
Modelos experimentales de cáncer: utilidad en el estudio de marcadores de diferenciación celular en la progresión tumoral

A. Cano*, M. Gómez*, P. Navarro*, C. Caulín*, C. Gamallo**
y M. Quintanilla*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas. CSIC. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UAM. Madrid
y **Departamento de Anatomía Patológica. Hospital La Paz. Facultad de Medicina. UAM. Madrid.

Introducción

Los esfuerzos realizados durante la última década han permitido establecer de manera inequívoca la naturaleza multiseccional del desarrollo tumoral. La identificación de lesiones genéticas asociadas al desarrollo tumoral ha llevado a establecer que se requieren alteraciones en varios genes para que se manifieste el fenotipo de las células tumorales malignas. Entre los tumores humanos, el carcinoma de colon representa uno de los pocos sistemas adecuados para el análisis secuencial de los eventos moleculares implicados en la transición desde el fenotipo normal a un fenotipo tumoral benigno y la posterior evolución hacia un fenotipo tumoral maligno e invasivo¹. Los estudios realizados en este sistema han puesto de manifiesto que se requieren alteraciones en al menos 4-5 genes diferentes para el desarrollo del fenotipo invasivo, habiéndose sugerido que la acumulación de alteraciones genéticas, más que el orden preciso en el que éstas ocurren, pueda ser el factor determinante en la progresión tumoral¹. Las alteraciones genéticas identificadas en este y otros sistemas afectan a dos grandes grupos de genes: a) activación de protooncogenes, y b) inactivación de los llamados genes supresores del cáncer o antioncogenes^{2,3}. Uno de los grandes retos actuales de la investigación sobre el cáncer reside en la identificación de genes supresores del cáncer y de la metástasis y su asociación inequívoca con las alteraciones cromosómicas detectadas (pérdida total o parcial o inactivación por mutación).

Una característica fundamental de la transformación neoplásica es el desacoplamiento entre los procesos de proliferación y diferenciación celular, lo que conlleva la alteración de la arquitectura y homeostasis de los tejidos afectados. Sin embargo, se desconoce todavía en gran

medida la relación entre las lesiones genéticas y cromosómicas detectadas en diferentes tipos tumorales y las alteraciones observadas en la diferenciación de los tejidos afectados. Los modelos experimentales de cáncer proporcionan una herramienta muy valiosa para profundizar en la comprensión de los eventos genéticos y celulares subyacentes al desarrollo y progresión tumoral. Entre ellos, la carcinogénesis química de piel de ratón representa uno de los mejores modelos conocidos y de hecho ha contribuido notablemente a las ideas actuales sobre la naturaleza multiseccional del cáncer⁴. En este sistema la formación de tumores ocurre en estadios discretos. El tratamiento inicial de la piel de ratón con un carcinógeno químico, como dimetilbenzantraceno (DMBA) produce una población de células «iniciadas» como consecuencia de alteraciones genéticas irreversibles. Las células iniciadas pueden ser posteriormente estimuladas a proliferar mediante tratamiento de la piel con un promotor tumoral, como el éster de forbol TPA, originando lesiones benignas o papilomas. Un pequeño número de papilomas adquieren la capacidad de progresar hacia carcinomas epidermoides bien diferenciados⁵. Estos tumores pueden sufrir cambios adicionales para progresar hacia carcinomas fusiformes indiferenciados con un fenotipo más invasivo y maligno^{6,7}. La carcinogénesis química de piel de ratón proporciona, por tanto, un valioso material biológico representativo de diferentes estadios de la progresión tumoral. Además, este sistema proporciona una aproximación experimental *in vitro* ya que se pueden obtener líneas celulares derivadas de diferentes tipos de tumores (papilomas, carcinomas epidermoides o carcinomas fusiformes) o por tratamiento de queratinocitos en cultivo con agentes carcinogénicos o transfección con oncogenes.

Los estudios de la última década en este sistema han permitido identificar la existencia de alteraciones genéticas asociadas a diferentes estadios de progresión. Así, se ha puesto de manifiesto que la activación por mutación puntual del protooncogén Harvey-*ras* (*H-ras*) es uno de los eventos responsables de la iniciación⁸. La progresión maligna parece estar asociada con alteraciones en el cromosoma 7, donde se localiza el gen *H-ras*, y el cromosoma 11 que contiene el gen que codifica por la proteína p53⁹⁻¹¹, identificado como un gen supresor en otros sistemas¹². La inactivación por mutación del gen p53 ocurre significativamente en la progresión de papilomas a carcinomas¹¹. Por otra parte, estos estudios sugieren que el incremento en la dosis alélica *H-ras* mutado: *H-ras* normal puede estar implicado en la progresión hacia carcinomas fusiformes⁹.

Nuestro grupo viene utilizando el modelo experimental de la carcinogénesis de piel de ratón con el objetivo de estudiar la implicación de dos tipos de componentes celulares de gran importancia para el mantenimiento de la arquitectura y homeostasis de la epidermis normal: los procesos de adhesión celular y la expresión de queratinas. Los procesos de adhesión intercelular dependientes del calcio mediados por la familia de cadherinas desempeñan un papel clave en la adquisición y mantenimiento de la estructura tisular de los tejidos en la morfogénesis embrionaria¹³. En la epidermis normal, se expresan 2 miembros de esta familia, cadherina P (CD-P) restringida a las células de la capa basal proliferativa, y cadherina E (CD-E) expresada mayoritariamente en las capas suprabasales del estrato espinoso¹⁴. La adhesión de las células epidérmicas basales con la matriz extracelular subyacente, lámina basal, está en gran parte mediada por unos receptores celulares pertenecientes a la familia de las integrinas, constituidos por heterodímeros $\alpha\beta$ ¹⁵. Entre ellos, la integrina $\alpha6\beta4$ puede desempeñar un papel determinante en el anclaje de las células basales, ya que se expresa exclusivamente en la membrana basolateral de estas células, asociada a estructuras estables como son los hemidesmosomas¹⁶. Por otra parte, las queratinas, proteínas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales, constituyen los principales marcadores de diferenciación epidérmica^{17,18}. Así, las células de la capa basal expresan fundamentalmente la pareja de queratinas K5, K14, mientras que las de las capas suprabasales reprimen la expresión de estas queratinas y expresan que-

ratinas específicas de diferenciación, K1, K10.

En este trabajo presentamos un resumen de los datos obtenidos acerca de la expresión de estos componentes celulares en una serie de líneas celulares representativas de diferentes estadios de la carcinogénesis química, así como en tumores inducidos *in vivo* mediante tratamiento de la piel de ratón con DMBA/TPA. La posible utilidad del estudio de estos marcadores en tumores humanos será discutida.

Materiales y métodos

Cultivo de las líneas celulares e inducción de tumores

Las líneas celulares utilizadas en este estudio han sido descritas anteriormente de forma detallada^{19,20}. Las líneas celulares de morfología epitelial se hicieron crecer en medio de cultivo HAM F-12, suplementado con aminoácidos y suero de ternera fetal (FCS) al 10% y las de morfología fibroblastoide en medio de Dulbecco modificado, DMEM, con FCS al 5%. Las células se hicieron crecer a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

La inducción de tumores en ratones de la cepa BalbC se realizó mediante el protocolo de 2 estadios DMBA/TPA, método descrito previamente⁵. La iniciación se llevó a cabo por aplicación de una dosis única de DMBA (100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$). La promoción se realizó al cabo de una semana por tratamiento con TPA (10 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ en acetona) 2 veces por semana durante un total de 30 semanas. Los papilomas aparecieron entre las 8 y 20 semanas de tratamiento con TPA. Aproximadamente un 5% de los papilomas evolucionaron hacia carcinomas, detectándose su aparición entre 10 y 20 semanas tras la finalización de la promoción. Tras el sacrificio de los animales, los tumores se extrajeron y una fracción de los mismos se recogió en formol salino (3,7%) y el resto se congeló inmediatamente en OCT en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Secciones de 5-6 μm se utilizaron posteriormente para histología y tinción inmunohistoquímica, respectivamente.

Anticuerpos

Para la detección de cadherinas se utilizaron los anticuerpos monoclonales (Amc) ECCD-2, específico de CD-E de ratón y PCD-1, específico de CD-P de ratón, amablemente cedidos por el Dr. M. Takeichi (Universidad de Kyoto, Japón). La detección de $\alpha6\beta4$ se realizó median-

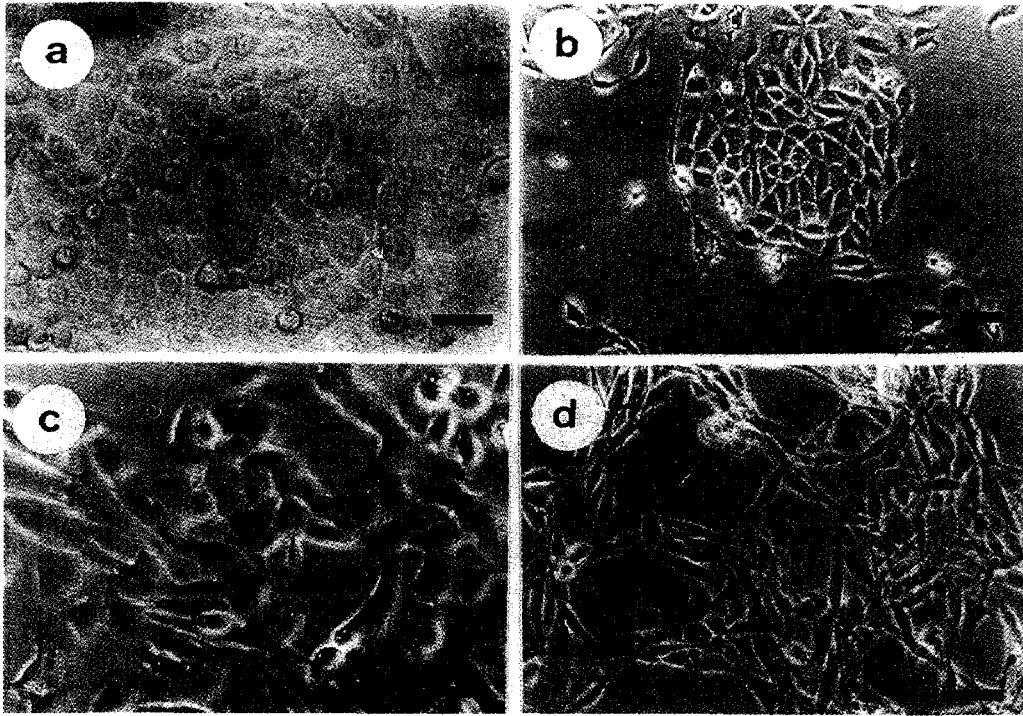


Fig. 1. Morfología de las líneas celulares de queratinocitos de ratón. Se muestran imágenes de contraste de fase de células de distintas líneas de queratinocitos de ratón: (a) MCA3D; (b) PDV; (c) HaCa4, y (d) CarC, crecidas a confluencia (a) o subconfluencia (b a d). Barra, 50 μ m.

te los AcMo, 115-13A y 346-11C, específicos de las subunidades α 6 y β 4 de ratón, respectivamente; ambos anticuerpos fueron cedidos por el Dr. S. Kennel (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, EE.UU.). Para la detección de las queratinas K8 y K13 se utilizaron el Amc TROMA-1 (anti-K8), cedido por el Dr. R. Kemler (Instituto Max-Planck, Freiburg, Alemania) y el anticuerpo policlonal RK13 (anti-RK13), cedido por el Dr. D. Roop (Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, EE.UU.).

Técnicas inmunológicas

Las diferentes técnicas inmunológicas utilizadas en este estudio (inmunofluorescencia, inmunotransferencia y fluorescencia de flujo asociada a membrana celular [FACS], de células en cultivo, así como inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de secciones tumorales) se realizaron como describen Navarro et al¹⁹ y Gómez M et al²⁰, con el uso de los anticuerpos

apropiados. Como anticuerpos secundarios se utilizaron Ig de cabra antirrata o anticonejo conjugados a compuestos fluorescentes. Para la detección inmunohistoquímica se utilizó Ig de cabra antirrata conjugado a biotina y el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Resultados

Características morfológicas y propiedades tumorogénicas de las líneas de queratinocitos de ratón

Parte de las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron derivadas por explantes de tumores inducidos *in vivo* de diferentes estadios: papilomas (PB)²¹, carcinomas epidermoides (HaCa4)²² y carcinomas fusiformes (CarC)⁹. Las líneas MCA3D y PDV se obtuvieron por tratamiento *in vitro* de cultivos primarios de epidermis con DMBA, y posterior selección en presencia de calcio en el caso de MCA3D^{23,24}. La

TABLA I
TUMOROGENICIDAD DE LAS LÍNEAS
CELULARES

Línea	N.º de tumores N.º de sitios de inyección	Latencia*	Tumorolo- gésis relativa
MCA3D	0/6	—	—
PB	0/4	—	—
PDV	5/5	3 semanas	+
PDVC57	4/4	2 semanas	++
HaCa4	6/6	7-9 días	+++
CarC	12/12	7-9 días	+++

Las líneas celulares se inyectaron s.c. en ratones inmunodeprimidos en ambos flancos (1×10^6 cel/seg/inyección). Los animales se sacrificaron cuando al menos uno de los tumores alcanzó un tamaño de 1,5-2,0 cm de diámetro; *la latencia se estimó como el tiempo necesario para desarrollar un tumor de 1 cm de diámetro.

TABLA II
EXPRESIÓN DE CADHERINAS, $\alpha 6\beta 4$ Y K8
EN LAS LÍNEAS CELULARES

Línea	CD-E*	CD-P*	$\alpha 6\beta 4$ **	K8*
MCA3D	+++	++	++	—
PB	ND	ND	++	—
PDV	++	+++	+++	+
PDVC57	+	++	+++	+++
HaCa4	—	+++	+++	+
CarC	—	—	—	+/-

*Los niveles relativos de expresión de CDE, CDP y K8 se estimaron a partir de los datos obtenidos mediante análisis de inmunofluorescencia, inmunotransferencia y Northern blot; **los niveles relativos de expresión de $\alpha 6\beta 4$ se estimaron a partir de los datos obtenidos por inmunofluorescencia y fluorescencia de flujo asociada a la membrana (FACS); ND: no determinado.

línea PDVC57 se derivó a partir de un explante de un tumor inducido por PDV en ratones singénicos²⁵. Durante su tratamiento en cultivo estas líneas celulares presentan una morfología y patrón de crecimiento bien diferenciados. Así, las líneas MCA3D, PB, PDV y PDVC57 exhiben un fenotipo epitelial, con crecimiento en islas o colonias definidas donde las células forman fuertes contactos celulares (figs. 1a y b, para MCA3D y PDV), mientras que las células de la línea HaCa4 muestran un fenotipo más epitelioide, siendo incapaces de crecer en islas con

contactos definidos (fig. 1c). Por su parte, la línea celular CarC exhibe un fenotipo claramente fibroblastoide, de acuerdo con su origen a partir de un carcinoma fusiforme (fig. 1d).

Las propiedades tumorogénicas de las líneas celulares se analizaron mediante inyección subcutánea en ratones inmunodeprimidos (nu/nu). Como se puede observar en la tabla I, las líneas MCA3D y PB no son tumorogénicas, siendo incapaces de inducir tumores hasta 3 meses tras la inyección. Sin embargo, las líneas derivadas de carcinomas HaCa4 y CarC son altamente tumorogénicas, induciendo tumores en todos los sitios de inyección y con tiempos de latencia extremadamente cortos, de 7 a 9 días. Por otra parte, las líneas PDV y PDVC57 mostraron una tumorogenicidad intermedia, induciendo tumores en ratones nu/nu en todos los sitios de inyección pero con tiempos de latencia de aproximadamente 3 y 2 semanas, respectivamente. La baja tumorogenicidad de PDV se puso, así mismo de manifiesto, mediante inyección en ratones singénicos (cepa c57B/L) donde sólo indujo tumores en un 10% de los sitios de inyección, mientras que PDVC57 indujo tumores en todos los sitios de inyección²⁶.

Por otra parte, el estudio de alteraciones en el gen *H-ras* en las diferentes líneas celulares puso de manifiesto la ausencia de alteraciones en las líneas MCA3D y PB, mientras que las líneas PDV y PDVC57 presentan una mutación puntual en el codón 61 con un incremento en la dosis de alelo mutado: alelo normal en el caso de PDVC57²⁹. La línea HaCa4 derivada de un carcinoma inducido por el virus HMSV y TPA presenta altos niveles de expresión del oncogén *H-ras* viral²², mientras que la línea CarC presenta una pérdida total del alelo *H-ras* normal⁹. Por consiguiente, este conjunto de líneas celulares se pueden considerar como representativas de diferentes estadios de la carcinogénesis de piel de ratón, proporcionando un modelo *in vitro* adecuado para el análisis de la expresión de componentes celulares y alteraciones genéticas asociadas a la progresión tumoral.

Expresión de cadherinas, $\alpha 6\beta 4$ y K8 en líneas celulares en cultivo

Los estudios sobre expresión de cadherinas, $\alpha 6\beta 4$ y K8 en las diferentes líneas celulares se resumen en la tabla II. El análisis de la expresión de cadherinas mostró la existencia de una fuerte correlación inversa entre la expresión de CD-E y la tumorogenicidad de las líneas celulares, observándose la ausencia total de esta pro-

teína en las líneas altamente tumorigénicas HaCa4 y CarC. Sin embargo, la expresión de CD-P no indicó la existencia de ninguna correlación aparente con la tumorigenicidad (comparar las concentraciones de PDV y HaCa4 en la tabla II), aunque la expresión de CD-P no se detectó en la línea CarC de morfología fibroblastoide. En contraste con la expresión de CD-E, la expresión de la integrina $\alpha 6\beta 4$ mostró un marcado incremento en relación con la adquisición del fenotipo tumoral, aunque no se observó una correlación directa con el grado de tumorigenicidad, ya que tanto PDV como HaCa4 mostraron niveles similares de expresión de esta molécula. Por otra parte, la expresión de la queratina K8, típica de células de epitelio simple y estadios embrionarios¹⁷, sólo se pudo detectar en las células tumorigénicas, siendo indetectable en células no tumorigénicas como MCA3D y PB.

Estos resultados indicaron que la expresión de receptores de adhesión celular y de marcadores de diferenciación como la queratina K8 se encuentran alterados diferencialmente durante la adquisición del fenotipo tumoral de los queratinocitos de ratón.

Expresión de cadherinas, $\alpha 6\beta 4$ y queratinas en tumores inducidos in vivo

Con el fin de estudiar si las alteraciones observadas en la expresión de los componentes de adhesión y de queratinas en las líneas celulares podían extrapolarse a la situación *in vivo*, se estudió la expresión de las diferentes moléculas en una colección de tumores inducidos en la piel de ratón con DMBA y TPA.

En la figura 2 se observa la tinción por inmunohistoquímica obtenida en papilomas y carcinomas de diferente grado de diferenciación

para CD-E y CD-P. Como se puede comprobar, la expresión de ambas moléculas de adhesión se conserva en las lesiones benignas de papilomas, con un patrón similar al de la epidermis normal: la CD-P aparece restringida a las células de la capa basal proliferativa (fig. 2c), mientras que la CD-E se expresa fundamentalmente en las capas suprabasales (fig. 2b). Se observó un patrón similar de expresión de ambas cadherinas en carcinomas epidermoides bien diferenciados, que exhiben altas concentraciones de CD-E en amplias regiones tumorales con una localización preferente en torno a las regiones de diferenciación y queratinización (tabla III). Sin embargo, la expresión de CD-E se redujo progresivamente en los carcinomas de menor grado de diferenciación. Así, en carcinomas moderadamente diferenciados, la expresión de CD-E se restringió a una o dos capas celulares adyacentes a las zonas de queratinización (fig. 2e), mientras que en carcinomas pobremente diferenciados sólo se observó la expresión de CD-E en torno a las escasas áreas de diferenciación queratínica observada en estos tumores, que estaba totalmente ausente en amplias regiones tumorales más anaplásicas (fig. 2h). La expresión de CD-P se incrementó en carcinomas moderadamente diferenciados donde se detectó de forma más deslocalizada en amplias zonas tumorales (fig. 2f). Sin embargo, en los carcinomas pobremente diferenciados la expresión de CD-P fue más heterogénea, detectándose carcinomas que exhibían una expresión restringida de esta molécula (fig. 2i), mientras que en otros casos, histológicamente similares, la expresión de CD-P se extendió a grandes regiones tumorales (tabla III). Por otra parte, en los tumores indiferenciados, de tipo fusiforme, no se detectó expresión alguna de CD-E ni de CD-P (fig. 2k,l).

TABLA III
EXPRESIÓN DE CADHERINAS, $\alpha 6\beta 4$ Y QUERATINAS EN TUMORES INDUCIDOS *IN VIVO*

	CD-E	CD-P	$\alpha 6\beta 4$	K8	K13
Epidermis	+++	+	+	—	—
Papilomas	+++	+	++	—	+
Carcinoma epidermoide (BD)	+++	+ / ++	+++	+	+++
Carcinoma epidermoide (MD)	+ / ++	++	+++	++	+
Carcinoma epidermoide (PD)	+ / —	+ / +++	+	+++	—
Carcinoma fusiforme	—	—	+ / —	—	—

La expresión de las diferentes moléculas en los tumores se analizó por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de secciones tumorales. Los niveles relativos de expresión se estimaron, en cada caso, en función de la intensidad y extensión de la tinción. BD: bien diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado.

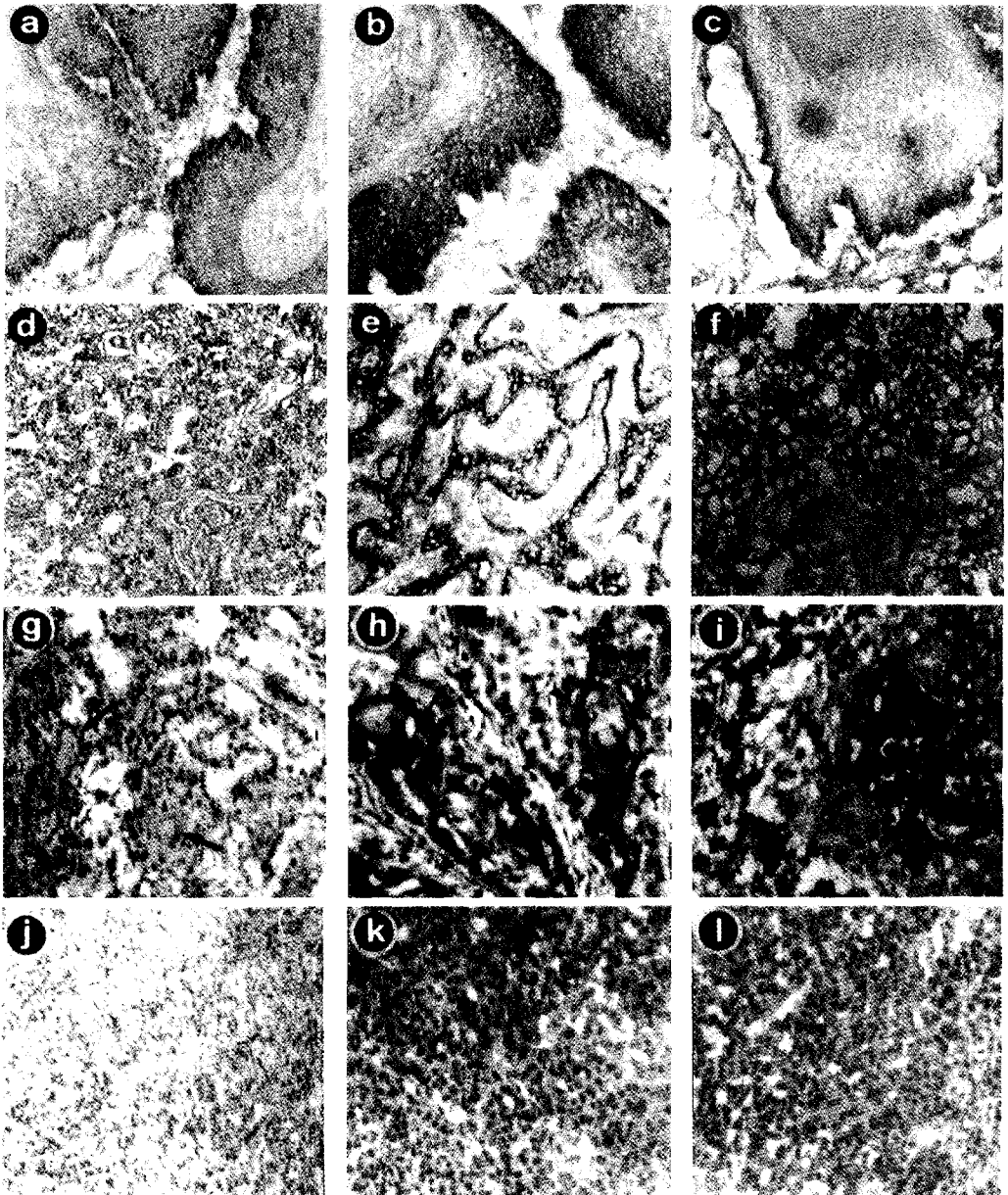


Fig. 2. Histología y tinción inmunohistoquímica de cadherina E y cadherina P en tumores de piel de ratón obtenidos por carcinogénesis química. Cortes histológicos, 5-6 μm de espesor, de diferentes especímenes se tiñeron con hematoxilina-eosina (paneles a, d, g y j), y secciones congeladas con el AcMo ECCD-2 (anti-CD-E) (b, e, h y k) y con el AcMo PCD-1 (anti-CD-P) (c, f, i y l). Las imágenes corresponden a: un papiloma (a-c); un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado (d-f); un carcinoma epidermoide pobremente diferenciado (g-i), y un carcinoma fusiforme indiferenciado (j-i). Las zonas de queratinización en el panel g se indican con flechas y la expresión de CD-E y CD-P en los paneles h e i con puntas de flecha. Barra, 150 μm . El aumento en los paneles a-d corresponde al mostrado en los paneles g y j, el aumento de los paneles e y f corresponde al indicado en los paneles h-i y k-l.

En el patrón de expresión de $\alpha 6\beta 4$ en las diferentes lesiones tumorales se observó un incremento notable de esta molécula respecto a la epidermis normal. En las lesiones benignas de papilomas esta integrina se expresa intensamente en las células basales delimitando la región de interacción con la membrana basal adyacente. Además, se observó una clara despolarización de esta integrina en los papilomas, detectándose, así mismo, su expresión en la membrana apical de las células basales y su extensión hacia las capas suprabasales, aunque con menor intensidad (fig. 3a). En los carcinomas epidermoides la expresión de esta integrina se extendió a amplias regiones tumorales con una intensidad homogénea en todas las capas celulares, perdiéndose la nitidez de la tinción en la membrana basal en algunas áreas de carcinomas bien diferenciados (fig. 3b). La intensidad y extensión de la tinción se incrementó en carcinomas moderadamente diferenciados (fig. 3c). Sin embargo, en los carcinomas fusiformes, no se detectó expresión de $\alpha 6\beta 4$ o quedaba restringida a células aisladas con aparente localización citoplásmica (tabla III).

La expresión de K8 en los tumores inducidos *in vivo* se analizó mediante inmunofluorescencia de secciones tumorales, en paralelo con la expresión de la queratina K13. K13 es una queratina típica de epitelios estratificados internos, habiéndose observado previamente su expresión aberrante en papilomas y carcinomas epidermoides de ratón^{27,28}. Este estudio reveló que los papilomas eran, en general, negativos para la expresión de K8, mientras que los carcinomas mostraban niveles variables de expresión de esta queratina. Sin embargo, los papilomas mostraron una expresión detectable de queratina K13, aumentando su expresión en los carcinomas bien diferenciados (tabla III). Estos datos sugerían que la expresión aberrante de K8 podría ser un evento más tardío en la progresión tumoral que la de K13. Con el objeto de profundizar estas observaciones, se realizó un estudio de la expresión de ambas queratinas mediante doble inmunofluorescencia en tumores inducidos en ratones singénicos por las líneas PDV y PDVC57. PDV induce tumores epidermoides bien diferenciados, mientras que los tumores inducidos por PDVC57 presentan un bajo grado de diferenciación y son muy anaplásicos. Como se puede observar en la figura 4, ambas queratinas se expresan en regiones tumorales distintas. Así, la expresión de K8 apareció asociada a las áreas anaplásicas, mientras que K13 se restringe a las regiones bien



Fig. 3. Tinción inmunohistoquímica de $\alpha 6\beta 4$ en tumores de piel de ratón obtenidos por carcinogénesis química. Secciones congeladas, 5-6 μm de espesor, de diferentes especímenes se tiñeron con el Amc 346-11A (anti- $\beta 4$). Las imágenes corresponden a: un papiloma (a), un carcinoma epidermoide bien diferenciado (b) y a un carcinoma moderadamente diferenciado (c). Aumento, $\times 20$, en todos los paneles.

diferenciadas (fig. 4, comparar paneles a-b y c-d). De acuerdo con el grado de diferenciación de los tumores inducidos por las líneas PDV y

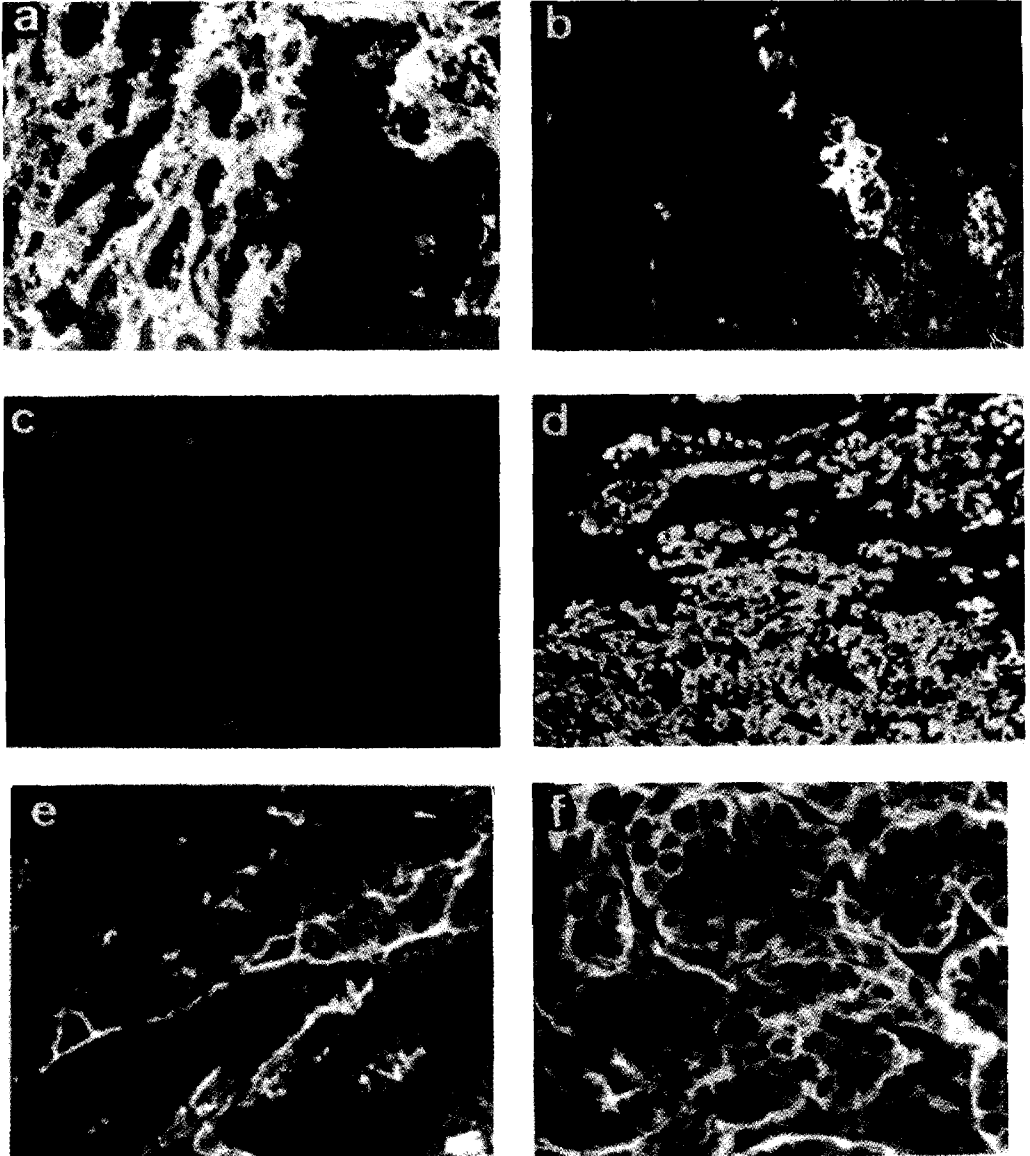


Fig. 4. Localización por inmunofluorescencia de K13, K8 y $\alpha 6\beta 4$ en tumores inducidos en ratones singénicos por las líneas PDV y PDVC57. Secciones congeladas, 5-6 μm de espesor, de tumores inducidos por la línea PDV (a, b y e) y por la línea PDVC57 (c, d y f) se sometieron a inmunofluorescencia doble para la detección conjunta de K13 (paneles a y c) y K8 (paneles b y d) e inmunofluorescencia simple para la detección de $\alpha 6\beta 4$ (paneles e y f). Como anticuerpos primarios se utilizaron el policlonal RK13 de conejo para detectar K13, el AcMo TROMA-1 de rata para K8 y el Acm 346-11A de rata para $\alpha 6\beta 4$. Como anticuerpos secundarios se utilizaron Ig de cabra anticonejo y antirrata acoplados a fluoresceína o rodamina. Aumento, $\times 16$ (paneles a-d) y $\times 40$ (paneles e y f).

PDVC57, K13 se expresó abundantemente en los tumores inducidos por PDV (fig. 4a) y disminuyó drásticamente en los inducidos por PDVC57 (fig. 4c), mientras que K8 exhibió un patrón inverso de expresión en ambos tipos de tumores (figs. 4b y d). Por otra parte, la expresión de la integrina $\alpha 6\beta 4$ en este tipo de tumores mostró una localización más restringida a la membrana basal en los inducidos por PDV (fig. 4e) y su amplia deslocalización en los inducidos por PDVC57 (fig. 4f).

En conjunto, estos resultados confirman los datos obtenidos sobre la expresión de los receptores de adhesión celular y de queratinas aberrantes en las líneas celulares, reforzando la utilidad de las mismas como modelo *in vitro* de la progresión tumoral.

Discusión

El modelo experimental de la carcinogénesis de piel de ratón ha aportado hasta la fecha una valiosa información acerca de las alteraciones genéticas asociadas a estadios discretos de la progresión tumoral⁸⁻¹¹. En un esfuerzo por profundizar en el conocimiento de los eventos celulares potencialmente implicados en la carcinogénesis, nuestros estudios se dirigen a analizar en detalle la expresión de receptores celulares (cadherinas e integrinas) y componentes del citoesqueleto (queratinas) en este modelo.

Los resultados obtenidos sobre la expresión de estas moléculas en una colección de líneas celulares derivadas de diferentes estadios, así como en tumores inducidos en la piel de ratón, han puesto de manifiesto, en primer lugar, la validez de este modelo experimental para una aproximación *in vitro* a la progresión tumoral. Por otra parte, los diferentes componentes analizados muestran un patrón de expresión diferencial, asociado aparentemente a estadios concretos de la progresión tumoral.

El estudio de la expresión de las moléculas de adhesión intercelular de la familia de las cadherinas ha permitido establecer un papel importante para la CD-E en la progresión tumoral. La regulación a la baja (*down regulation*) en la expresión de esta molécula en relación con el fenotipo y el grado de diferenciación tumoral sugiere fuertemente la implicación de esta molécula, junto con otros componentes celulares, en el mantenimiento del patrón de diferenciación de la epidermis. De hecho, estudios de nuestro grupo han mostrado que la reexpresión de CD-E, mediante transfección génica, en la línea celular HaCa4 altamente tumorigénica es

capaz de inducir una reversión parcial del fenotipo tumoral. Esta reversión se manifiesta tanto por el incremento en los tiempos de latencia como en el mayor grado de diferenciación de los tumores inducidos por los transfectantes de CD-E¹⁹. Estas observaciones están, por otra parte, de acuerdo con el carácter antiinvasivo propuesto para CD-E por otros grupos^{29,30}. Por otra parte, los resultados obtenidos acerca de la expresión de CD-P en este sistema si bien no indican una relación aparente con la adquisición del fenotipo maligno podrían sugerir una participación de esta molécula de adhesión, junto a CD-E, en el mantenimiento del fenotipo epitelial de los queratinocitos. Así, la expresión de CD-P se mantiene a niveles altos en las células HaCa4 que conservan una morfología epitelioide, a pesar de la ausencia de CD-E, mientras que su expresión se inhibe en las células de morfología fibroblastoide (fig. 1 y tabla II).

Los estudios sobre la integrina $\alpha 6\beta 4$ han mostrado la existencia de una regulación al alza (*up regulation*) en la expresión de esta molécula con la adquisición del fenotipo maligno. Es interesante señalar que la expresión de esta molécula sufre un proceso de despolarización, observable en lesiones benignas de papilomas, por el que esta integrina deja de estar restringida a la membrana de las células basales en contacto con la lámina basal y se localiza además en la membrana apical y en células de las capas suprabasales. La despolarización de esta molécula se hace más evidente en los carcinomas donde se expresa con gran intensidad en amplias regiones tumorales, aparentemente en contactos célula-célula, al mismo tiempo que tiende a perderse de forma progresiva en las regiones de contacto con la lámina basal (fig. 3). Estos resultados sugieren que la función de esta integrina, y su asociación a hemidesmosomas se altera en los primeros estadios de la progresión tumoral (papilomas) pudiendo contribuir en alguna medida a un debilitamiento del anclaje de las células basales a la matriz subyacente.

Los resultados obtenidos acerca de la expresión de K8, por otra parte, apoyan fuertemente que la expresión aberrante de esta queratina es un evento tardío de la progresión tumoral, en contraste con la expresión de K13, considerado un evento temprano de progresión^{27,28}. Por otra parte, el estudio de otras queratinas en las diferentes líneas de queratinocitos transformadas ha mostrado que la *up regulation* de K8 (y su pareja K18) va acompañada de una disminución progresiva de las queratinas típicas de queratinocitos normales en cultivo

(K5/K14 y K6/K17)²⁶. Estos datos, junto a datos previos de otros grupos acerca de la pérdida de expresión de las queratinas de diferenciación K1 y K10²⁸ en carcinomas malignos, muestran claramente la existencia de alteraciones significativas en el programa de diferenciación de la epidermis durante el desarrollo y progresión tumoral.

En conjunto, nuestros datos apoyan un modelo de progresión tumoral en el que las alteraciones de cadherinas, $\alpha 6\beta 4$ y queratinas ocurren en estadios discretos, pudiendo ser utilizados como marcadores de progresión. Las principales características de este modelo se pueden resumir en:

1. La despolarización de la expresión en la integrina $\alpha 6\beta 4$ y la expresión aberrante de K13 son eventos tempranos, pudiendo utilizarse como marcadores tempranos del proceso neoplásico.

2. El incremento en la expresión de $\alpha 6\beta 4$ y K13, junto a la pérdida de K1/K10, ocurre en la transición de papilomas a carcinomas epidermoides bien diferenciados, proporcionando marcadores del fenotipo maligno.

3. El fenómeno de *down regulation* de CD-E y de *up regulation* de K8 tienen lugar durante la progresión de carcinomas epidermoides hacia fenotipos más indiferenciados e invasivos, pudiendo utilizarse como marcadores de progresión intermedia y tardía, respectivamente.

4. La ausencia prácticamente total de CD-E, CD-P, $\alpha 6\beta 4$ y queratinas aparece asociada al desarrollo de carcinomas fusiformes indiferenciados.

Un aspecto importante que plantean nuestros estudios es la posible relación entre las alteraciones del programa de diferenciación observadas y las lesiones genéticas detectadas en diferentes estadios en este sistema. Nuestros estudios sobre expresión de queratinas sugieren fuertemente que la activación por mutación del protooncogén H-ras (evento frecuente en la iniciación por DMBA) no es suficiente para la expresión aberrante de K8 *in vivo*. Así, mientras que un número elevado de papilomas inducidos por DMBA presentan mutaciones puntuales en el codón 61 de H-ras⁹, la expresión de K8 no se detecta en este tipo de lesiones (tabla III). La inactivación por mutación en el gen que codifica para p53 se ha localizado significativamente en la transición de papiloma a carcinomas malignos¹¹, lo que podría estar relacionado hipotéticamente con las alteraciones celulares observadas en dicha transición. Ac-

tualmente, estamos estudiando (en colaboración con el Dr. A. Balmain, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow) esta posible relación mediante un análisis de la expresión de los marcadores de progresión en tumores inducidos en ratones mutantes (homo y heterocigotos) para p53. Por otra parte, la ausencia de expresión de cadherinas, $\alpha 6\beta 4$ y queratinas en los tumores fusiformes sugiere que alguno de los potenciales genes supresores implicados en este estadio podría estar implicado en la regulación de la expresión de genes de diferenciación epitelial o epidérmica. En este sentido, la pérdida de heterocigosidad detectada en este estadio en el cromosoma 7, en el *locus* del gen H-ras, sugiere fuertemente la existencia de genes supresores en dicho *locus*^{9,10}. Estudios recientes del grupo de A. Balmain han puesto de manifiesto mediante experimentos de fusión celular que el fenotipo fusiforme es reversible³¹. Sin embargo, la posible implicación directa del alelo normal H-ras como gen supresor en los estados finales de progresión parece estar descartada por estudios de transfección génica (A. Balmain, comunicación personal). En la actualidad, estamos estudiando la regulación del promotor de CD-P³² en líneas celulares de diferentes estadios con el fin de caracterizar los factores implicados en su expresión y su posible inactivación en los últimos estadios de progresión de la carcinogénesis de piel de ratón.

Con independencia de profundizar en los mecanismos básicos subyacentes a la carcinogénesis de piel de ratón, los resultados obtenidos hasta la fecha en este modelo plantean la posibilidad de extender el estudio de los marcadores analizados a tumores humanos de tipo epitelial. En este sentido, estamos estudiando la expresión de CD-E en carcinomas de mama y basocelulares de epidermis. Los resultados obtenidos en el estudio de 61 casos de tumores de mama han mostrado la existencia de una fuerte correlación entre la expresión de CD-E y el grado de diferenciación y tipo histológico. Así, en carcinomas ductales infiltrativos se ha observado una reducción significativa en la expresión de CD-E en los tumores de grado 2 (15 de 25 casos) y grado 3 (11 de 19) respecto a la expresión observada en tumores de grado 1 (uno de 10). Por otra parte, los carcinomas de tipo lobulillar muestran una ausencia total de expresión de CD-E³³. Además, en carcinomas basocelulares, la expresión de CD-E aparece conservada en carcinomas no infiltrativos mientras que se reduce en áreas locales de carcinomas infiltrativos. Estos resultados refuerzan la posible

utilidad de CD-E como marcador de progresión tumoral en tumores humanos, aunque es necesario un estudio más exhaustivo en mayor número de muestras y tipos tumorales.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido realizado con financiación de la DGICYT (PB88-0004), CAM (C075/91) y CICYT (SAF92-0146). P.N. y C.C., becarios del PFPI y M.G. de la CAM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
2. Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-270.
3. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64: 313-326.
4. Marks F, Fürstenberger G. Experimental evidence that skin carcinogenesis is a multistep phenomenon. *Br J Dermatol* 1986; 115 Supl 31: 1-8.
5. Hecker E. Carcinogenesis. En: Slaga TJ, Sivak A, Boutwell RK, editores. *Mechanisms of tumor promotion and carcinogenesis*. Nueva York: Raven Press, 1978; 11-48.
6. Klein-Szanto AJ, Larcher F, Bonfil RD, Conti CJ. Multistage chemical carcinogenesis protocols produce spindle cell carcinomas of the mouse skin. *Carcinogenesis* 1989; 10: 2.169-2.172.
7. Buchmann A, Ruggeri B, Klein-Szanto AJ, Balmain A. Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7. *Cancer Res* 1991; 51: 4.097-4.101.
8. Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986; 322: 78-80.
9. Bremner R, Balmain A. Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 1990; 61: 407-417.
10. Bianchi AB, Aldaz CM, Conti CJ. Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2.902-2.906.
11. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumors of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 1991; 6: 2.363-2.369.
12. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57: 1.083-1.093.
13. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988; 102: 639-655.
14. Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 1986; 103: 2.649-2.658.
15. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-554.
16. Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LMH, Falcioni R et al. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ complex is located in hemidesmosomes suggesting a major role in epidermal-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 1991; 113: 907-917.
17. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
18. Steinert, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 593-625.
19. Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 1991; 115: 517-533.
20. Gómez M, Navarro P, Quintanilla M, Cano A. Expression of $\alpha 6 \beta 4$ integrin increases during malignant conversion of mouse epidermal keratinocytes. Association of $\beta 4$ subunit to the cyokeratin fraction. *Exp Cell Res* 1992; 201: 250-261.
21. Yuspa SH, Morgan D, Lichti U, Spangler FF, Michael D, Kilkenny A et al. Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas initiated by an initiation/promotion protocol. *Carcinogenesis* 1986; 7: 946-958.
22. Brown K, Quintanilla M, Ramsden M, Kerr IB, Young S, Balmain A. *v-ras* genes from Harvey and BALB murine sarcoma virus can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell* 1986; 46: 447-456.
23. Kulesz-Martin M, Kilkenny AE, Hollbrook KA, Digernes V, Yuspa SH. Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium induced terminal differentiation. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1.367-1.377.
24. Fusenig NE, Breikreutz D, Dzrlieva RT, Boukamp P, Herzmann E, Bornert A et al. Epidermal cell differentiation and malignant transformation in culture. *Cancer Forum* 1982; 6: 209-240.
25. Quintanilla M, Haddow S, Jonas D, Jaffe D, Bowden GT, Balmain A. Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1.875-1.881.
26. Caulin C, Bauluz C, Gandarillas A, Cano A, Quintanilla M. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp Cell Res* 1993; 204: 11-21.
27. Nischt R, Roop DR, Mehrel T, Yuspa SH, Rentrop M, Winter H et al. Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol Carcinog* 1988; 1: 96-108.

28. Giménez-Conti I, Aldaz CM, Bianchi AB, Roop DR, Slaga TJ, Conti CJ. Early expression of type I K13 keratin in the progression of mouse skin papillomas. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1.995-1.999.
29. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113: 173-185.
30. Vemincx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66: 107-119.
31. Stoler AB, Stenback F, Balmain A. The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol* 1993. En prensa.
32. Faraldo MLM, Cano A. The 5' flanking sequences of the mouse P-cadherin gene. Homologies to 5' sequences of the E-cadherin gene and identification of a first 215 base-pair intron. *J Mol Biol* 1993. En prensa.
33. Gamallo C, Palacios J, Suárez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1993. En prensa.

DISCUSIÓN

F. GARRIDO: Quisiera hacer un comentario a la presentación en general; ¿no considera importante, conociendo la heterogeneidad intratumoral de los tumores individuales, que es necesario presentar los datos a partir de clones individuales dentro de cada tumor, bien sean inducidos *in vitro* o *in vivo*, ya que de lo contrario pueden obtenerse resultados erróneos, en el sentido de que existen muchos clones dentro de un mismo tumor que pueden tener fenotipos muy distintos? Por lo que he visto, usted considera los tumores como si fueran homogéneos.

A. CANO: Estoy de acuerdo con el problema de la heterogeneidad que usted apunta. Hemos analizado bastantes tumores y creo que el énfasis que pretendemos hacer con esto es asociar la expresión de estas moléculas con el estado de diferenciación. Evidentemente, no en todos los tumores se puede considerar de forma homogénea que son muy bien diferenciados o moderadamente diferenciados, pero sí que en conjunto el tumor muestra una tendencia, y lo que es cierto es que dentro de esas diferentes regiones de diferenciación, si se considera un tumor muy heterogéneo, se observan unos elevados niveles de expresión de cadherina-E en las zonas muy bien diferenciadas mientras que esta expresión va disminuyendo conforme disminuye la diferenciación, ya sea intra o intertumoral.

A. MAZO: Quería preguntarle si han llevado a cabo estudios sobre los efectos de agentes inductores de diferenciación en la expresión de las moléculas que ha presentado, o en la morfología de las líneas celulares a las que antes ha hecho referencia.

A. CANO: Considerando una línea celular como es la HaCa4 que tiene una morfología epitelioide, *in vitro* se inhibe la expresión de cad-

herina E, pero *in vivo* es capaz de reexpresarse cuando estas células se inyectan en tumores. Intentamos *in vitro* el uso de diferentes agentes como retinoides, vitamina D₃, etc., con esta línea celular para tratar de comprobar si podríamos revertir parcialmente el efecto, y no obtuvimos ningún resultado.

E. CAMPO: Por las evidencias que nos han mostrado en relación a las moléculas de adhesión, parece que en estos modelos están íntimamente relacionadas con diferenciación celular, la pregunta es: ¿es esto un epifenómeno de la transformación neoplásica asociada a pérdida de diferenciación, o la pérdida de estas moléculas de adhesión puede desempeñar un papel en los mecanismos de progresión, invasión y metástasis?

A. CANO: En relación con la primera parte de su pregunta, es decir, si es una consecuencia de la transformación neoplásica, creo que puede ser considerada actualmente como una de las alteraciones genéticas que sabemos que se tienen que acumular para generar un fenotipo maligno. Lo que sí es cierto es que existen evidencias, procedentes de otros grupos de investigadores, que demuestran claramente que la cadherina E puede ser una molécula antiinvasiva. Es decir, la pérdida de esta molécula, al menos por estudios *in vitro*, favorece claramente la capacidad de invasión de las células tumorales en matrices artificiales. En nuestro caso concreto, todos los datos que he mencionado acerca de reversión parcial de tumorigenicidad se refieren a lo que que hemos observado en un incremento notable en la latencia de los tumores, y además, un mayor grado de diferenciación. Realmente, este aspecto todavía no está claro.

F. GARRIDO: Quisiera comentar que en el último Congreso sobre melanoma celebrado recién-

temente en Venecia, dos grupos independientes de investigadores comunicaron que las metástasis oculares de melanomas primarios comportan en un porcentaje muy elevado de casos la aparición de unas moléculas de adhesión concretas de esta compleja familia a la que se refería la Dra. Cano.

O. MASSÓ: Una pregunta muy concreta a la Dra. Cano, que se refiere a si tienen ustedes experiencia, o existen datos publicados sobre la expresión de cadherinas en melanoma y la evolución durante las distintas fases del melanoma.

A. CANO: En melanoma, no conozco datos publicados aunque se está haciendo en este momento un gran esfuerzo por parte de bastantes grupos para estudiar la expresión de cadherina E en diferentes tipos de tumores.

J. VILCHES: En su trabajo, en la parte que corresponde a la valoración de la progresión a través de la expresión inmunohistoquímica de la citoqueratina: ¿han estudiado el paso correspondiente a papiloma-neoplasia intraepitelial-carcinoma invasor?

A. CANO: El paso de papiloma a carcinoma se ha estudiado empleando fundamentalmente marcadores K8-K13, y también K5. La conclusión fundamental es que en esta etapa se produce un incremento de la expresión de K8 y una disminución de K13 al pasar de papiloma a carcinoma. Es decir, la idea actual es que mientras que la expresión de K13 podría considerarse un marcador muy temprano de la progresión neoplásica, K8 sería un marcador más tardío.