Parwaresch R. *Differential prognostic impact of the cyclins E and B in premenopausal and postmenopausal woman with lymphnode-negative breast cancer*. *Int J Cancer*, 2003. **105**: p. 674-680.

436. Megha T, Lazzi S, Ferrari F, Vatti R, Howard CM, Cevenini G, Leoncini L, Luzi P, Giordano A, Tosi P. *Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and p34 cdc2 in breast cancer: a correlation with cellular kinetics*. *Anticancer Res*, 1999. **19**: p. 163-169.
437. Bowe DB, Kenny NJ, Adareth Y, Maroulakou IG. *Suppression of Neu-induced mammary tumor growth in cyclin D1 deficient mice is compensated for by cyclin E*. *Oncogene*, 2001. **21**: p. 291-298.
438. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Loning T. *Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype*. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. **67**(1): p. 61-70.
439. Musgrove EA, Lee CSL, Cornish AL, Swarbrick A, Sutherland RL. *Antiprogestin inhibition of cell cycle progression in T47-D breast cancer cells is accompanied by induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21*. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**: p. 54-66.
440. Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G, T Löning. *p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors*. *Int J Cancer*, 1998. **79**: p. 61-65.
441. Milde-Langosch K, Riethdorf L, Bamberger A-M, T Löning. *P16/MTS1 and pRb expression in endometrial carcinomas*. *Virchows Arch*, 1999. **434**: p. 23-28.
442. Emig R, Magener A, Ehemann V, Meyer A, Stilgenbauer F, Volkmann M, Wallwiener D, H-P Sinn. *Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation*. *Br J Cancer*, 1998. **78**: p. 1661-1668.