

Diferencias clinicobiológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos clasificados en función de la concentración de ácido hialurónico de la membrana celular

A. Ruibal^{*,**}, J. Arias^{***}, A. Suárez^{****}, M.C. del Río^{*****}, G. Lapeña^{*,**}, J. Schneider^{***,*****} y A. Tejerina^{***,*****}

^{*}Servicio de Medicina Nuclear. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. ^{**}Fundación Tejerina. Madrid. ^{***}Servicio de Cirugía General. Hospital Monte del Naranco. Oviedo. ^{****}Servicio de Cirugía General. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. ^{*****}Servicio de Bioquímica. Hospital de Barbanza. Ribeira. La Coruña. ^{*****}Centro de Patología de la Mama. Madrid.

Resumen

Introducción. El CD44 es una molécula de adhesión celular de la que se conocen una forma estándar (CD44s) y varias isoformas variantes (CD44v) y cuyo principal ligando es el ácido hialurónico (AH), proteoglicano de la matriz extracelular implicado en numerosas acciones biológicas. En este estudio hemos querido analizar la posible influencia de la concentración de AH sobre ciertas propiedades clinicobiológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos.

Pacientes y métodos. Se han determinado en 124 carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos (56 AH positivos [> 1.500 ng/mg de proteína] y 68 AH negativos) las concentraciones citosólicas de receptores de estrógenos (RE), de progesterona (RP), pS2, cathepsina D y activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP). Se ha considerado también el tamaño tumoral, afección ganglionar axilar (N), el grado histológico (GH), ploidía y la fase de síntesis celular (FS).

Resultados. Los tumores AH positivos presentaron menores concentraciones de cathepsina D ($p = 0,013$) que los AH negativos. Asimismo, fueron menos frecuentemente aneuploides ($p = 0,026$), cathepsina D positivos ($p = 0,015$), GH 3 ($p = 0,043$) y proliferativos (FS $> 7\%$; $p = 0,049$).

Conclusiones. Los resultados anteriores sugieren que la concentración de ácido hialurónico en la membrana celular podría asociarse con ciertas propiedades clinicobiológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos.

Palabras clave: Carcinomas mamarios. CD44v5. Ácido hialurónico.

(Cir Esp; 2001; 69: 451-454)

CLINICAL AND BIOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN CD44v5 POSITIVE INFILTRATING DUCTAL CARCINOMAS OF THE BREAST, CLASSIFIED ON THE BASIS OF HYALURONIC ACID CONCENTRATION IN THE CELL MEMBRANE

Introduction. CD44 is a cell adhesion molecule. There is one standard form, CD44s, and many variant isoforms, CD44v; their main ligand is hyaluronic acid, which is a proteoglycan found in the extracellular matrix and is involved in various biological functions. In this study we analyzed whether hyaluronic acid levels in the cell membrane modulated certain clinical and biological features of CD44v5-positive infiltrating ductal carcinomas of the breast.

Patients and methods. We determined 124 patients with CD44v5-positive infiltrating ductal carcinoma of the breast. Of these, 56 were hyaluronic positive ($> 1,500$ ng/mg prot.) and 68 were negative. We measured the cytoplasmic levels of oestrogen receptors, progesterone receptors, pS2, cathepsin D, and tissue-type plasminogen activator. Tumour size, axillary lymph node involvement, histological grade, ploidy and S-phase of cell cycle were also taken into account.

Results. Hyaluronic positive tumors had lower concentrations of cathepsin D ($p = 0.013$) than hyaluronic negative tumors. They were also less frequently aneuploid ($p = 0.026$) and cathepsin D positive ($p = 0.015$), histological grade 3 ($p = 0.043$) and S-phase $> 7\%$ ($p = 0.049$).

Conclusions. Our results suggest that hyaluronic acid concentrations in the cell membrane may be associated with some clinical and biological differences between CD44v5-positive infiltrating ductal carcinomas of the breast.

Key words: Breast tumors. CD44v5. Hyaluronic acid.

Correspondencia: Dr. A. Ruibal Morell.
Laboratorio de Biología Tumoral.
Servicio de Medicina Nuclear. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

Aceptado para su publicación en diciembre del 2000.

Introducción

El CD44 es una molécula de adhesión localizada en la membrana celular e implicada en la interrelación célula-célula y célula-matriz extracelular. Asimismo, este receptor participa en otros procesos biológicos como la movilidad de los linfocitos,

hematopoyesis y apoptosis^{1,2}. Su gen consta de 20 exones, de los cuales los cinco primeros y los cinco últimos son constantes, mientras que el resto está sometido a ciertos procesos (*splicing* alternativos, N-glucosilaciones, O-glucosilaciones, etc.) que determinan la generación de regiones variables e isoformas (CD44v) con un diferente peso molecular³. El ácido hialurónico (AH) es un importante componente de la matriz extracelular y representa el ligando principal del CD44, si bien también pueden unirse a éste otras moléculas como el colágeno, la fibronectina, la condroitín sulfato, la osteopontina, etc.⁴. En el aspecto biológico, el AH promueve la adhesión y migración de las células tumorales, mientras que sus fragmentos estimulan la angiogénesis⁵⁻¹¹.

El CD44 parece estar implicado en la progresión tumoral; estudios recientes han demostrado que esta molécula interviene en dos de las tres etapas del proceso invasivo: la adhesión a la matriz extracelular y la motilidad. Algunos tumores, como los gliomas, expresan exclusivamente la forma estándar del CD44 (CD44s)^{12,13}, mientras que otros, como los de mama, evidencian también formas variantes¹⁴⁻¹⁶. Con respecto a la isoforma v5 (CD44v5) en los carcinomas mamarios, Hefler et al¹⁷ consideran que su expresión citosólica es regulada positivamente durante el proceso de transformación tumoral, no siendo aquella necesaria para obtener el fenotipo metastásico, ni comportándose como un factor pronóstico independiente. Tempfer et al¹⁸ observan que la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue mayor en los casos CD44v5 positivos que en los negativos, careciendo también aquella de valor como factor pronóstico independiente. Nuestro grupo pudo comprobar en un estudio inicial¹⁹ que la positividad para el CD44v5 se asociaba exclusivamente con la de los receptores de progesterona y un tamaño superior a 2 cm.

Dado que el AH es el principal ligando del CD44, que la unión de ambos se relaciona con algunos hechos de la invasión tumoral²⁰ y que no existen trabajos en la bibliografía que consideren simultáneamente ambos parámetros, hemos creído interesante analizar si la concentración de AH de membrana se asociaba a determinadas propiedades clinicobiológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos. La exposición de los resultados obtenidos constituye el objetivo del presente trabajo.

Pacientes y métodos

El grupo de estudio incluyó 124 carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivo (> 3 ng/mg de proteína¹⁹), de los cuales 56 presentaron concentraciones de AH de membrana mayores de 1.500 ng/mg de proteína. Dicha cifra fue considerada como umbral de positividad y corresponde a la mediana de los valores obtenidos previamente con 252 pacientes (intervalo 70,2-6843 ng/mg de proteína). En todos ellos determinamos las concentraciones citosólicas del receptor de estrógenos (RE), progesterona (RP), pS2, catepsina D y activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP). También hemos tenido presente el tamaño tumoral, la afección ganglionar axilar, la ploidía y la fase de síntesis celular.

Una vez recibidas en el laboratorio desde el quirófano las muestras tisulares fueron limpiadas de sus componentes grasos y, posteriormente, congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su homogeneización. Esta última se realizó en un tampón (TRIS 0,01 M, EDTA Na2 0,015 M, 10% glicerol,

TABLA 1. Distribución de los valores de los diferentes parámetros clinicobiológicos en los dos subgrupos de tumores CD44v5 positivos estudiados

Parámetro	AH ⁺		AH ⁻		p
	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	
RE (fmol/mg de proteína)	0,1-1.248	16,1	0,1-482	23,2	NS
RP (fmol/mg de proteína)	0,1-454	98,0	0,1-6.582	28,6	0,087
PS2 (ng/mg de proteína)	0,1-214	6,7	0,1-241	5,2	NS
Catepsina D (pmol/mg de proteína)	15,1-374	36,9	16,6-1.145	49,6	0,013
t-AP (ng/mg de proteína)	0,3-39,1	4,3	0,15-4,0	4,2	NS
Tamaño (cm)	0,2-6,0	2,0	0,4-8,0	2,0	NS

AH: ácido hialurónico.

0,01% monotiglicerol, pH 7,5), en frío y con microdesmembrador (OMNI 1000, Waterbury, CT, EE.UU.). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 800 g durante 10 min y el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 100.000 g durante una hora a 4 °C. El nuevo sobrenadante (citósol) fue utilizado para la determinación de los diferentes parámetros descritos anteriormente. Las técnicas y los límites de positividad fueron los siguientes: RE (EIA. Abbott, EE.UU.; 10 fmol/mg de proteína), RP (EIA. Abbott, EE.UU.; 10 fmol/mg de proteína), pS2 (IRMA-CIS, Francia; 5 ng/mg de proteína), catepsina D (IEMA-CIS, Francia; 50 pmol/mg de proteína), activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP; EIA. Boehringer, Mannheim), AH (AH; RIA. Pharmacia, Suecia) y CD44v5 (EIA. Bender Med System, Austria). La ploidía y la fase de síntesis celular fueron analizadas mediante citometría de flujo (Beckton Dickinson, Fascam) y en muestras en fresco, considerándose como umbrales de positividad valores del 7 y del 14%, que corresponden a las medianas de los tumores diploides y aneuploides, respectivamente. Todos los resultados fueron expresados por mg de proteína, determinada mediante el método de Bradford. El estudio estadístico se realizó mediante el programa BMDP3 y, dado que los diferentes parámetros no siguieron una distribución normal, se han empleado tests no paramétricos, así como el de la χ^2 . Por ello, los valores fueron expresados mediante el intervalo, la mediana y los percentiles 25 y 75. Una diferencia fue considerada significativa cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

Resultados

Como se puede observar en las tablas 1 y 2, los tumores CD44v5 positivos y AH positivo presentaron menores concentraciones de catepsina D (p = 0,013) que los AH negativos. Así mismo, fueron menos frecuentemente aneuploides (p = 0,026), catepsina D positivos (p = 0,015), de grado histológico 3 (p = 0,043) y proliferativos (fase S > 7%; p = 0,049).

Discusión

El CD44v5 pertenece a una familia de moléculas de adhesión implicadas en numerosos procesos biológicos, así como en la tumorigénesis e invasión tumoral. En relación con estos dos procesos, se sabe que promueve el crecimiento y la metastatiza-

TABLA 2. Distribución de los porcentajes de positividad obtenidos con los diferentes parámetros clinicobiológicos en los dos subgrupos de tumores CD44v5 positivos estudiados

Parámetro	AH ⁺	AH ⁻	p
RE ⁺	33/56	46/68	NS
RP ⁺	38/56	37/68	NS
PS2 ⁺	31/56	34/68	NS
N ⁺	28/56	32/68	NS
> 2 cm	26/56	32/68	NS
Aneuploides	14/56	30/68	0,026
GH3 ⁺	12/56	26/68	0,043
Metástasis ⁺	3/56	1/68	NS
Catepsina ⁺	17/56	35/68	0,015
Fase S > 7%	19/56	35/68	0,049
Fase S > 14%	9/56	15/68	NS

AH: ácido hialurónico.

ción, asociándose en estas acciones a ciertas metaloproteasas (MMP9)²¹. También están implicadas la proteincinasa C y la fosfolipasa D², siendo la degradación del AH uno de los efectos más importantes. Así, el CD44 de membrana se une al proteoglicano, lo internaliza y promueve la supervivencia de la célula tumoral. Cuando este proceso se bloquea, se induce la apoptosis de las células tumorales posiblemente porque afecta a su capacidad para penetrar en la barrera que supone el AH^{22,23}. Muchos grupos han estudiado el comportamiento de las diferentes isoformas del CD44, así como de su forma estándar, en los tumores malignos, siendo diferentes los resultados según el tumor y la isoforma considerada. En relación con el CD44v5 en los carcinomas mamarios, los resultados no son homogéneos, aceptándose que no constituye un factor pronóstico independiente. Dado que el AH es el principal ligando del CD44 y que el efecto final parece depender de ambos parámetros^{20,24}, consideramos interesante estudiar si la concentración del proteoglicano en la membrana celular influye en ciertas propiedades clinicobiológicas de los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos.

Pudimos observar que los tumores AH negativos presentaron mayores concentraciones y porcentaje de positividad para la catepsina D, siendo también más frecuentemente aneuploides, indiferenciados y proliferativos. Las concentraciones mayores de la proteasa, junto con la tendencia a presentar cifras menores de RP que rozaron la significación estadística, parecen sugerir un peor comportamiento, como se ha demostrado recientemente con un gran número de pacientes²⁵, pues obvia la posible influencia hormonal en la síntesis de la proteasa. Ello, unido a mayor número de casos aneuploides, con grado histológico 3 y con fase S superior al 7% –parámetros todos ligados a un peor comportamiento²⁶⁻²⁷–, nos sugieren que los carcinomas ductales infiltrantes de mama CD44v5 positivos y AH negativos poseen unas características biológicas indicativas de una mayor agresividad. Asimismo, nuestros hallazgos concuerdan con las observaciones de Knupfer et al²⁰ en los gliomas, quienes demuestran que la adhesión de las células tumorales al AH es mediada por el CD44, pero ello no es suficiente ni único. Posiblemente, la unión CD44-AH y la internalización del proteoglicano sea lo que determine el efecto biológico final. Si ello es así, se podrían explicar ciertas discrepancias en los resultados obtenidos en la bibliografía en relación con el comportamiento y utilidad del CD44v5 considerado aisladamente.

Nuestros resultados nos inducen a considerar que la concentración de AH en la membrana celular parece asociarse a ciertas propiedades clinicobiológicas que podrían incidir en su comportamiento ulterior.

Bibliografía

- Herrera-Gayol A, Jothy S. CD44 modulates Hs5787T human breast cancer cell adhesion, migration and invasiveness. *Exp Mol Pathol* 1999; 66: 99-108.
- Ladeda V, Aguirre Ghiso JA, Bal de Kier Joffe E. Function and expression of CD44 during spreading, migration and invasion of murine carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1998; 242: 515-527.
- Kainz C, Tempfer C. CD44 as a differentiation marker and metastasis promoter in gynecological malignancies. *The Cancer Journal* 1997; 10: 306-309.
- Underhill C. CD44: The hyaluronan receptor. *J Cell Science* 1992; 103: 293-298.
- Kimata K, Honma Y, Okayama M, Oguri K, Hozumi M, Suzuki S. Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res* 1983; 43: 1347-1354.
- Bertrand P, Girard N, Delpech B, Duval C, D'Anjou J, Dauce JP. Hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronectin in the extracellular matrix of breast carcinomas: comparison between invasive and non invasive areas. *Int J Cancer* 1992; 52: 1-6.
- Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G, Iida N, Yudin AI, Cherr GN et al. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. *Cancer Res* 1999; 59: 4464-4470.
- Madan AK, Yu K, Dhurandhar N, Cullinan C, Pang V, Beech DJ. Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness. *Oncol Rep* 1999; 6: 607-609.
- Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2499-2504.
- Victor R, Chauzy C, Girard N, Gionni J, D'Anjou J, Stora De Novion H et al. Human breast-cancer metastasis formation in a nude-mouse model: studies of hyaluronidase, hyaluronan and hyaluronan-binding sites in metastatic cells. *Int J Cancer* 1999; 82: 77-83.
- Till KJ, Zuzel M, Cawley JC. The role of hyaluronan and interleukin 8 in the migration of chronic lymphocytic leukemia cells within lymphoreticular tissues. *Cancer Res* 1999; 59: 4419-4426.
- Ylagan LR, Quinn B. CD44 expression in astrocytic tumors. *Mod Pathol* 1997; 10: 1239-1246.
- Gunia S, Hussein S, Radu DL, Putz KM, Breyer R, Hecker H et al. CD44s-targeted treatment with monoclonal antibody blocks intracerebral invasion and growth of 9L gliosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 221-230.
- Sinn HP, Heider KH, Skroch-Angel P, Von Minckwitz G, Kaufmann M, Herrlich P et al. Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 307-313.
- Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 1995; 345: 615-619.
- Ristamaki R, Joensuu H, Sonderstrom KO, Jalkanen S. CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol* 1995; 176: 259-267.
- Hefler L, Tempfer C, Haeusler G, Kucera E, Mayerhofer K, Seillinger R et al. Cytosol concentrations of CD44 isoforms in breast cancer tissue. *Int J Cancer* 1998; 79: 541-545.
- Tempfer C, Losch A, Heinzl H, Hausler G, Hanzal E, Kolb H et al. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2023-2025.
- Núñez MI, Arias JJ, Del Río MC, Martínez MI, Alba A, Allende MT et al. Cell surface CD44v5 levels correlate with progesterone receptors and a tumor size > 2 cm in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Int J Biol Markers* 1996; 11: 220-222.
- Knupfer MM, Poppenborg H, Hostfilder M, Kuhnelt K, Wolff JE, Domula M. CD44 expression and hyaluronic binding of malignant glioma cells. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 71-76.

21. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999; 13: 35-48.
22. Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med* 1997; 186: 1985-1996.
23. Hitzemen J, Woost PG, Hosick HL. Correlation of hyaluronic acid accumulation and the growth of preneoplastic mammary cells in collagen: a longitudinal study. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28: 284-292.
24. Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* 1994; 160: 275-286.
25. Foekens JA, Look MP, Bolt-De Vries J, Meijer-Van Gelder ME, Van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-307.
26. Witzig TE, Ingle JN, Cha SS, Schaid DJ, Tabery RL, Wold LE et al. DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994; 74: 1752-1761.
27. Mink D, Von Tongelen B, Villena-Heisen C, Heiss C, Schmidt W. Breast cancer and prognostic factors. Tumor size, degree of differentiation, proliferation kinetics and expression of steroid hormone receptors. *Eur J Gynaecol Oncol* 1994; 15: 424-436.