



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**IMPLICACIÓN DE LAS INTEGRINAS  $\alpha v \beta$  EN  
PATOLOGÍAS TUMORALES HUMANAS**

Autor: Claudia Schneegluth Martín

Tutor: Dra. María del Carmen de Juan Chocano

Convocatoria: Febrero 2018

# ÍNDICE

Resumen

Abstract

## 1. Introducción

1.1. Moléculas implicadas en la adhesión celular

1.2. Moléculas de Adhesión Celular (CAMs)

1.3. Estructuras celulares implicadas en adhesión celular

1.4. Integrinas:

1.4.1. Identificación de las integrinas

1.4.2. Definición de Integrinas

1.4.3. Estructura de las integrinas

1.4.4. Activación de las integrinas: modelo establecido

1.4.5. Estructuras celulares donde se localizan las integrinas

1.5. Integrinas y vías de señalización

1.5.1. Señales de proliferación y supervivencia por activación de integrinas

1.5.2. Vía de las MAPKs

1.5.3. Vía de PI3K-PKB/Akt

1.5.4. Vía Rho-GTPasas

## 2. Antecedentes

## 3. Objetivos

## 4. Metodología

## 5. Resultados

5.1. Patrones de expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en tejido no neoplásico

5.2. Expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en cáncer de mama y metástasis cerebral

5.3. Expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en cáncer de pulmón y metástasis cerebral

5.4. Expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en melanoma maligno y metástasis cerebral

5.5. Expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en cáncer renal y metástasis cerebral

## 6. Discusión

## 7. Conclusión

## 8. Bibliografía

## Resumen

Las integrinas son receptores de adhesión celular que juegan un papel clave y bien establecido en la migración y la invasión tumoral. Estas proteínas pueden regular la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, afectando así a la progresión del tumor y a la metástasis. La metástasis cancerosa implica cambios en la adhesión célula-célula y matriz celular-extracelular, que afectan a la diseminación de células tumorales desde sus tejidos de origen, y permiten su siembra y crecimiento en sitios distales. En este trabajo, se han investigado los cambios en la expresión y distribución de un grupo de integrinas  $\alpha\beta$  (que incluye a las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$  y  $\alpha\beta8$ ) en tumores malignos humanos primarios y en sus metástasis cerebrales, así como su posible influencia en el potencial maligno de un tumor. Por este motivo este grupo de integrinas se ha convertido en un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer.

## Abstract

Integrins are the crucial cell adhesion receptors that play a well-established role in tumor migration and invasion. These proteins can regulate the tumor cells proliferation and survival, thus affecting tumor progression and metastasis. Cancer metastasis involves changes in cell-cell adhesion and cellular-extracellular matrix, which are believed to affect the spread of tumor cells from their tissues of origin, and allow their seeding and growth at distal sites. In this project, the changes in the expression and distribution of a group of integrins  $\alpha\beta$  (which includes integrins  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$  and  $\alpha\beta8$ ) in primary human malignancies and in their brain metastases and their possible influence on the malignant potential of a tumor have been studied. For this reason, this group of integrins has become an attractive target for cancer therapy.

### 1. Introducción

Las células cancerosas tienen la capacidad de reestructurar varias vías de señalización metabólica, aumentando la supervivencia celular, su actividad migratoria y capacidad invasiva. Para ello son necesarios tanto los factores de crecimiento como las moléculas de adhesión, que influyen en la angiogénesis y metástasis tumoral, y la interacción entre las células y la matriz extracelular (1).

### 1.1. Moléculas implicadas en la adhesión celular

El ensamblaje y la organización de los diferentes tejidos para formar órganos están determinados por las interacciones moleculares que tienen lugar a nivel celular. Para ello se necesita la expresión funcional, temporal y espacialmente regulada de una amplia variedad de moléculas de adhesión. Las células en los tejidos pueden adherirse directamente entre sí (adhesión célula célula) o a través de proteínas de membrana especializadas llamadas moléculas de adhesión celular (CAM) que suelen agruparse y formar uniones celulares especializadas. Las células también se pueden adherir indirectamente (adhesión entre célula y matriz) a través de la unión de los receptores de adhesión en la membrana plasmática a los componentes de la matriz extracelular circundante (MEC), una compleja red de proteínas y polisacáridos secretada por las células a los espacios que existe entre ellas.

Las adhesiones entre células y entre célula y matriz también proporcionan un medio para la transferencia bidireccional de información entre el exterior y el interior de las células. Ambos tipos de adhesiones están intrínsecamente asociadas con el citoesqueleto y las vías de señalización. Ésta transferencia de información es importante para muchos procesos biológicos (que incluyen la supervivencia, la proliferación, y la migración celular). Por lo tanto, los defectos en estas interacciones contribuyen a la aparición de enfermedades que incluyen una amplia variedad de trastornos neuromusculares y esqueléticos y el cáncer (2).

### 1.2. Moléculas de Adhesión Celular (CAMs)

Existen cuatro familias principales de CAMs: la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las cadherinas, las selectinas y las integrinas.

Las CAM median, a través de sus dominios extracelulares, las interacciones adhesivas entre las células del mismo tipo (adhesión homotípica) o entre células de tipos diferentes (adhesión heterotípica). Sobre una célula, una CAM puede unirse directamente a la misma clase de CAM sobre una célula adyacente (unión homófila) o una clase distinta de CAM (unión heterófila). Las CAM pueden distribuirse ampliamente a lo largo de las regiones de la membrana plasmática que están en contacto con otras células o agruparse en puntos denominados uniones celulares. Además, las adhesiones

entre célula y célula pueden ser estrechas y de larga duración o relativamente débiles y transitorias.

Los dominios de las CAM orientados al citosol reclutan grupos de proteínas adaptadoras multifuncionales que actúan como conectores entre las CAM y los elementos del citoesqueleto o que funcionan de adaptadores en las vías de señalización para controlar la expresión génica (2).

### 1.3. Estructuras celulares implicadas en adhesión celular

Existen tres clases principales de uniones celulares que constituyen las interacciones de los diferentes epitelios: uniones de anclaje, uniones estrechas y uniones de hendidura. Las uniones de anclaje y las uniones estrechas desempeñan las tareas clave de mantenimiento de la unión celular (2). Estas uniones se organizan en tres partes: las moléculas de adhesión celular que conectan a otra célula o a la matriz, las proteínas adaptadoras que conectan las CAM con la actina o filamentos de queratina, y por último, el haz de filamentos del mismo citoesqueleto.

Por último, mencionar las uniones de hendidura (gap junctions) que están compuestas por conexinas que forman poros entre células. Estos poros permiten la difusión rápida de pequeñas moléculas solubles en agua entre el citoplasma de células adyacentes, lo que es fundamental en la sinapsis química (3).

### 1.4. Integrinas:

#### 1.4.1. Identificación de las integrinas

Desde que se observó que la adhesión a la matriz extracelular de las células tumorales estaba reducida, las bases moleculares de esta unión han sido objeto de gran interés en el campo de la biología celular. En torno a los años ochenta, el trabajo de varios laboratorios evidenció la existencia de una relación física entre las fibras de estrés del citoesqueleto de actina y la fibronectina en la matriz extracelular. Pero por aquel entonces se desconocían las proteínas transmembrana críticas que unían a las células con la matriz extracelular (3). Gracias a la inmunofluorescencia y la microscopia inmunoelectrónica se localizaron estas proteínas en puntos de adhesiones celulares a la

matriz. El clonaje de la integrina dio lugar a nuestra actual comprensión de la base molecular de las uniones celulares estables.

#### 1.4.2. Definición de Integrinas

Las integrinas son una familia de proteínas transmembrana que funcionan como receptores de adhesión mediante los cuales la superficie basal de las láminas epiteliales está firmemente adherida a la matriz extracelular (ECM) o lámina basal. Se encargan de la mediación de las interacciones célula-célula y célula-matriz, además de funcionar como reguladores críticos de la fisiología celular, al mediar procesos como la migración y proliferación celular (2).

El engranaje de las integrinas por sus ligandos extracelulares puede, por medio de las proteínas adaptadoras unidas a la región citosólica de la integrina, influenciar en el citoesqueleto y las vías de señalización intracelular (señalización desde afuera hacia adentro), incluido el control de la activación de la nucleación de actina, la polimerización y las proteínas de reticulación, así como la supervivencia y señalización mitogénica. Por el contrario, las vías de señalización intracelular se pueden alterar, a partir del citoplasma.

#### 1.4.3. Estructura de las integrinas

Las integrinas están presentes en la superficie celular como heterodímeros que constan en una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . En humanos, hay 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , que se combinan para formar al menos 25 heterodímeros  $\alpha\beta$  en varias combinaciones (4). Una única cadena beta puede interactuar con cualquiera de las múltiples cadenas  $\alpha$  y formar integrinas que unen diferentes ligandos. Este fenómeno de diversidad combinatoria permite que una cantidad relativamente pequeña de componentes sirva para un gran número de funciones distintas (2). Aunque la mayoría de las células expresan varias integrinas distintas que unen los mismos o diferentes ligandos, muchas integrinas se expresan de forma predominante en ciertos tipos celulares. No solo muchas integrinas se unen a más de un ligando, sino que varios de sus ligandos se unen a múltiples integrinas.

Todas las integrinas parecen haber evolucionado a partir de dos subgrupos generales ancestrales: aquellos que reconocen las proteínas que contienen la secuencia del

tripéptido Arg-Gly-Asp, llamada generalmente la secuencia RGD (la fibronectina es una de tales proteínas), y las que unen la laminina (2).

#### 1.4.4. Activación de las integrinas: modelo establecido

Las integrinas pueden existir en la superficie celular en una de las tres conformaciones: inactiva y doblada con baja afinidad por los ligandos de ECM, extendida y preparada con una cabeza cerrada y, por lo tanto, baja afinidad por su ligando, o extendida con una cabeza abierta con alta afinidad por los ligandos de la matriz extracelular (ECM) tales como fibronectina, colágeno, laminina y vitronectina (5).

La conformación de la integrina inactiva, en la cual el heterodímero  $\alpha\beta$  se dobla, se estabiliza mediante un puente salino entre las regiones citoplásmicas de las colas C-terminales de las dos subunidades y por el empaquetamiento de la hélice en el dominio transmembrana, provocando que la conformación del sitio de unión al ligando en la punta de la molécula permita solamente uniones de baja afinidad (3).

La activación de la integrina provocará una alteración en la conformación de los dominios que forman el sitio de unión al ligando que permitirá la unión de alta afinidad y la separación de las colas citoplasmáticas. Esta activación está regulada por dos mecanismos (6): a través de la unión de las proteínas a las colas citoplasmáticas, lo que induce cambios conformacionales en el heterodímero de la integrina que facilitan la interacción con ligandos de la ECM, o mediante el compromiso de ligandos de la matriz extracelular en la porción exofacial, induciendo la agrupación de integrinas y promoviendo la activación. Parte de ambas subunidades  $\alpha\beta$  de la molécula de integrina contribuyen al sitio de unión al ligando extracelular primario. La unión de las integrinas al ligando también requiere la unión simultánea de cationes divalentes.

#### 1.4.5. Estructuras celulares donde se localizan las integrinas

Además de fijar las células a la matriz extracelular, las integrinas sirven como anclaje para el citoesqueleto. Distintos tipos de interacciones entre las integrinas y el citoesqueleto se encuentran en dos tipos de contactos célula-matriz, las adhesiones focales y los hemidesmosomas.

En las adhesiones focales, los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\beta$  de las integrinas anclan el citoesqueleto de actina mediante su asociación con paquetes de filamentos de actina a través de proteínas de unión. Cuando se activan las integrinas, su interacción inicial con la matriz extracelular incorpora más integrinas al punto de adhesión, dando lugar al desarrollo de pequeños acúmulos de integrinas denominados complejos focales. A continuación, los complejos focales se transforman en adhesiones focales gracias a la incorporación de  $\alpha$ -actinina, vinculina, talina y formina (que pone en marcha la formación de haces de actina) (3). Las adhesiones focales pueden ser interacciones muy estables implicadas en la estructura tisular, o bien recambiarse rápidamente cuando las células se desplazan.

Por otro lado, los hemidesmosomas conectan las células epiteliales a la lámina basal y, a través de proteínas adaptadoras, a filamentos intermedios del citoesqueleto basados en queratina. El principal receptor de adhesión a la MEC en los hemidesmosomas epiteliales es la integrina  $\alpha 6\beta 4$  (2). La integrina  $\alpha 6\beta 4$  se une a la laminina, de forma que los hemidesmosomas anclan las células epiteliales a la lámina basal.

## 1.5. Integrinas y vías de señalización

### 1.5.1. Señales de proliferación y supervivencia provocadas por activación de integrinas

Las integrinas controlan la activación de una gran variedad de vías de señalización intracelulares, incluyendo la señalización pro-supervivencia y mitogénica (7). Muchas de estas señales pueden promover el crecimiento de células cancerosas y así contribuir a la progresión del cáncer si se interrumpe la regulación apropiada (8). Aunque las integrinas en sí mismas no poseen ninguna quinasa u otra actividad de señalización, su agrupación y activación conduce al reclutamiento y la activación de varias quinasas y adaptadores de señalización. Mediante este mecanismo, las integrinas activan la quinasa de adhesión focal (FAK), la quinasa ligada a integrinas (ILK) y las quinasas de la familia Src (SFK), así como el sustrato adaptador de la señalización asociado a CRK, p130CAS(9). Estas señales pueden provocar la activación de muchas vías de señalización, incluida la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la activación de Akt (10)(11). Otras señales derivadas de la activación de las integrinas incluyen la vía MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos) (12), y la familia Rho de GTPasas (13). Es así como las integrinas



funcionan como centros de señalización que promueven la migración celular, la supervivencia celular y la proliferación celular.

Es importante destacar que la señalización de integrina coopera con la de los receptores del factor de crecimiento tal y como lo hacen los receptores tirosín-quinasa (13). Su regulación es recíproca y compleja, y puede incluir la regulación de la expresión génica, la amplificación de la señal mediante la activación de intermediarios comunes, la activación de un receptor por otro y, en algunos casos, la asociación física de integrinas y receptores del factor de crecimiento tales como EGFR.

Las integrinas también intervienen en la invasión de células tumorales al regular la localización y la actividad de las proteasas que degradan la matriz, como la metaloproteasa de matriz 2 (MMP2) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA)(14).

Además de la señalización específica de las integrinas activadas ligadas a la ECM, los complejos de integrinas no ligados provocan señales apoptóticas, por lo que se establece una unión entre el desprendimiento de la ECM y la apoptosis. A este fenómeno se le conoce como anoikis (apoptosis debida a la ausencia de interacción célula-matriz). La desvinculación de la ECM por las integrinas desencadena el anoikis (15) mediante la eliminación de la señalización a favor de la supervivencia mediada por FAK y otras señales iniciadas por las integrinas. Todo ello tiene lugar gracias a la alteración de las adherencias focales, que conducen a alteraciones en el citoesqueleto de actina que impactan en la dirección mitocondrial de proteínas apoptóticas y en la activación de señales pro-apoptóticas como p38 y c-Jun N-terminal quinasa (JNK), y la activación del iniciador caspasa: CASP8.

#### 1.5.2. Vía de las MAPKs

La vía de las quinasas MAP es una ruta que participa durante la insuficiencia de energía, ya que se activa con un aumento en la relación AMP: ATP (o ADP: ATP). En las células animales, las MAP quinasas se acoplan a los receptores del factor de crecimiento por una pequeña proteína de unión a GTP denominada Ras, conduce a la activación de la quinasa MAP (ERK) (3). Esta quinasa es un heterotrímero y AMP, ADP, y ATP se unen a

la subunidad  $\gamma$  cuando la subunidad  $\alpha$  está fosforilada, controlando la actividad serina/treonina quinasa de la subunidad  $\alpha$  (16).

Tras la activación, ERK fosforila varias proteínas citosólicas y nucleares, incluyendo a factores de transcripción que inducen la expresión de genes tempranos inmediatos. Con todo ello, la MAP quinasa conduce a la mejora de la absorción de nutrientes y la producción y conservación de energía (17).

Además, MAPK fosforila y controla directamente a p53 con la finalidad de regular el ciclo celular, por ello se considera un importante regulador del crecimiento y la proliferación del cáncer. En condiciones normales la MAPK regula negativamente las vías anabólicas requeridas para el crecimiento del cáncer, incluida la síntesis de ácidos grasos y proteínas (18), lo que indica que la activación de MAPK sirve para limitar el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas. Pero, en algunas circunstancias, la activación de MAPK debida al déficit de nutrientes y al estrés metabólico puede promover la supervivencia del tumor, al aumentar los niveles de NADPH a través de la supresión de la síntesis de ácidos grasos y la potenciación de su oxidación (19). Por lo tanto, bajo diferentes condiciones, la activación de MAPK puede resultar en la mejora o en el deterioro de la viabilidad o proliferación celular (20).

### 1.5.3. Vía de PI3K-PKB/Akt:

Una segunda vía importante de señalización intracelular después de la vía de las tirosín-quinasa se basa en el empleo de un segundo mensajero obtenido del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). El PIP2 es un componente de la membrana plasmática, situado en la cara interna de la bicapa de los fosfolípidos. Este metabolito puede fosforilarse en la posición 3 del inositol por la acción de la enzima fosfatidilinositido3-quinasa (PI3K) (10).

La forma de la PI3K activada por las tirosín-quinasa es reclutada y activada por la asociación con receptores tirosín-quinasa. Una isoforma alternativa de la PI3K es activada por las proteínas G. La fosforilación de PIP2 produce el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) que es fundamental para la señalización de la proliferación y la supervivencia de las células. Una diana clave del PIP3 es una serina/treonina quinasa denominada Akt. La formación de PIP3 produce la asociación

de Akt y PDK1 con la membrana plasmática, lo que lleva a la fosforilación y activación de Akt.

Una vez activada, la Akt fosforila diversas proteínas diana, entre ellas proteínas que regulan directamente la supervivencia celular (como Bad), factores de transcripción (miembros de la familia FOXO) y otras proteína quinasas. La fosforilación de FOXO por Akt crea un sitio de unión para las chaperonas citosólicas que secuestran a FOXO en una forma inactiva en el citoplasma. En ausencia de la señalización por factores de crecimiento y de actividad de Akt, FOXO es liberado y se trasloca al núcleo, estimulando la transcripción de genes que inhiben la proliferación celular o inducen la muerte celular.

Otra diana de Akt es la proteína quinasa GSK-3, que regula el metabolismo además de la proliferación y supervivencia celular. Al igual que FOXO, GSK-3 es inhibido por la fosforilación de Akt. Las dianas de GSK-3 incluyen diversos factores de transcripción y el factor de iniciación de la traducción eIF2B. La fosforilación de eIF2B lleva al descenso global de la iniciación de la traducción, de forma que GSK-3 proporciona una conexión entre la señalización de los factores de crecimiento y el control de la síntesis proteica celular.

Una de las dianas de la señalización de Akt es la proteína quinasa mTOR, que es un regulador central del crecimiento de las células y se combina con la síntesis de proteínas y la autofagia para la disponibilidad de factores de crecimiento, nutrientes y energía celular (3).

#### 1.6. Via Rho-GTPasas

Las RHO GTPasas son miembros de la superfamilia RAS GTPasas, que actúan como interruptores moleculares y que son activados por factores de crecimiento y adhesión. De esta manera desempeñan un papel importante en el desarrollo y la progresión de los tumores. (21). Hay 20 genes Rho GTPasa en humanos. La mayoría de las Rho GTPasas son activas y estimulan sus objetivos cuando se unen al GTP, e inactivas cuando se unen al GDP. Estas GTPasas se activan por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que inducen el intercambio de GDP por GTP, y son inactivados por las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), que catalizan la hidrólisis de GTP al GDP en las proteínas Rho. (22)

Cuando se activan, las GTPasas de la familia RHO (RAC1, CDC42 y RHOA), transmiten señales que reclutan proteínas efectoras como las proteín-quinasas PAK, ACK, MLK, MRCK y ROCK. La pérdida inducida genéticamente de la función RHO impide la transformación por estímulos oncogénicos, lo que conduce al interés en el desarrollo de inhibidores moleculares dirigidos directamente a las RHO GTPasas, o a sus efectores de proteína quinasa. Aunque los inhibidores de RHO GTPasas y sus quinasas de señalización aún no se han adoptado ampliamente para uso clínico, su valor potencial como agentes terapéuticos contra el cáncer continúa facilitando la investigación y desarrollo farmacéutico y es una estrategia terapéutica prometedora (21).

## 2. Antecedentes

La expresión de las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha4\beta1$  y  $\alpha\beta6$  en células tumorales

Tipo de tumor	Integrinas expresadas
Melanoma	$\alpha\beta3$ y $\alpha5\beta1$
Cáncer de mama	$\alpha6\beta4$ y $\alpha\beta3$
Cáncer de próstata	$\alpha\beta3$
Cáncer de páncreas	$\alpha\beta3$
Cáncer de ovario	$\alpha4\beta1$ y $\alpha\beta3$
Cáncer cervical	$\alpha\beta3$ y $\alpha\beta6$
Glioblastoma	$\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$
Cáncer de pulmón	$\alpha5\beta1$
Cáncer de colon	$\alpha\beta6$

se correlaciona con la progresión de la enfermedad en diversos tipos de tumores (Tabla 1.) (22), por lo tanto, estas son las integrinas más estudiadas en el cáncer.

Algunas de estas integrinas como  $\alpha\beta3$ , además de expresarse en la mayoría de tumores primarios (Tabla 1), se expresa de forma predominante en las células metastásicas de próstata (23).

**Tabla 1.** Integrinas implicadas en la progresión de diferentes tumores.

## 3. Objetivos

Con esta revisión bibliográfica, se plantea como objetivo valorar el actual conocimiento que se tiene acerca de las integrinas y sus características más importantes en relación a su implicación en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis, así como en el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Se pretende determinar la asociación entre los patrones de expresión alterados de diferentes integrinas  $\alpha\beta$  (las más frecuentemente involucradas en la progresión tumoral) con la metástasis cerebral. Debido a la implicación de estas integrinas en el proceso tumoral, se convierte en uno de los

objetivos terapéuticos más atractivos, por lo que se revisarán también algunas terapias dirigidas a las integrinas.

#### 4. Metodología

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos referentes a las integrinas y al cáncer durante estos últimos años. Para ello, se ha llevado a cabo una búsqueda online en las bases de datos de PubMed, MedLine y Elsevier. Se utilizaron palabras clave como “moléculas de adhesión” “integrin” “ $\alpha\beta$ ” “integrin and cancer” “integrin and survival” “integrin expression”. Además, se buscaron artículos a través de Google Académico utilizando las mismas palabras clave.

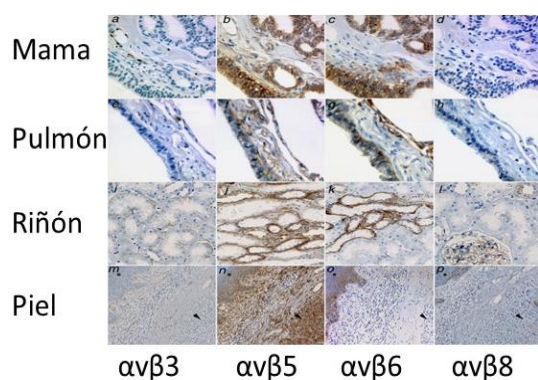
Esta revisión se centró en el papel de las integrinas  $\alpha\beta$  en la metástasis cerebral, para lo que se reúnen datos sobre la expresión de las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$  y  $\alpha\beta8$  en tumores malignos primarios y metástasis en el cerebro de carcinomas mamarios, pulmonares y renales y melanoma maligno.

#### 5. Resultados

Los resultados obtenidos sobre la expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en los diferentes tipos de cáncer se basan en los estudios de inmunohistoquímica realizados en biopsias de tumores primarios de cáncer de mama (CM), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de células renales (CCR) y melanoma maligno y sus metástasis cerebrales.

##### 5.1. Patrones de expresión de las integrinas $\alpha\beta$ en tejido no neoplásico

En primer lugar se observaron los diferentes patrones de expresión de las integrinas objeto de estudio ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$  y  $\alpha\beta8$ ) en tejidos normales de mama, pulmón, riñón y piel (24)(Fig 1).



riñón y piel (24)(Fig 1).

**Figura 1.** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de  $\alpha\beta3$  (a, e, i, m),  $\alpha\beta5$  (b, f, j, n),  $\alpha\beta6$  (c, g, k, o) y  $\alpha\beta8$  (d, h, l, p) en tejido normal de mama (a–d), pulmón (e–h), riñón (i–l) y piel (m–p)(100  $\mu$ m).

Tal y como se muestra en la Tabla 2, se puede observar que algunas de estas integrinas se expresan normalmente en los tejidos adultos no neoplásicos, mientras que otras están ausentes en los mismos tejidos.

	Mama	Pulmón	Riñón	Piel
$\alpha\beta 3$	Expresión ausente	Expresión ausente	Expresión ausente en conductos colectores, débil en túbulos proximal y distal y moderada en podocitos	Expresión ausente en epidermis y melanocitos de nevos melanocíticos
$\alpha\beta 5$	Alta expresión en células epiteliales y mioepiteliales de la mama.	Alta expresión en epitelio respiratorio.	Expresión basal débil en túbulos proximales y fuerte en túbulos distales, conductos colectores y podocitos.	Expresión prominente en epidermis y melanocitos de nevos melanocíticos.
$\alpha\beta 6$	Alta expresión en células epiteliales y mioepiteliales de la mama.	Alta expresión en epitelio respiratorio.	Alta expresión en túbulos distales y conductos colectores	Expresión ausente
$\alpha\beta 8$	Expresión ausente	Expresión ausente	Expresión moderada en túbulos distales y conductos colectores; débil en túbulos proximales y ausente en podocitos.	Expresión ausente

**Tabla 2.** Expresión de las proteínas  $\alpha\beta$  en tejido no neoplásico de mama, pulmón, riñón y piel.

## 5.2. Expresión de las integrinas $\alpha\beta$ en cáncer de mama y metástasis cerebral

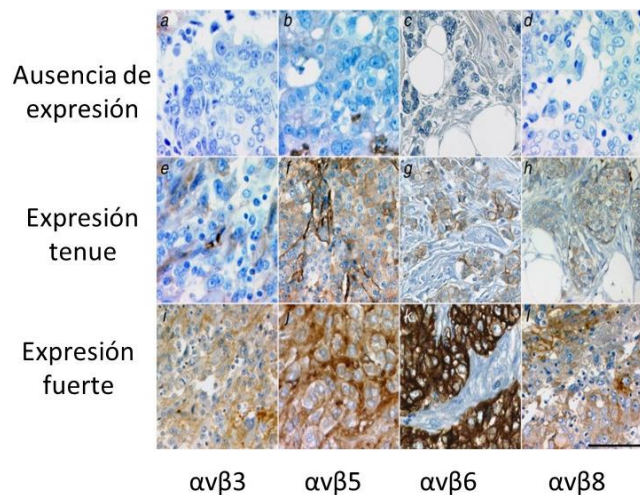
Para analizar la expresión de las diferentes integrinas en los tumores primarios, se consideraron positivos aquellos tejidos en los que había una expresión de la integrina  $\alpha\beta$  tanto débil como fuerte, y como negativos los tejidos con ausencia de expresión de la misma integrina  $\alpha\beta$  (Figura 2). De la misma manera se cuantificó el nivel de expresión de estas integrinas en los tejidos de las metástasis cerebrales.

De todas las integrinas  $\alpha\beta$  analizadas,  $\alpha\beta 5$  mostró un alto nivel de expresión en tumores primarios de mama (97,6%) y en metástasis cerebrales (97,1%). La integrina  $\alpha\beta 6$  se expresaba en el 62,3% de los tumores primarios revisados, y esta expresión se incrementaba en las metástasis cerebrales (82,9%). Las integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 8$  mostraron niveles de expresión más bajos en tumores de mama primarios (0,7% y 8,1% respectivamente), sin embargo su expresión se incrementó de manera muy significativa en las metástasis cerebrales (34,3% y 28,6% respectivamente) (24)(Tabla3).

	$\alpha\beta 3$	$\alpha\beta 5$	$\alpha\beta 6$	$\alpha\beta 8$
Tumores primarios	0,7%	97,6%	62,3%	8,1%
Metástasis cerebrales	34,3%	97,1%	82,9%	28,6%
Incremento	Significativo (p<0.0001)	Sin diferencias significativas	Significativo (p <0.001)	Significativo (p <0.0001)

**Tabla 3.** Expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  en tumores primarios de mama y sus metástasis en cerebro

Por ello, no es de extrañar que ya en 1998 la integrina  $\alpha\beta3$  se considerara como un marcador con importante valor pronóstico y con potencial en la terapia antiangiogénica (25).



**Figura 2.** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de  $\alpha\beta3$  (a, e, i),  $\alpha\beta5$  (b, f, j),  $\alpha\beta6$  (c, g, k) y  $\alpha\beta8$  (d, h, l) en cáncer de mama primario. Primera fila (a–d): sin expresión de integrinas; segunda fila (e–h): expresión débil de integrinas; tercera fila (i–l): expresión fuerte de integrinas. Bar: 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Expresión de las integrinas $\alpha\beta$ en cáncer de pulmón y metástasis cerebral

En CPCNP la integrinas  $\alpha\beta5$  y  $\alpha\beta6$  mostraron los mayores niveles de expresión (67% y 69% respectivamente). Aunque el incremento de expresión se mantuvo en la correspondiente metástasis cerebral en el caso de la integrina  $\alpha\beta5$ , no lo hizo en el caso de la integrina  $\alpha\beta6$  (Tabla 4).

Sin embargo las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta8$  presentaron niveles de expresión bajos en los tumores primarios (13% y 20% respectivamente), pero incrementaron de manera significativa los niveles de expresión en las metástasis cerebrales (23,7% y 36,1% respectivamente).

	$\alpha\beta3$	$\alpha\beta5$	$\alpha\beta6$	$\alpha\beta8$
Tumores primarios	13%	67%	69%	20%
Metástasis cerebral	23.7%	91.2%	66.5%	36.1%
Incremento	Significativo (p <0.05)	Significativo (p <0.05)	Sin diferencias significativas	Significativo (p <0.01)

**Tabla 4.** Expresión de las proteínas  $\alpha\beta$  en CPCNPs y sus metástasis.

### 5.3. Expresión de las integrinas $\alpha\beta$ en melanoma maligno y metástasis cerebral

La integrina  $\alpha\beta5$  mostró el mayor nivel de expresión en los melanomas malignos (88,9%), mostrando junto con  $\alpha\beta3$  un aumento significativo en las respectivas metástasis cerebrales. Sin embargo se mostraron niveles de expresión de la integrina

$\alpha\upsilon\beta 8$  muy similares tanto en melanoma primario como en las metástasis cerebrales (37,5% y 48,4% respectivamente) (Tabla 5).

	$\alpha\upsilon\beta 3$	$\alpha\upsilon\beta 5$	$\alpha\upsilon\beta 6$	$\alpha\upsilon\beta 8$
Tumores primarios	Resultados	88,9%	*	37,5%
Metástasis cerebral	no mostrados	97,8%	*	48,4%
Incremento	Significativo ( $p < 0.001$ )	Significativo ( $p < 0.05$ )		Sin diferencias significativa

\*No se pudo detectar tinción

**Tabla 5.** Expresión de las proteínas  $\alpha\upsilon\beta$  en melanoma maligno y sus metástasis cerebrales.

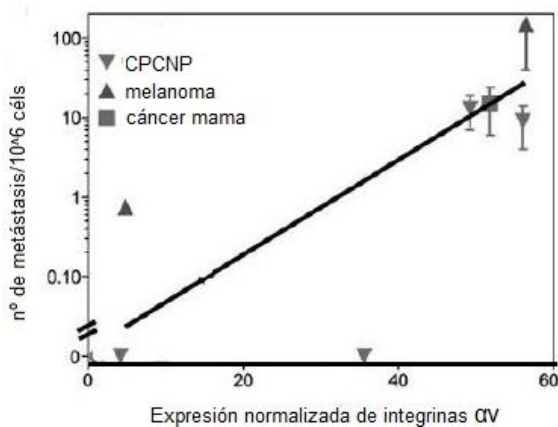
### 5.5. Expresión de las integrinas $\alpha\upsilon\beta$ en cáncer renal y metástasis cerebral

La integrina  $\alpha\upsilon\beta 5$  se expresó frecuentemente en CCR primarios y en sus metástasis cerebrales. La mayoría de los CCR primarios fue negativo para las integrinas  $\alpha\upsilon\beta 3$  y  $\alpha\upsilon\beta 8$ , pero la tinción de  $\alpha\upsilon\beta 3$  y  $\alpha\upsilon\beta 8$  se incrementó con frecuencia en las metástasis cerebrales. Sin embargo, la integrina  $\alpha\upsilon\beta 6$  no mostró diferencias significativas entre el CCR primario y las metástasis cerebrales (Tabla 6).

	$\alpha\upsilon\beta 3$	$\alpha\upsilon\beta 5$	$\alpha\upsilon\beta 6$	$\alpha\upsilon\beta 8$
Tumores primarios	11,5%	89,9%	34,1%	27,4%
Metástasis cerebral	53,9%	92,3%	38,5%	71,2%
Incremento	Significativo ( $p < 0.0001$ )	Sin diferencias significativas	Sin diferencias significativas	Significativo ( $p < 0.0001$ )

**Tabla 6.** Expresión de las proteínas  $\alpha\upsilon\beta$  en CCR y sus metástasis cerebrales.

Además, en un estudio realizado recientemente con 10 líneas celulares procedentes de biopsias de tumores de CPCNP, melanoma y CM, y modelos animales in vivo de metástasis cerebrales, se demostró que la incidencia y el número de formación de



metástasis cerebrales se correlacionó positivamente ( $R^2 = 0,81$ ) con la el nivel celular de integrinas  $\alpha\upsilon\beta$ . Es decir, que la sobreexpresión de las integrina  $\alpha\upsilon\beta$  en células tumorales aumentó la aparición de metástasis cerebrales in vivo (26).

(Figura 3)

**Figura 3.** Relación entre la expresión de integrinas  $\alpha\upsilon\beta$  y el número de metástasis.

## 6. Discusión



La metástasis cerebral procedente de tumores primarios tiene lugar en un alto porcentaje de pacientes: aproximadamente en el 20% de los pacientes con cáncer de pulmón, en el 8% con melanoma maligno y en el 5% con cáncer de mama (26). Además, en los últimos años se ha puesto gran interés en la investigación de la implicación de las integrinas  $\alpha\beta$  en la metástasis.

Tras analizar los resultados observamos, que mientras la integrina  $\alpha\beta 5$  se expresó tanto en tumores primarios como en las metástasis, la expresión de  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 8$  fue más frecuente en metástasis cerebrales que en sus tumores primarios (24). En estudios anteriores, ya se relacionó el aumento de la expresión de  $\alpha\beta 3$  en células tumorales con una mejor migración transendotelial y con la producción de MMP-2, lo que confiere a estas células un alto potencial metastásico (27). Además, la expresión de  $\alpha\beta 3$  conduce a la producción de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), lo que se traduce en un mayor potencial angiogénico (28). En otros estudios se detectó un incremento significativo en la expresión de  $\alpha\beta 3$  en las metástasis en ganglios linfáticos con respecto al tumor primario de mama (72% frente a 56%) (29), lo que sugiere que la expresión de esta integrina se asocia con la progresión de la enfermedad; así como con la metástasis ósea (29). Además, en diversos estudios se afirma que la sobreexpresión de  $\alpha\beta 5$  promueve la invasión y la metástasis (30).

En cuanto al incremento de los niveles de expresión de  $\alpha\beta 6$  en metástasis cerebrales con respecto a los tumores primarios de cáncer de mama, se puede afirmar que esta integrina aumenta la invasividad de las células tumorales, induce resistencia a anoikis, regula la expresión de metaloproteasas de matriz (MMP) y estimula la vía de AKT (31). De la misma manera, el incremento del patrón de expresión de  $\alpha\beta 8$  en las respectivas metástasis cerebrales refleja su papel en la mejora de la funcionalidad del endotelio angiogénico tumoral, confirmando su papel prometastásico (23) y su implicación en la señalización de TGF- $\beta$  y en el desarrollo vascular(32). En las tablas 3, 4 y 6 se puede observar la expresión frecuente de  $\alpha\beta 6$  y  $\alpha\beta 8$  en el cáncer de mama, pulmón y riñón humano.

En conjunto, todos estos datos sugieren que los inhibidores de las integrinas  $\alpha\beta$  (que incluyen los anticuerpos monoclonales y miméticos del péptido RGD) pueden en el

futuro tener potencial como opciones terapéuticas en pacientes con metástasis cerebrales y como indicadores pronóstico en diferentes tipos de cáncer (33).

Los estudios preclínicos mostraron que los antagonistas de integrina inhiben el crecimiento tumoral al afectar tanto a las células tumorales como a las células hospedadoras asociadas a tumores (más notablemente al endotelio angiogénico) (22). Estos estudios han culminado en el inicio de varios ensayos clínicos, entre ellos uno en Fase III en glioblastoma con el cilengitide (mimético del péptido RGD dirigido a los receptores de integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$ ) (34), en combinación con quimio radioterapia estándar. El mecanismo molecular por el cual el cilengitide inhibe el crecimiento del glioblastoma todavía no se conoce completamente, pero puede implicar citotoxicidad directa, anti-angiogénesis y aumento de los efectos radiotóxicos (25). Recientemente, se llevó a cabo otro ensayo en fase I con el cilengitide, en el que se muestran resultados prometedores en CPCNP en estadio III, a pesar de su gran toxicidad (35). Estos interesantes desarrollos enfatizan la necesidad de identificar cómo los antagonistas de integrina influyen en el tumor y su microambiente.

En resumen, observamos un aumento en la expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  (especialmente de  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta8$ ) cuando los tumores primarios de pulmón, mama, riñón y piel metastatizan al cerebro. Lo que sugiere una relación causal entre la expresión de integrina y el proceso metastásico.

## 7. Conclusión

Colectivamente estos datos confirman estudios previos sobre la expresión de las integrinas  $\alpha\beta$  y su correlación con la incidencia y el número de metástasis cerebrales a partir de tumores primarios. Las células que expresan altos niveles de integrinas  $\alpha\beta$ , muestran una tasa de migración mayor que aquellas con bajos niveles de expresión; lo que sugiere que esta familia de integrinas juega un papel crucial en el desarrollo de nuevos tumores cerebrales. Todo ello indica que las alteraciones en el perfil de expresión de determinadas integrinas, su activación, señalización para controlar la proliferación y la supervivencia, son fenómenos que subyacen al crecimiento y la supervivencia de muchos tumores. El avance en el conocimiento del papel de las integrinas en el desarrollo de las metástasis cerebrales y el desarrollo de nuevas terapias

basadas en la influencia de los antagonistas de estas integrinas, contribuirá a mejorar el pronóstico de pacientes con cáncer de mama, pulmón, riñón y melanoma.

## 8. Bibliografía

1. Zúñiga, L.F., Bernal, S.I., Navia, C.A., Saavedra, J.S. (2014) Adhesión celular: el ensamblaje de la vía al cáncer. *Morfología*, 6(2), p9
2. Lodish, H., Berk, A., Zypursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2003). *Biología celular y molecular*. 4th ed. Madrid: Panamericana, pp.199-209.
3. Cooper, G. and Hausman, R. (2008). *La célula*. 7th ed. Madrid: Marbán, p.584;630
4. Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R. and J. Sáez, F. (2007). *Biología celular*. 3rd ed. España: Mcgraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., p.312.
5. Ata, R. and Antonescu, C. (2017). Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), p.189.
6. Campbell, I.D.; Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004994.
7. Caswell, P.T.; Vadrevu, S.; Norman, J.C. (2009). Integrins: Masters and slaves of endocytic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 843–853.
8. De Franceschi, N.; Hamidi, H.; Alanko, J.; Sahgal, P.; Ivaska, J. (2015). Integrin traffic—The update. *J. Cell Sci.*, 128, 839–852.
9. Guo, W.; Giancotti, F.G. (2004). Integrin signaling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826.
10. Chen, H.C.; Appeddu, P.A.; Isoda, H.; Guan, J.L. (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 26329–26334.
11. Xia, H.; Nho, R.S.; Kahm, J.; Kleidon, J.; Henke, C.A. (2004). Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta1 integrin viability signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 33024–33034.
12. Collins, N.L.; Reginato, M.J.; Paulus, J.K.; Sgroi, D.C.; Labaer, J.; Brugge, J.S. (2005). G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5282–5291.
13. Soung, Y.H.; Clifford, J.L.; Chung, J. (2010). Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB Rep.* 43, 311–318.
14. Ridley, A. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, pp.103-112.
15. Frisch, S.M.; Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, pp. 701–706.
16. Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. (2012) AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13, pp. 251–262.
17. Hardie, D.G.; Schaffer, B.E.; Brunet, A. (2016) AMPK: An energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends Cell Biol.*, 26, pp. 190–201.
18. Inoki, K.; Zhu, T.; Guan, K.-L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, pp. 577–590.

19. Jeon, S.-M.; Chandel, N.S.; Hay, N. (2012) AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485, 661–665.
20. Hardie, D.; Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link—Ten years after. *BMC Biol.* 11, pp.36.
21. Prudnikova, T.; Rawat, S. and Chernoff, J. (2014). Molecular Pathways: Targeting the Kinase Effectors of RHO-Family GTPases. *Clinical Cancer Research*, 21(1), pp.24-29.
22. Desgrosellier, J. and Cheresh, D. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), pp.9-22.
23. De, S.; Razorenova, O.; McCabe, NP.; O’Toole, T.; Qin, J.; Byzova, TV. (2005). VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc Natl Acad Sci* 102, pp. 7589–7594.
24. Vogetseder, A.; Thies, S.; Ingold, B.; Roth, P.; Weller, M.; Schraml, P.; et al. (2013).  $\alpha$ v-Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases. *International Journal of Cancer*, 133(10), pp.2362-2371.
25. Weis, S. and Cheresh, D. (2011).  $\alpha$ v Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), pp.a006478-a006478.
26. Jeffrey Wu, Y.; A. Pagel, M.; I. Muldoon, L.; Fu, R. and A. Neuwelt, E. (2017). High  $\alpha$ v Integrin Level of Cancer Cells Is Associated with Development of Brain Metastasis in Athymic Rats. *Anticancer Research*, 37(8).
27. Lorgner, M.; Krueger, JS.; O’Neal, M.; Staflin, K.; Felding-Habermann, B. (2009). Activation of tumor cell integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc Natl Acad Sci*, 106, pp.10666–10671.
28. Desgrosellier, JS.; Barnes, LA.; Shields, DJ.; Huang, M.; Lau, SK.; Prevost, N., et al. (2009). An integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med*, 15, pp.1163–1169.
29. Sloan, EK.; Pouliot, N.; Stanley, KL.; et al. (2006). Tumor specific expression of  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res*, 8.
30. Ricono, JM.; Huang, M.; Barnes, LA.; et al. (2009). Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer Res*, 69, pp.1383–1391.
31. Bandyopadhyay, A. and Raghavan, S. (2009). Defining the Role of Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 in Cancer. *Curr Drug Targets*, 10(7), pp.645-652.
32. Mu, D.; Cambier, S.; Fjellbirkeland, L.; et al. (2002). The integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta$ 1. *J Cell Biol*, 157, pp.493–507.
33. Taherian, A.; Li, X.; Liu, Y. and Haas, T. (2011). Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 11(1).
34. Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. (2010). Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*, 10, pp.753–68.
35. Massabeau, C.; Khalifa, J.; Filleron, T.; Modesto, A.; Bigay-Gamé, L.; Plat, G. and Dierickx, L. (2017). Continuous Infusion of Cilengitide Plus Chemoradiotherapy for Patients With Stage III Non–Small-cell Lung Cancer: A Phase I Study. *Clinical Lung Cancer*, S1525-7304(17), pp.30314-5.