

Alteración en los niveles de N-CAM soluble en pacientes con tumores cerebrales

Todaro L.¹, Puricelli L.¹, Pallotta M.G.², Lastiri J.², Ciralo C.², Lincuez M.E.², Bal de Kier Joffé E.¹, Sacerdote de Lustig E.¹, Varela M.S.²

¹Área de Investigación, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo".

²Servicio de Oncología Clínica, Hospital Italiano de Bs. As.

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

Hasta la fecha las moléculas de adhesión se han agrupado en 4 clases principales: la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cadherinas, las integrinas y las selectinas (Roche P. et al, 1997). Las moléculas N-CAM pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas (Hampel et al, 1997), promueven la adhesión neurona-neurona a través de interacciones homofílicas y se asocian con la estabilización de las uniones sinápticas y con la fijación del aprendizaje. Estas moléculas se encuentran ancladas a la membrana celular y presentan una porción citoplasmática posiblemente asociada a la transducción de señales a través de una vía tirosina-quinasa.

Existen 2 formas principales de N-CAM: una forma polisialilada, PSA-N-CAM, de origen embrionario y la N-CAM aislada de tejidos adultos. Las cadenas de PSA desfavorecen las interacciones homofílicas de la proteína, facilitando la migración de las células embrionarias.

En el adulto la N-CAM se encuentra predominantemente en neuronas y en células gliales (Nybroe O., et al, 1989). También se expresa en músculo (Moore S. y Walsh F., 1985), médula adrenal (Langley O. y Aunis D., 1984), pituitaria anterior (Langley O. et al, 1987) e islotes pancreáticos (Langley O. et al, 1989). Por otro lado, en algunos tumores como feocromocitoma (Margolis R.K. y Margolis R.U., 1983), neuroblastoma (Livingstone B. et al, 1988; Moolenaar C. et al, 1990), tumor de Wilms (Roth J. et al, 1988) y cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) (Moolenaar C. et al, 1990; Aletsee-Ufrecht M. et al, 1990) se observaron altos niveles de expresión de N-CAM.

En el sistema nervioso central la N-CAM presenta 3 isoformas de 180, 140 y 120 kDa, todas generadas a partir de procesos de splicing alternativo y modificaciones post-traduccionales que afectan la expresión de un único gen (Goridis y Brunet, 1992). La existencia de estas 3 isoformas en el adulto no ha podido ser interpretada hasta la fecha.

Existen fuertes evidencias que la N-CAM no sólo se encuentra asociada a membrana, sino que también puede presentarse en forma soluble. Estas formas ya han sido descritas en medios condicionados provenientes de células nerviosas o musculares y en diferentes fluidos corporales

(Rutishauer U. et al, 1976; Ibsen S et al, 1983; Bock E. et al, 1987; Cole G. et al, 1986; Goer H. et al, 1988). En el suero humano pueden encontrarse dos especies moleculares de N-CAM, una cuyo peso molecular oscila entre 100-130 kDa y otra que oscila entre 140-180 kDa, que correspondería a la forma embrionaria de la N-CAM. En el suero de pacientes con cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) se han encontrado altas concentraciones de esta molécula, comparada con la concentración en sueros normales (Jaques G. et al, 1993). Los resultados obtenidos por otro grupo de investigadores (Takamatsu et al., 1994), indican que la N-CAM soluble de 140-180 kDa puede ser considerada como un marcador para diferenciar SCLC de otros tumores pulmonares. También la N-CAM sérica se encuentra elevada en mielomas pudiendo ser útil como marcador de la enfermedad (Ong F. et al, 1996). No hay trabajos que estudien si la N-CAM soluble está alterada en pacientes portadores de tumores cerebrales.

En el presente trabajo nos propusimos estudiar la expresión y comportamiento de N-CAM soluble en la población normal y en pacientes con tumores cerebrales primarios o de tipo metastásico.

Materiales y métodos

Pacientes y controles:

Para analizar los niveles de N-CAM en la población control se extrajo suero a 33 donantes cuyas características se especifican en la tabla 1.

Además se analizó el comportamiento de N-CAM sérico en 66 pacientes con tumores cerebrales. Se estudiaron 3 grupos de patología cerebral (tabla 1): gliomas de distinto grado de malignidad; metástasis cerebrales únicas (cáncer de pulmón 60%, cérvix 9%, melanoma 9% y otros 22%); tumores benignos (ependimomas, meningiomas, adenoma de hipófisis).

Todos los pacientes estudiados provienen del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Tabla 1: Características de las poblaciones estudiadas

Grupos de pacientes (n)	Mujeres/Varones	Mediana de la edad (rango)
Controles (33)	17/16	48.0 (21-84)
Gliomas (26)	11 / 15	57.0 (24-77)
Metástasis cerebrales (22)	10/12	55.5 (33-79)
Tumores benignos (18)	9/9	50.0 (27-72)

Muestras:

Se recolectaron muestras de sangre tanto de la población control como de los pacientes previo a cualquier tratamiento. Este material fue centrifugado para la obtención del suero, el cual fue alícuotado y guardado a -20°C hasta su posterior análisis.

Electroforesis (SDS PAGE) y Western Blot:

Los niveles de N-CAM se midieron por Western Blot en 2 situaciones diferentes: a) condiciones no reductoras, usando un anticuerpo monoclonal (CD56, Chemicon), que revela bandas específicas de distinto peso molecular (PM) (100-180 kDa) y b) bajo condiciones de reducción (tratamiento con β -mercaptoetanol) incubando con un anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology) que reconoce una única banda de 80 kDa.

El suero fue diluido 1:30 en buffer fosfato y sometido a condiciones reductoras y no reductoras como se indicó previamente. Luego las muestras fueron calentadas a 100°C durante 1 minuto y sembradas en un gel de poliacrilamida-SDS al 7,5%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nylon e incubadas con los anticuerpos anti-N-CAM (situación a y b). En todas las corridas fue sembrado un estándar interno. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia) y las bandas específicas cuantificadas por densitometría (Molecular Analysis). El valor de cada muestra fue normalizado en función del valor obtenido para el estándar interno (valor 1). Los niveles de N-CAM se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA). El error intra e inter experimento fue alrededor del 15%.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos de cada individuo fueron codificados en una base de datos y analizados con el programa SPSS versión 10.0).

Resultados

Detección de N-CAM sérica:

De acuerdo a lo detallado en materiales y métodos, la N-CAM sérica se estudió bajo dos condiciones diferentes. Cuando la corrida electroforética se realizó en condiciones no reductoras se reveló con un anticuerpo monoclonal se obtuvo un patrón de bandas que oscila entre 100 y 180 kDa (figura 1). Las bandas se analizaron en dos grupos: las de alto (>130 kDa) y las de bajo (<130 kDa). Por otro lado, cuando el SDS-PAGE se realizó bajo condiciones reductoras y se reveló con un anticuerpo policlonal se obtuvo una única banda de 80 kDa (figura 2).

Figura 1: Western Blot revelado con un anticuerpo monoclonal. Se observaron distintas bandas de N-CAM entre 100-180 kDa.

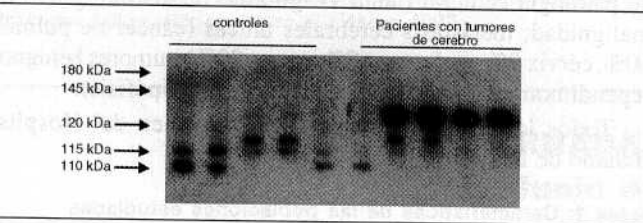
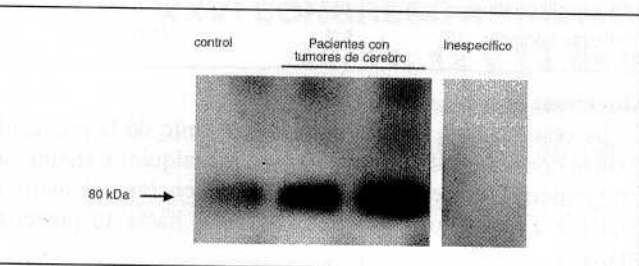


Figura 2: Western Blot revelado con un anticuerpo policlonal. Se observa en los pacientes con patología cerebral un aumento en los niveles de N-CAM 80 kDa.



Niveles de N-CAM soluble en la población control:

Se observaron diferencias en los niveles de N-CAM sérica de acuerdo al sexo y la edad del individuo. En las figuras 3 y 4 se indican los valores densitométricos de las isoformas > y < 130 kDa. Los niveles de las isoformas <130 kDa no varían con el sexo, pero disminuyen significativamente con la edad (Regresión lineal, $p < 0.05$). Se observó que los individuos mayores de 60 años muestran niveles de N-CAM <130 kDa entre 5 y 6 veces menores a los observados en los individuos menores de 40 años.

Figura 3: Valores de N-CAM <130 kDa en la población control de acuerdo al sexo y edad. Los valores se expresan en Unidades Arbitrarias (UA).

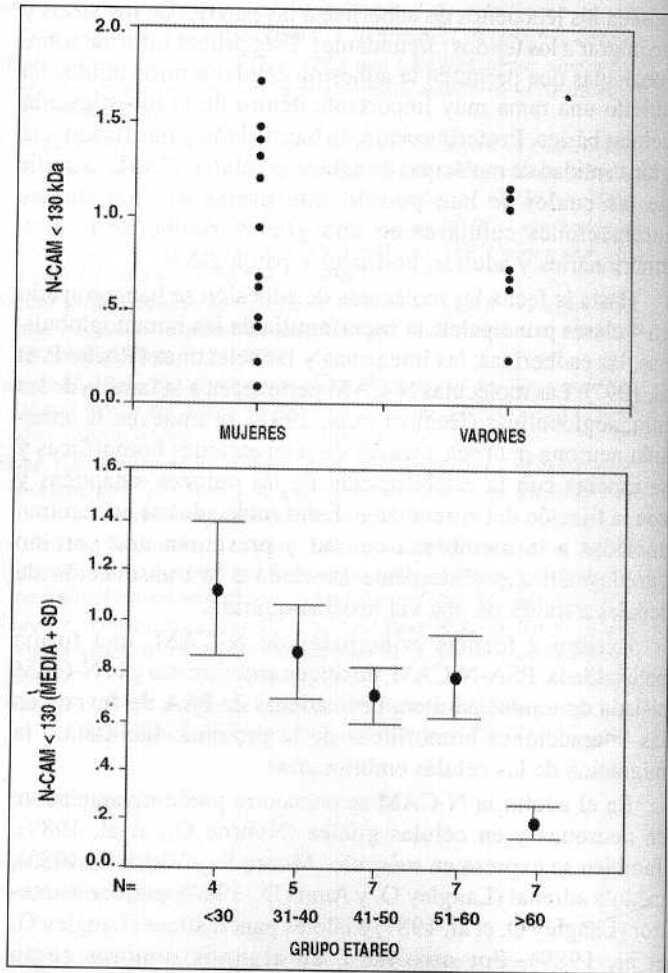
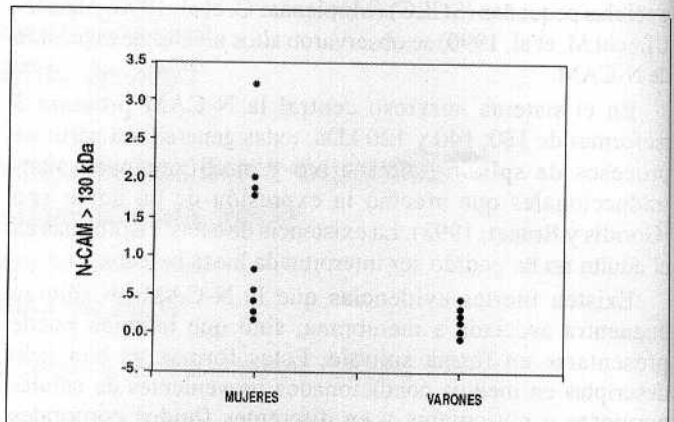
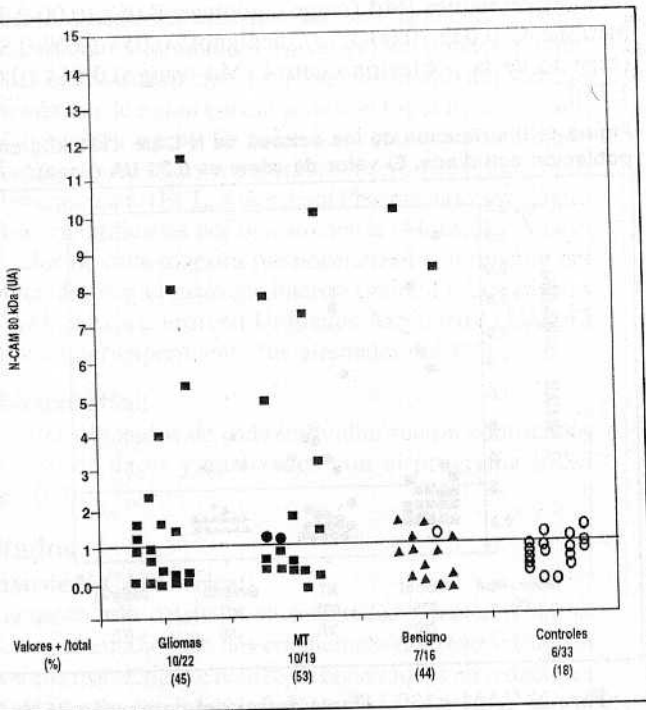


Figura 4: Valores de N-CAM para las isoformas >130 kDa según sexo y edad. Los valores se expresan en Unidades Arbitrarias (UA).



En la figura 8 se grafican los niveles de N-CAM 80 kDa. Se observa que todos los grupos con patología cerebral presentan mayor número de pacientes con valores positivos respecto al control. Sin embargo, cuando se realizó un estudio estadístico incorporando las covariables edad y sexo, sólo el tipo de gliomas es significativamente diferente del control ($p < 0.01$, regresión logística).

Figura 8: Distribución de los valores de N-CAM 80 kDa en la población estudiada. El valor de corte es 1.31 UA (línea).



Respecto del grupo de pacientes con metástasis cerebrales, no se encontraron diferencias entre los distintos tipos tumorales. Tampoco se observaron diferencias entre los tumores benignos de diferente origen histológico.

Discusión

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

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

La N-CAM es una molécula de adhesión que se expresa en el sistema nervioso asociada a neuronas y células gliales. Esta molécula participa en las uniones intercelulares y se espera que en procesos neuroproliferativos, sobre todo en tumores invasivos, esté desregulada.

La N-CAM puede hallarse en forma circulante aunque no se conoce cuáles isoformas están presentes en el suero. No hay bibliografía sobre los niveles de esta molécula en la población normal. Por lo tanto, en primera instancia se estudiaron los niveles de N-CAM en controles voluntarios. Se emplearon dos métodos diferentes para detectar la molécula. Con un anticuerpo monoclonal y condiciones de corrida no reductoras se encontraron distintas isoformas de alto y bajo peso molecular. Las isoformas de alto peso molecular, debido probablemente a un alto número de cadenas polisialiladas, disminuyen progresivamente con la edad, mientras que las de bajo peso molecular se encuentran disminuidas en los varones. Cuando se emplearon condiciones reductoras y un anticuerpo policlonal, se encontró una banda de 80 kDa que no se altera con la edad o el sexo del individuo. Luego estudiamos la expresión de N-CAM soluble en procesos patológicos cerebrales. Encontramos que la N-CAM < 130 kDa se encuentra disminuida en todas las patologías cerebrales, independientemente del tipo histológico y grado de invasión. Por otro lado, se detectó un aumento de la isoforma N-CAM de 80 kDa sólo en pacientes con gliomas.

En este trabajo se describe por primera vez la detección de N-CAM sérica en población control de distinta edad y sexo. Las alteraciones cuantitativas en las isoformas de N-CAM circulante halladas en pacientes con tumores cerebrales abre la posibilidad de estudiar esta molécula como marcador diagnóstico y predictivo de esta patología. Por otro lado, la molécula de adhesión N-CAM podría ser estudiada como blanco terapéutico. En ese sentido estudios preliminares de nuestro laboratorio, empleando un modelo murino de adenocarcinoma pulmonar capaz de expresar N-CAM, indican que el bloqueo de la misma con anticuerpos específicos disminuye el número y tamaño de las metástasis. En la actualidad, se está estudiando el rol de la N-CAM circulante en patologías neurodegenerativas. Los resultados obtenidos se compararán con los observados en enfermedad neuroproliferativa a fin de establecer la especificidad de esta molécula.

Bibliografía

- Aletsee-Ufrect M., Langley K., Rotsch M., Havemann K., Gratzl M. NCAM: a surface marker for human small cell lung cancer cell lines. *FEBS Lett* 1990; 267: 295-300.
- Bock E., Edvardsen J.C., Gibson A., Linneman D., Lyles J.M., Nybroe O. Characterization of soluble forms of N-CAM. *FEBS Lett* 1987; 225:33-6.
- Cole G., Loewy A., Cross N.V., Akeson R., Glaser L. Topographic localization of the heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Cell Biol* 1986; 103:1739-44.
- Goridis C., Brunet J.F. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Semin Cell Biol* 1992; 3:189-197.
- Gower H., Barton C.H., Elsom V.L., Thompson J., Moore S., Dickson G., Walsh F.S. Alternative splicing generates a secreted form of NCAM in muscle and brain. *Cell* 1988; 55:955-64.
- Hampel H., Korschenhausen D.A., Schwarz M.J., Frenzel K.H. et al. Neuroimmunomodulation 1997; 4:57-61.
- Ibsen S., Berezin V., Norgard-Petersen, Bock E. Quantification of the D2 glycoprotein in amniotic fluid and serum from pregnancies with foetal neural tube defects. *J Neurochem* 1983; 41:363-6.
- Jaques G., Auerbach B., Pristich M., Wolf M., Madry N., Havemann K. Evaluation of serum adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer* 1993; 72:418-25.
- Langley O., Aletsee M.C., Grant N.J., Gratzl M. Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:781-91.
- Langley O., Aletsee M.C., Gratzl M. Endocrine cells share expression of NCAM with neurones. *FEBS Lett* 1987; 220:108-12.

- Langley O., Aunis D. Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2 protein in adrenal medulla. *Cell Tissue Res* 1984; 238:497-502.
- Livingstone B., Jacobs J., Glick M., Troy F. Extended polysialic acid chain (n>55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1988; 263:9443-8.
- Margolis R.K., Margolis R.U. Distribution and characteristics of polysialosyl oligosaccharides in nervous tissue glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116:889-94.
- Moolenaar C., Muller E.J., Schol D.J., Figdor C.G., Bock E., Bitter Suermann D. et al. Expression of neural cell adhesion molecule related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. *Cancer Res* 1990; 50:1102-6.
- Moore S., Walsh F. Specific regulation of NCAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J.* 1985; 4:623-30.
- Nybroe O., Linnemann D., Bock E. Heterogeneity of soluble cell adhesion molecules. *J.Neurochem* 1989; 53:1372-8).
- Ong F., Kaiser U., Seelen P.J., Hermans J., Wijermans P.W., de Kieviet W., Jaques G., Kluin-Nelemans J.C. *Blood* 1996 15;87 (2):712-6.
- Roche P.H., Figarella-Branger D., Daniel L., Bianco N. et al. Expression of cell adhesion molecules in normal nerves, chronic axonal neuropathies and Schwann cell tumors. *J Neurol Sci* 1997, 151:127-133.
- Roth J., Taatjes D.J., Bitter-Suermann D., Finne J. Polysialic acid units are spatially and temporally expressed in developing postnatal rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:1969-73.
- Roth J., Zuber C., Wagner P., Taatjes D.J., Weisgerber C., Heitz P.U. et al. Reexpression of polysialic acid units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:2999-3003.
- Rutishauser U., Thiery J.P., Brackenbury R., Sela B.A., Edelman G. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:577-581.
- Takamatsu K., Aurerbach B., Gerardy-Schahn R., Eckhardt M., Jaques G., Madry N. Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res.* 1994, 54(10):2598-603.

Correspondencia
msvarela@sinectis.com.ar

El Dr. Eduardo Cazap,

Coordinador de Relaciones Internacionales de la A.A.O.C.,

ofrece

asesoramiento sobre BECAS en el exterior.

Comunicarse con

ecazap@iesoncologia.com.ar

IMPORTANTES **eventos**
INTERNACIONALES
EN ONCOLOGÍA

3 - 6/12/2002	New Trends in Cancer Therapy Rovigo, Venice, Italy	www.iccrovigo.it
6-10/12/2002	44 th Annual Meeting American Society of Hematology (ASH), Philadelphia, U.S.A.	meetings@hematology.org
11-14/12/2002	25 th San Antonio Breast Cancer Symposium U.S.A.	ldunning@saci.org