



## Fas (CD95) su determinación y densidad de expresión en muestras de glioblastoma multiforme de pacientes del occidente de México

Guevara-Barraza MG<sup>a,c</sup>, Domínguez-Rodríguez JR<sup>a,d</sup>, Ramos-Huizar NP<sup>b</sup>, Bravo-Cuellar A<sup>a,e</sup>

### Resumen

#### Introducción

El Glioblastoma multiforme es el tumor maligno más frecuente del sistema nervioso central, representa del 12 al 15 % de las neoplasias malignas intracraneales, sólo el 10% de los pacientes sobrevive a los dos años del inicio del tratamiento. Uno de los mecanismos que participa en la apoptosis y pudiese ser un blanco terapéutico, es el Fas (CD95) y su ligando. Por esa razón, se estudió la presencia de Fas en muestras de pacientes de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara, Jalisco, México.

#### Material y Métodos

Se realizó un estudio de tipo retrospectivo, descriptivo, que incluyó 20 muestras de bloques de tejido fijado en formaldehído e incluidos en parafina de glioblastoma multiforme, que corresponden al 100 % de los casos de dos años. Se determinó Fas mediante inmuno-histoquímica, así mismo, mediante análisis de imágenes se determinó su densidad (porcentaje del área en que se expresa).

#### Resultados

Fueron 12 muestras de pacientes masculinos y 8 femeninos con un rango de edad de 38 a 78 años, media de 56.4 años. La localización tumoral en 10 pacientes fue frontal, en 9 fue temporal y en un solo paciente en los núcleos de la base. El 90% (n = 18) de las muestras fueron positivas para Fas, su presencia fue más importante en el rango de edad de 50 a 59 años sin importar su localización, la densidad de expresión de Fas fue de 0 a 54.5 % con una media de 26.1±15.4%.

#### Discusión

Se confirma la expresión de Fas en glioblastoma multiforme, sin embargo el hecho de que no fuera positivo en 2 pacientes y el amplio rango de porcentaje del área en que se expresa, podrían limitar su utilización como nueva estrategia terapéutica.

**Palabras clave:** *Fas (CD95), Glioblastoma Multiforme.*

<sup>a</sup> División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, MX.

<sup>b</sup> UMF53, IMSS, Guadalajara, Jal. MX.

<sup>c</sup> Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud CUCCS, Universidad de Guadalajara.

<sup>d</sup> Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, MX.

<sup>e</sup> Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tepatitlán de Morelos, MX.

#### Autor para correspondencia

Alejandro Bravo Cuellar, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jal. México.

Tel 36170060 Ext. 31924

Contacto al correo electrónico:  
abrvoc@prodigy.net.mx.

# Determination and expression density of Fas (CD95) in Glioblastoma Multiforme samples from western Mexico patients

## Abstract

### Introduction.

Glioblastoma Multiforme is the most common malignant tumor of the central nervous system. It accounts for 12 to 15% of the malignant intracranial neoplasms. Only 10% of the patients live more than two years after treatment is started. Fas (CD95) and its ligand targets one of the mechanisms involved in cellular apoptosis. Due to this fact we studied the presence of Fas in patients of a Specialized Unit at Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social in Guadalajara, México

### Material y Methods.

This is a retrospective, descriptive study. A total of 20 formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue block samples of glioblastoma multiforme represent 100% of the cases registered during two years. Fas was determined by immunohistochemistry. Its density and percentage of area expressed was determined by image analysis.

### Results.

12 samples belonged to men and 8 belonged to women. The age ranged between 38 to 78 years, median 56.4 years. The tumors were located in the frontal lobe in 10 patients, temporal lobe in 9 patients and basal nuclei in 1 patient. 90% ( $n=18$ ) of the samples were positive to Fas and they were more common among people between 50 to 59 years old, without localization pattern. Fas expression density ranged from 0 to 54.5, median 26.1+15.4%.

### Discussion.

We confirmed the expression of Fas in glioblastoma multiforme. The fact that Fas was absent in two patients and the wide percentage range of the area where it is expressed may limit its usefulness as a new therapeutic strategy.

**Key Words:** Fas (CD95), Glioblastoma Multiforme

## Introducción

El glioblastoma multiforme es el tumor maligno más frecuente del sistema nervioso central, representa del 12 al 15% de las neoplasias malignas intracraneales, y el 50-60% del total de los tumores astrocíticos. En adultos 90% de los gliomas se localiza en los hemisferios cerebrales, mientras que en niños el sitio más común es el tallo cerebral. La punta de incidencia es la edad media de la vida, siendo 2 veces más común en hombres que en las mujeres.<sup>1,2</sup>

Los glioblastomas multiformes se clasifican en primarios y secundarios, en el primer caso son aquellos que se desarrollan *de novo*, es decir que desde un inicio son glioblastomas, son los más frecuentes representando del 60 al 80 % y son más comunes en adultos <60 años. Los secundarios son aquellos que se desarrollan a partir de una desdiferenciación de un astrocitoma de menor grado (grado II o III anaplásico) y son más frecuentes en personas menores de 45 años.<sup>3,4</sup>

Mediante estudios histopatológicos y moleculares se ha determinado que los gliomas grado IV y los glioblastomas presentan características como necrosis e intensa proliferación microvascular que no se encuentran en el astrocitoma anaplásico ni en el oligodendrogloma anaplásico.<sup>5,6</sup> Se trata de un tumor altamente maligno muy infiltrante que puede alcanzar un enorme tamaño antes de que llame la atención médica. Menos de un quinto de los pacientes sobreviven al año del comienzo de los síntomas y

sólo el 10% a los dos años del inicio del tratamiento.<sup>7,9</sup>

Un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan este tipo de tumor permiten explorar nuevas posibilidades de tratamiento dado que la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía son ineficaces, recientemente se han propuesto nuevos esquemas terapéuticos fundamentados en Inmunología celular y molecular. Así pues se ha intentado la administración de células dendríticas, inmunización con ácidos nucleídos de doble cadena entre otros.

En este sentido resulta altamente interesante la apoptosis o muerte celular programada la cual depende de la síntesis de proteínas *de novo* y de la activación de factores bioquímicos como resultado de una modificación del balance a favor de la expresión de genes proapoptóticos sobre los genes antiapoptóticos. Las células sometidas a la apoptosis muestran fragmentación internucleosómica del ADN, seguido de alteraciones morfológicas nucleares y celulares, lo que conduce a una pérdida de la integridad de la membrana y la formación de cuerpos apoptóticos. Todos estos procesos están mediados por caspasas, que son las principales enzimas que actúan como iniciadores de la apoptosis y efectores.<sup>10,11</sup>

Entre los mecanismos que disparan la apoptosis se encuentra el Fas y su ligando (FasL) pertenecientes a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, la interacción de este receptor y su ligando es capaz de inducir apoptosis en células blancas. De hecho el FasL actúa como

molécula efectora de células T contra células tumorales. Se trata de una glicoproteína unida a membrana de tipo I que pertenece a la familia de los receptores TNF/*nerve growth factor receptor*. La porción extracelular es muy similar a otros receptores de la misma familia del TNF tales como TNF $\alpha$ , CD30 ligando, CD40 ligando, linfoxin y TRAIL (del inglés TNF-related apoptosis induced ligand) que es el más parecido al FasL.<sup>12-15</sup>

El ligando de Fas se expresa en una gran variedad de células, timo, hígado, corazón, riñón, LT activados, células del SNC entre otros. Induce apoptosis caspasa dependiente, estas enzimas son proteasas de cisteína, algunas como la 8 y 9 se consideran iniciadoras o activadoras de otras caspasas como la caspasa 3 considerada la ejecutora de apoptosis. Cuando FasL se une a su receptor en la superficie de la célula, se acopla a la proteína adaptadora FADD en el dominio intracelular. FADD posteriormente se une a la caspasa 8 la cual activa la apoptosis por dos vías: por activación directa de la caspasa efectora -3 -6 -7 o por una segunda vía conocida como intrínseca, en la que la caspasa 8 se une a una proteína Bid la cual interacciona con la membrana mitocondrial induciendo perdida del potencial de membrana y liberación de Citocromo C, moléculas Smac/Diablo, AIF las cuales junto con la caspasa 9 forman un complejo molecular denominado apoptosoma el cual activa a la caspasa 3 directamente induciendo la apoptosis.<sup>12-15</sup>

En la literatura hay poca información acerca de la expresión de Fas en células de glioblastoma, en un estudio realizado en Francia mediante PCR-RT donde reportan 100% de expresión en 9 casos positivos a Fas, en un segundo estudio los mismos autores usando los primeros casos ampliaron la muestra a 15 encontrando positividad en 87%.<sup>16</sup> Por otra parte Laterra exponiendo *in vitro* una línea celular de glioblastoma multiforme humano a estrés oxidativo demostró que estas células presentan una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por la vía de Fas/FasL,<sup>17</sup> por lo que en el presente trabajo se postula que la expresión de estas moléculas puede variar de población en población y de que existe posibilidad de manipular el FAS/FasL con fines terapéuticos, conociendo su expresión y su densidad celular.

## Material y Métodos

Se realizó un estudio de tipo retrospectivo, descriptivo, que incluyó 20 muestras de bloques de tejido fijado en formaldehido e incluidos en parafina, de pacientes adultos de ambos sexos con diagnóstico confirmado de glioblastoma multiforme, que corresponden al 100 % de los casos de dos años (2006-2007) operados en la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS en Guadalajara, MX. El control negativo corresponde a tejido cerebral de una muestra de paciente al cual se practicó lobectomía por otras razones.

Para realizar la immunohistoquímica se siguió la técnica recomendada por el fabricante, con ligeras modificaciones: Cortes de 4 a 6  $\mu$  se colocaron en laminillas con carga positiva, se procedió a desparafinar con xylol/10 minutos por tres ocasiones, se hidrataron las muestras con un lavado enxylol/alcohol 1:1 por 10 minutos, seguido de dos lavados

en etanol al 100 % durante 10 minutos para continuar con otros dos lavados por 10 minutos en etanol al 95 % y finalmente se lavó en una ocasión con buffer fosfato salino (PBS). Se desenmascararon los epítopes exponiendo las muestras a buffer de citrato con Tween-20 al 0.1 % al 95 °C por 5 minutos. Se inactivaron las peroxidasas endógenas durante 10 a 20 minutos mediante un baño con H<sub>2</sub>O 2 al 1 % en PBS + 40 cc de metanol, aforado a 500 cc con PBS 1 X y se lavó al final con agua desionizada, y se incubaron con suero bloqueador al 1.5 % + PBS durante una hora. Al término de la incubación se aplicó el anticuerpo primario durante 12 horas al término de las cuales se lavaron las laminillas con PBS en 3 ocasiones por 10 minutos., para luego proceder a colocar el anticuerpo conjugado con avidina- biotina durante 30 minutos, se lavaron las laminillas en 3 ocasiones con PBS por 5 minutos. Se incubaron las laminillas en substrato de peroxidasa durante 30 segundos a 10 minutos. Para revelar el anticuerpo se utilizó 10 mg de diaminobencidina en 15 cc de H<sub>2</sub>O desionizada contenido 3 % de H<sub>2</sub>O 2 durante 10 minutos. Se corroboró al microscopio y posteriormente se lavó con agua desionizada en tres ocasiones, se deshidrataron las muestras y se observaron al microscopio.

**Análisis estadístico:** Los resultados expresan la media de cada observación, se reporta únicamente estadística descriptiva.

Las imágenes se analizaron por microscopia y se realizó el procedimiento descrito por Toprack y col.<sup>18</sup> Se utilizaron dos programas de cómputo: GIMP® (GNU Image Manipulation Program) e Image J®. ambos programas están disponibles en Internet.

GIMP es un programa de manipulación de imágenes distribuido gratuitamente por la fundación GNU y cuyo funcionamiento es similar a Adobe Photoshop®. ImageJ® es distribuido gratuitamente por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH). Sirve para el análisis de imagen asistida por computadora. Cuenta con una amplia capacidad para analizar una amplia variedad de imágenes, desde estudios radiológicos, geles de agarosa, imágenes en 3D y por supuesto inmunohistoquímica.

Primeramente se seleccionan áreas de imágenes de 762 X425 y se salvan a una resolución de 300 dpi., mediante las herramientas de color, se realiza el contraste de tal forma que solo resalten las áreas positivas y se ajustan las áreas de color para trasformar la imagen en blanco y negro. A continuación se fotografían al menos 5 campos de cada laminilla a una resolución de 1000X y se digitalizan las imágenes a una resolución de 1200x1200 dpi y son transformadas a JPG. En este punto se emplea el programa ImageJ®, con el cual se procede a realizar el análisis de las áreas positivas para obtener su porcentaje.

Se reporta únicamente estadística descriptiva, reportándose tendencias de medida central como la media ± desviación estándar (SD) y porcentajes de las observaciones.

## Resultados

En relación a las características demográficas de los pacientes, de las 20 muestras estudiadas 12 de ellas fueron del sexo masculino que corresponden al 60 % de la población

Tabla 1. Características de la muestra

Caso	Sexo	Edad (años)	Evolución (meses)	Localización	Expresión de Fas	Área que expresa Fas %
1	M	67	4	Frontal	Positivo	33.2
2	F	48	6	Temporal	Positivo	41.2
3	M	55	3	Frontal	Positivo	38.43
4	F	69	7	Frontal	Positivo	9.96
5	M	75	5	Temporal	Positivo	11.8
6	F	38	7	Temporal	Negativo	0
7	M	44	3	Núcleos de la base	Positivo	12.3
8	M	64	8	Frontal	Positivo	28.5
9	F	78	5	Temporal	Positivo	33.7
10	M	69	6	Frontal	Positivo	47.1
11	F	48	6	Frontal	Positivo	17.3
12	M	58	4	Temporal	Positivo	21.6
13	M	59	2	Temporal	Positivo	36.3
14	F	63	3	Temporal	Positivo	13.6
15	M	47	5	Frontal	Positivo	23.9
16	M	56	8	Frontal	Positivo	34.8
17	M	57	5	Temporal	Positivo	43.1
18	F	46	6	Frontal	Positivo	54.5
19	F	48	7	Temporal	Positivo	21.3
20	M	39	7	Temporal	Negativo	0

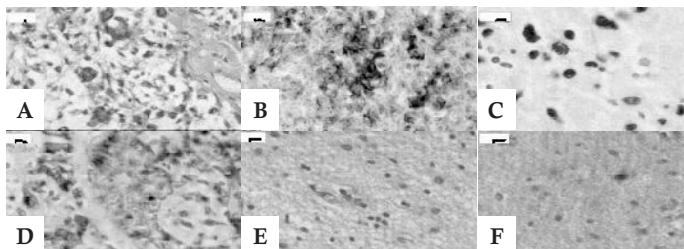
estudiada, mientras que 8 femeninos, que representan el 40 % de la población de estudio. Obteniéndose una relación masculino:femenino de 1.5:1. En cuanto al rango de edad fue  $56.4 \pm 11.6$  años y con un rango de 38 a 78 años de edad (Tabla 1).

En cuanto a las características del tumor 10 casos presentaron localización frontal (50%), 9 casos de localización temporal (49%) y uno en núcleos de la base (1%). El tiempo de evolución al momento del diagnóstico fue de  $5.35 \pm 1.75$  meses con un rango de 2 a 8 meses.

La edad juega un papel importante, obteniéndose la mínima expresión en el rango de edad de 30 a 39 años donde ninguno de los dos casos incluidos en este segmento fueron positivos, sin embargo en el rango de edad de 40 a 49 años fue

expresado por seis pacientes mostrando positividad para Fas de  $22.6 \pm 16.1$  %. El máximo porcentaje de células positivas para Fas se encontró en el rango entre 50 y 59 años ( $n = 5$ ) con  $36.3 \pm 8.02$  %, posteriormente una tendencia del porcentaje de células que expresan Fas disminuye con la edad, así pues el segmento etario de 60 a 69 años ( $n = 5$ ) presenta  $28.5 \pm 15.1$  % de células con marca positiva para Fas y finalmente en el grupo de 70 a 79 años de edad si mostró una reducción en la n pues solo hubo 2 pacientes en este grupo y mostraron  $22.8 \pm 5.4$  % de células positivas.

De las 20 muestras que se analizaron, 18 resultaron positivas para Fas, lo cual representa un 90% de positividad. En relación al análisis del área positiva las 18 muestras obtuvieron un área media de  $26.14 \pm 15.4$  % con rango que



**Figura 1.** Inmunohistoquímica; A Control negativo, tejido cerebral de pacientes lobotomizados por otras razones, B Control positivo, C y D muestras positivas, las áreas marrón indican la presencia de Fas, E y F muestras de pacientes que no expresaron Fas.

varió de 0 a 54.50 %. Estos resultados sugieren que solo una parte del tumor resulta positiva (Figura 1).

## Discusión

El control de la apoptosis es una opción de evidente utilidad en cancerología, por lo que el estudio de Fas resulta imprescindible. En el presente trabajo confirmamos por histoquímica la presencia de Fas en 18 de un total de 20 muestras de pacientes con glioblastoma, siendo consistente con lo reportado en series similares, la única diferencia en nuestra población es que 90% fueron positivos para Fas frente a 27% reportado en el estudio de Guevara, esta diferencia se puede explicar debido a que en este estudio se incluyeron pacientes con un rango de edad de 0 a 80 años y nosotros de 20 años en adelante.<sup>19</sup> Sin embargo nuestras observaciones están de acuerdo con las de Tachibana y col., quienes reportan positividad para la expresión de Fas en 13 de 15 pacientes (86%).<sup>16-20</sup>

En relación a la edad en nuestra serie observamos una tendencia en campana siendo el grupo etario de 50-59 años de edad el punto máximo de expresión de Fas y disminuye hacia ambos extremos de la curva, lo que sugiere que la edad puede influir en la expresión de este receptor de muerte. Un hecho importante es que Sawhney en 2006 reporta que en linfocitos TCD8+ periféricos la expresión de Fas aumenta con la edad y nuestra observación con el glioblastoma es al contrario, ya

que varios tumores expresan también el ligando y pueden inducir apoptosis en células del sistema inmune, que de hecho es un mecanismo considerado de escape tumoral.<sup>21-22</sup>

Por otra parte es importante remarcar que los dos casos negativos que observamos en el presente estudio correspondieron a los pacientes más jóvenes, respecto a esto vale la pena mencionar que en estos pacientes es más frecuente que se trate de glioblastoma secundario,<sup>3,4</sup> por lo que sería interesante ampliar la muestra para ver si efectivamente existen diferencias de expresión de Fas entre el glioblastoma primario y secundario, porque esta situación podría ser una limitante para la utilización terapéutica de Fas.

Una nueva aportación presentada en este trabajo es que se determinó el área de expresión de Fas, la ventaja del método que empleamos originalmente reportado por Toprak y cols, es que este método nos permite pasar de un estudio cualitativo a uno cuantitativo.<sup>18</sup> Resultando que el área con marca positiva para Fas es muy variable yendo desde 0 hasta 54.5 % indicando la heterogeneidad que existe en las células de un mismo tumor.

En la actualidad la posible utilización terapéutica de Fas fue puesta de manifiesto por Weller quien trabajando con células cultivadas con glioma reporta que estas son susceptibles a la apoptosis mediada por Fas, más recientemente en un modelo de ratas con células de la línea 36B10 de glioma maligno que expresan Fas fueron tratadas con células transfectadas con células que expresaban el FasL obteniendo un 75 % de supervivencia de estos animales, lo que resulta alentador, sin embargo, debemos tomar en consideración dos hechos importantes, no todos los pacientes expresan Fas y que gracias a la metodología utilizada observamos que la expresión de este receptor en un mismo tumor es muy variable por lo que se requeriría algo más que una simple manipulación para que este tipo de terapéutica pueda ser efectivo en humanos.<sup>23,24</sup>

En conclusión la utilización de Fas con fines terapéuticos convendría al menos en un primer tiempo considerarla como una terapia adyuvante.

## Referencias bibliográficas

- 1.Omuro A, DeAngelis LM.: Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013; 310(17): 1842-1850.
- 2.Lefranc F, Kiss R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia*. 2008; 10(3): 198-206.
- 3.Ohgaki H, Kleihues P.: Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007; 170(5): 1445-1453.
- 4.Lee KS, et al: Immunohistochemical Classification of Primary and Secondary Glioblastomas. *Korean J Pathol*. 2013; 47(6): 541-548.
- 5.- Kalkanis SN, et al. Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections. *J Neurooncol*. 2014; 116(3): 477-485.
- 6.Rao SA, et al. A 16-gene signature distinguishes anaplastic astrocytoma from glioblastoma. *PLoS One* 2014;9(1): e85200
- 7.Kmiecik J, et al. Combining NK cells and mAb9.2.27 to combat NG2-dependent and anti-inflammatory signals in glioblastoma. *Oncimmunology*. 2014; 3(1): e27185.
- 8.- Weil RJ. Incorporating molecular tools into early-stage clinical trials. *Plos Med*. 2008; 5(1): e21.
- 9.- Lefranc F, Kiss R. The Sodium Pump α1 Subunit as a Potential Target to Combat Apoptosis-Resistant Glioblastomas. *Neoplasia*. 2008; 10(3): 198-206.
- 10.-Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
- 11.Lerma-Díaz JM, et al. In vivo and in vitro sensitization of leukemic cells to adriamycin-induced apoptosis by pentoxifylline. Involvement of caspase cascades and IκB phosphorylation. *Immunology Letters* 2006; 103: 149-158.
- 12.Aguilar-Lemarroy A, et al. Apoptosis induction in Jurkat cells and sCD95 levels in women's sera are related with the risk of developing cervical cancer. *BMC Cancer* 2008; 11(8): 99-111.
- 13.Lavrik I, Golks A, Kramer PH: Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005, 118: 265-267.
- 14.- Fas Sc, et al. Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmune* 2006; 9:1-17.
- 15.-Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 29-55.
- 16.- Tachibana O, et al. Expression of Fas/Apo-1 during the progression of Astrocytomas. *Cancer Res*. 1995; 55: 5528-5530.
- 17.Xia S, Rosen EM, Laterra J. Sensitization of glioma cells to Fas-dependent apoptosis by chemotherapy induced oxidative stress. *Cancer Res*. 2005; 65(12): 5248-55.
- 18.Toprak AB, et al. Computer assisted analysis of peroxidase stained endometrial tissue. *Turk J Med Sci* 2006; 36: 285-290.
- 19.Guevara-Donde JE. Incidencia de gliomas malignos en derechohabientes del IMSS residentes en el estado de Veracruz, México. *Arc Neurocienc* 2004; 9: 80-84.
- 20.Tachibana O, et al. Preferential expression of Fas/APO-1 (CD95) and apoptotic cell death in perinecrotic cells of glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 1996; 92: 431-434
- 21.- Sawhney M, et al. Age related changes in Fas (CD95) and Fas ligand gene expression and cytokine profiles in healthy Indians. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2006; 24(1): 47-56.
- 22.Töpfer K, et al. Tumor Evasion from T Cell Surveillance. *J Biomed Biotechnol*. 2011; DOI: 10.1155/2011/918471.
- 23.- Weller M, et al. Fas APO-1 gene transfer from human malignant glioma. *Cancer Research* 1995; 55(13): 2936-2944.
- 24.Frankel B, et al. Tumor Fas (APO-1/CD95) up-regulation results in increased apoptosis and survival times for rats with intracranial malignant gliomas. *Neurosurgery* 2001; 49: 168-175.