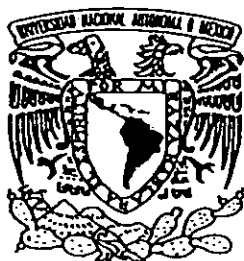


63

2es.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"DETERMINACION DE u-PA, u-PAR Y COMPLEJO ATP-PAI-1 EN
CITOSOL TUMORAL Y PLASMA DE PACIENTES CON CANCER
DE MAMA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA TERESA RICO RODRIGUEZ

ASESORES DE TESIS. DR. JOSE GONZALEZ LLAVEN
Q.F.B. AURORA GARCIA MANZANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

259444



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación de u-PA, u-PAR y complejo ATP-PAI-1 en citosol tumoral y plasma de pacientes con cáncer de mama.

que presenta la pasante: María Teresa Rico Rodríguez
 con número de cuenta: 8511171-6 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan izcalli. Edo. de Méx., a 12 de noviembre de 1997

PRESIDENTE	<u>Dr. José González Llaven</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>Q.F.B. Ramón Cedejas Ramírez</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Antonio Sánchez Ortega</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha P. Campos Peón</u>	<u>[Firma]</u>

DEDICATORIAS.

A Dios:

Por el maravilloso regalo que me dio: Mis Padres

A mis Padres: Candelaria y Enrique.

Con todo mi amor y agradecimiento

A mis abuelitos: Cayetana y Manuel.

Gracias por el cariño y protección que siempre
me brindaron.

A tía Jose:

Aunque ahora estas con Dios, tu recuerdo
Siempre estará en mi corazón.

A mis hermanos: Alejandro, Elizabeth, Manuel y Roxana.

Gracias por su cariño y apoyo.

A mis tíos: Carmen, Rocío, José Manuel y Concepción

Por ser sobre todo mis amigos.

AGRADECIMIENTOS.

A la Q.F.B. Aurora García Manzano.

Gracias por apoyarme y guiarme en la realización de este trabajo, pero principalmente por brindarme su amistad y confianza.

Al Dr. José González Llaven.

Gracias por la confianza que deposito en mí para realizar este trabajo.

A los Doctores:

César Bacelis, Manuel García Cebada, Patricia Bahena Reséndiz
Ismael Vázquez, Rafael Paredes y Alvar Loria.

Por su colaboración en la realización de este proyecto.

Gracias.

FALTA PAGINA

No. 1

INDICE.

	Hoja
1.0. Índice de tablas	3
2.0. Glosario	4
3.0. Resumen	5
4.0. Introducción	7
5.0. Objetivo	20
6.0. Hipótesis	21
7.0. Material y Métodos	22
7.1. Pacientes y Métodos	22
7.1.1. Criterios de inclusión	22
7.1.2. Criterios de exclusión	22
7.1.3. Análisis estadístico	23
7.2. Material	23
7.2.1. Material	23
7.2.2. Aparatos	25
7.2.3. Reactivos	25
7.3. Recolección y Procesamiento de muestras.	27
7.3.1. Plasma.....	27
7.3.2. Muestra de tumor	28
7.4. Cuantificación de u-PA.....	29
7.5. Cuantificación de u-PAR.....	30
7.6. Cuantificación del complejo ATP-PAI-1....	30
8.0. Resultados	32
8.1. u-PA	32
8.2. Complejo ATP-PAI-1.....	35
8.3. u-PAR	37
9.0. Discusión	39
10.0. Conclusiones	47
11.0. Bibliografía	48

1.0. INDICE DE TABLAS.

	Hoja
Tabla 1. Características moleculares de los componentes del sistema fibrinolítico.....	8
Tabla 2. Concentración de u-PA en plasma.....	33
Tabla 3. Concentración de u-PA en citosol.....	34
Tabla 4. Concentración del complejo ATP-PAI-1 en plasma.....	35
Tabla 5. Concentración del complejo ATP-PAI-1 en citosol	36
Tabla 6. Concentración de u-PAR en plasma.....	37
Tabla 7. Concentración de u-PAR en citosol.....	38

2.0 GLOSARIO.

aa.	Aminoácidos
Ac.	Anticuerpos
ATP ó t-PA	Activador tisular de plasminógeno
ATP-PAI-1	Complejo activador tisular de Plasminógeno / inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1
b-FGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
HMWK	Cinínógenos de alto peso molecular
HRP	Peróxidasa de rábano
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
OPD	Orthofenilendiamina
PAI-1	Inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1
PAI-2	Inhibidor de activador de plasminógeno tipo 2
PAI-3	Inhibidor de activador de plasminógeno tipo 3
PAI-4	Inhibidor de activador de plasminógeno tipo 4
pro-uPA ó scu-PA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa de cadena sencilla
TMB	Perborato / 3,3',5,5' tetrametilbenzidina
u-PA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa
u-PAR	Receptor de activador de plasminógeno tipo urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

3.0. RESUMEN.

Recientes investigaciones (2,4,7) sugieren que componentes del sistema fibrinolítico tales como la plasmina, u-PA, ATP, PAI-1 y PAI-2 participan directamente en los procesos de metástasis e invasión de la célula tumoral en diversos tipos de cáncer como el de mama, colon, próstata, pulmón y cerebro (3,6,21,22) . En estos estudios se ha encontrado una correlación entre el incremento de las concentraciones de u-PA, u-PAR y PAI-1 tanto en citosol como en extracto tumoral con un acortamiento en el período de recaída, debido a tales hallazgos varios investigadores proponen a estos componentes del sistema fibrinolítico como factores independientes de pronóstico; dentro de los tipos de cáncer mencionados, el de mama se encuentra dentro de los tres primeros lugares de causas de muerte por neoplasia en la mujer, con base en lo anteriormente mencionado se decidió realizar este estudio en el cual determinamos las concentraciones de u-PA, u-PAR y complejo ATP-PAI-1 en citosol tumoral y plasma en un grupo de 22 pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos I y II y como control un grupo de 16 pacientes con tumores benignos de mama del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional "La Raza".

En plasma no encontramos diferencia significativa entre los dos grupos evaluados de ninguno de los tres factores fibrinolíticos que determinemos; en citosol de tumores malignos obtuvimos una concentración promedio de u-PA de 0.78 ng/mg de Prot. con un rango de 0.24 - 1.32 ng/mg Prot.; y en benignos una concentración promedio de 0.036

ng/mg Prot. con un rango de 0.006 - 0.066ng/mg Prot. comparandolos, la diferencia fué estadísticamente significativa con una $p=0.02$; en cuanto al complejo ATP-PAI-1 la concentración promedio en tumores malignos fue 1.25ng/mg Prot. con un rango de 0.063 - 1.87 ng/mg Prot. y en benignos una concentración promedio de 0.51 ng/mg Prot. con un rango de 0.25 - 0.77 ng/mg Prot. la diferencia entre ellos fue significativa con una $p=0.05$ y en u-PAR no encontramos diferencia estadísticamente significativa aunque observamos valores un poco más altos en el grupo de tumores malignos respecto al grupo control, sin embargo no es posible dar una conclusión definitiva ya que el número de muestras fue pequeño (n "malignos" = 15, n "benignos" =7) para definir esto sugerimos aumentar el número de muestras y además realizar la determinación de u-PAR en extracto tumoral.

El incremento de los parámetros evaluados no fué homogéneo en las pacientes con cáncer de mama y fue independiente del estadio de la enfermedad, en base a esto y tomando en cuenta los hallazgos en otros trabajos de investigación sobre el importante papel que tienen los componentes del sistema fibrinolítico en los procesos de metástasis e invasión tumoral fue posible estratificar a las pacientes según el marcador que incrementaron para realizar una proyección a futuro de la probable evolución de estas pacientes, para corroborar lo anterior este estudio queda abierto a seguimiento a largo plazo de las pacientes con cáncer de mama en un período de tiempo propuesto de 5 años, hasta la fecha las pacientes tienen entre 10 - 19 meses sin recaída.

4.0. INTRODUCCION.

El cáncer de mama se encuentra dentro de los tres primeros lugares de causas de muerte por neoplasia en la mujer. En México el último informe estadístico de 1992 realizado por el sector salud y la seguridad social (INEGI) reporta una morbilidad de 6260 casos de cáncer de mama con 2493 casos nuevos y una mortalidad de 2559 (1). Se ha demostrado por investigaciones (2,3,4,5,6,7,8) que la mortalidad en este tipo de cáncer esta relacionada a la capacidad de la célula tumoral a invadir y metastatizar, hallándose evidencia de que en estos procesos multifactoriales se requiere la acción de varias enzimas proteolíticas dentro de los cuales estan involucrados componentes del sistema fibrinolítico (plasmina; activador de plasminógeno tipo urocinasa "u-PA"; receptor de activador de plasminógeno tipo urocinasa "u-PAR"; inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 "PAI-1" y activador tisular de plasminógeno "ATP") (9,10,11), dicho sistema fisiológicamente forma parte del mecanismo hemostático. La hemostasia es un mecanismo de amplificación encargado de detener un proceso hemorrágico por lesión a un vaso e incluye la regeneración del mismo evitando su oclusión; en este proceso participan: el endotelio vascular, las plaquetas, el mecanismo de coagulación y el de fibrinólisis (12). El mecanismo fibrinolítico tiene como finalidad limitar el tamaño del trombo y destruirlo una vez que el vaso ha sido reparado. Las características más importantes de los componentes moleculares de este mecanismo se enlistan en la tabla No. 1.

Tabla 1 Características moleculares de los componentes del sistema fibrinolítico.

NOMBRE	P.M.	CADENA	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA	VIDA MEDIA
PLASMINOGENO	88,000 (Glu-1) 83,000 (Lys-77)	Sencilla	2.4 mM (21 mg/dl)	2.2 días 0.8 día
PLASMINA	88,000 (Glu-1) 83,000 (Lys-77)	Doble	Cero	0.1 día
ACTIVADOR TISULAR DE PLASMINOGENO (ATP)	70,000	Sencilla ó doble	5 - 10 Mg/lit	5 min
ACTIVADOR DE PLASMINOGENO TIPO UROCINASA DE CADENA SENCILLA (scu-PA)	54,000	Sencilla	5-10 Mg/lit	5 min.
UROKINASA (UK)	54,000 33,000	Doble		10 min
ALFA-DOS-ANTIPLASMINA	70,000	Sencilla	1 nM	2.6 días
INHIBIDOR DE ACTIVADOR DE PLASMINOGENO TIPO 1 (PAI-1)	50,000	Sencilla	0.1 - 1.3	

La fibrinólisis puede llevarse a cabo fisiológicamente de dos maneras: intravascular y pericelularmente; a continuación en la figura No. 1 se esquematiza el sistema fibrinolítico

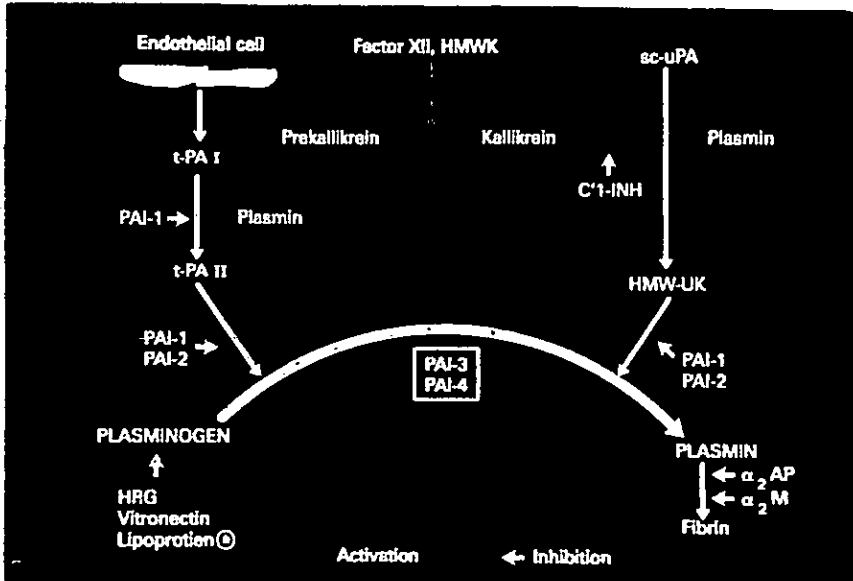


Fig. No.1: sistema fibrinolítico. Siglas: t-PA (Activador Tisular de Plasminógeno); scu-PA (Activador de Plasminógeno Tipo Urocinasa de cadena sencilla); HMW-UK (Activador de Plasminógeno Tipo Urocinasa de cadena doble); PAI-1 (Inhibidor de Activador de Plasminógeno tipo 1); PAI-2 (Inhibidor de Activador de Plasminógeno tipo 2); PAI-3 (Inhibidor de Activador de plasminógeno tipo 3); PAI-4 (Inhibidor de Activador de Plasminógeno tipo 4).

En la fibrinólisis intravascular el activador más importante es el activador tisular de plasminógeno (ATP) derivado del endotelio vascular; que al igual que el plasminógeno y el inhibidor específico de la plasmina (alfa-dos-antiplasmina) tienen gran afinidad a la fibrina por poseer sitios críticos de enlace a lisina (dominio finger del ATP; kringles 1,2,3,4 del plasminógeno) favoreciendo de esta manera la activación del plasminógeno a plasmina (enzima central del mecanismo de fibrinólisis) y también su regulación. El ATP de cadena sencilla es fácilmente convertido en una molécula de cadena doble por fragmentación del enlace peptídico Arg-278-Ile-279 llevado a cabo por plasmina, exhibiendo en su cadena pesada el sitio activo serinoproteasa, este activador es liberado a la circulación por estímulos como: ejercicio, oclusión venosa e inyecciones de ciertas drogas vasoactivas (acetilcolina, vasopresina, histamina, bradiquinina); una vez liberado se enlaza a la fibrina o bien pasa a la circulación y es inhibido por su inhibidor natural PAI-1; el ATP enlazado a la fibrina fragmenta al plasminógeno en el enlace Arg-560-VAL-561 para convertirlo en la enzima proteolítica plasmina la cual se encarga de fragmentar a la fibrina polimerizada a monómeros de fibrina (fragmentos X,Y,D y E) y en circulación al fibrinógeno así como los factores V y VIII de la coagulación; el ATP también se produce en cultivo de células de melanoma, células HeLa, células transformadas en cultivo, células del endotelio vascular normal y por técnicas de DNA recombinante (12,13,14).

La fibrinólisis pericelular es iniciada por los factores de contacto de la coagulación cuando el subendotelio activa el F XII a F XIIa, este a su vez activa la precalicreína que se encuentra unida a su cofactor HMWK a calicreína, siendo esta última la que convierte el activador de plasminógeno tipo urocinasa de cadena sencilla (pro-uPA) a una molécula de cadena doble que es la forma activa (fragmentación del enlace peptídico Lys-158-Ile-159) dicha conversión también se puede llevar a cabo por plasmina (13,15). El u-PA de cadena doble activa el plasminógeno a plasmina por fragmentación del enlace peptídico Arg-560-Val-561 del Glu-1-plasminógeno ó del Lys-77-plasminógeno para producir Glu-1-plasmina y Lys-77-plasmina respectivamente, esta activación del plasminógeno se produce a nivel pericelular mediada por el receptor específico de u-PA que se encuentra en la membrana celular (u-PAR) y esta relacionada en procesos biológicos tales como la remoción de tejido necrosado y remodelación tisular. La urocinasa (UK) de cadena doble fue aislada por primera vez en forma purificada a partir de orina humana, pero varios activadores de plasminógeno tipo urocinasa también se han identificado en plasma humano, cultivo de células endoteliales, macrófagos, células de riñon normales y transformadas, en órganos fetales en crecimiento y en diversos tumores y líneas celulares malignas, también se ha obtenido por técnicas de DNA recombinante (12,16).

El u-PA existe en cuatro formas moleculares importantes: pro-uPA es la forma que se encuentra en el plasma y es producida por las células; u-PA de alto peso molecular; u-PA de bajo peso molecular que es producto de fragmentación del anterior, y un complejo de alto peso molecular formado cuando se une a su inhibidor; en la figura No. 2 se muestra la molécula de pro-uPA.

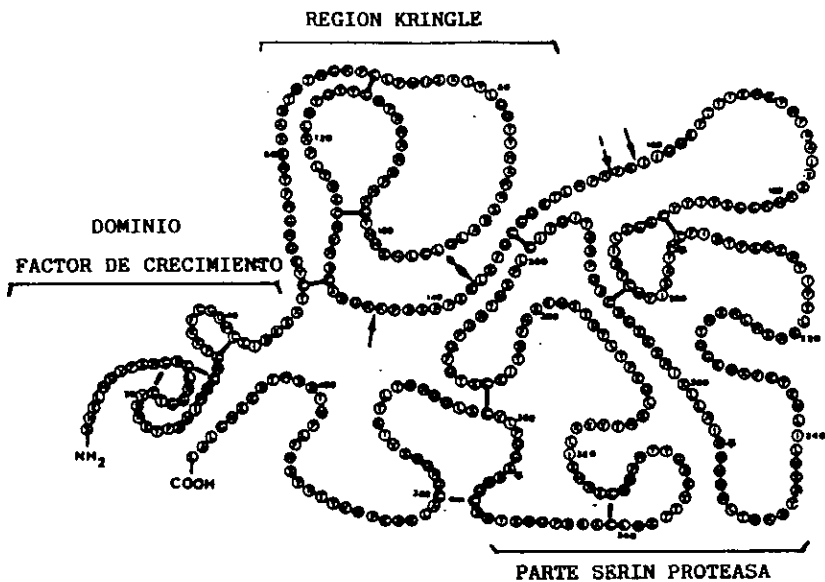


Fig. No. 2: molécula de pro-uPA en la cual se muestra el dominio factor de crecimiento, la region kringle y la parte serinproteasa.

El gen que codifica para la expresión de u-PA se localiza en el cromosoma 10. El u-PA de cadena doble está formado por una cadena ligera (A) con una secuencia de 158 aminoácidos (aa) y una cadena pesada (B) de 253 aa ambas enlazadas por un puente disulfuro; un análisis de la secuencia primaria de pro-uPA permite la distinción de tres dominios:

- * El dominio de factor de crecimiento epidérmico.- la secuencia N-terminal de 1 a 48 muestra cierta homología con el factor de crecimiento epidérmico.
- * El dominio kringle.- pro-uPA contiene un kringle sencillo (secuencia 49-131) el cual tiene gran homología con los dos kringles de ATP y los cinco kringles del plasminógeno.
- * El dominio serinproteasa.- esta porción tiene 253 aa y muestra una importante homología con la cadena B de ATP (45%), plasmina (35%) y calicreína (33%). Los tres residuos activos son His-240, Asp-255 y Ser-356 (12).

La activación del sistema fibrinolítico es regulada por inhibidores naturales (inhibidores de proteasas) estos pueden regular la producción de plasmina al formar complejos inactivos con los activadores de plasminógeno ó bloqueando la actividad de plasmina también por formación de complejos (12). Los inhibidores de activadores de

plasminógeno son los siguientes: el inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es sintetizado en las células endoteliales, el hepatocito, células del músculo liso y también se encuentra almacenado en los granulos alfa de las plaquetas reacciona con el ATP de una y dos cadenas y con u-PA de cadena doble formando complejos inactivos 1:1 pero no reacciona con u-PA de cadena sencilla (12,17,18); el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 2 (PAI-2) este ha sido purificado a partir del tejido de placenta y es también producido por monocitos/macrófagos inhibe eficientemente al u-PA y ATP ambos de cadena doble, reacciona muy lentamente con ATP de cadena sencilla y no tiene ninguna reacción con u-PA de cadena sencilla (17,19); la proteasa-nexina 1 es un inhibidor de alta especificidad de serinproteasas semejantes a tripsina se sintetiza en los fibroblastos, células miocárdicas y células epiteliales del riñon, se expresa en la superficie de la célula que la produce y al formarse el complejo proteasa nexina-enzima éste se introduce en ella (17); por último el inhibidor de C1 el cual es una antiserinproteasa que inhibe la actividad del primer componente del complemento, calicreína, factores de la coagulación XIa, XIIa y plasmina (12).

Los inhibidores de la plasmina son en orden de importancia los siguientes: la alfa-dos-antiplasmina es el inhibidor más rápido de la misma y se sintetiza en el hígado, inactiva de forma irreversible a la plasmina formando un complejo bimolecular estable, el enlace entre ambos es influenciado por la disponibilidad de sitios de enlace a lisina sobre la plasmina debido a esto la plasmina en solución es más rápidamente inhibida que aquella que se encuentra unida a fibrina; la alfa-dos-macroglobulina es el segundo inhibidor

fisiológico en importancia , ante una activación intensa del sistema fibrinolítico si la alfa-dos-antiplasmina se consume antes de que toda la plasmina circulante pueda ser neutralizada, la alfa-dos-macroglobulina tiene un papel importante neutralizando el exceso de plasmina formando complejos inactivos plasmina/alfa-dos- macroglobulina; el último inhibidor es la glicoproteína rica en histidina que es un inhibidor competitivo del plasminógeno reduciendo la unión de éste a la fibrina (12).

Recientemente se ha incrementado el interés sobre la participación de los componentes del sistema fibrinolítico pericelular en el proceso de invasión tumoral y metástasis, esto se basa en la necesidad de la célula neoplásica migrante a moverse a través de la barrera de la matriz extracelular circundante, este proceso se realiza por proteólisis de las proteínas que la constituyen como son: colágena, láminina, fibronectina, elastina, vitronectina y fibrinógeno (11); se cree que la metástasis se lleva a cabo en varias fases: 1) desprendimiento de las células malignas a partir de la masa tumoral original, 2) disolución de las membranas basales subtumorales y de la matriz del tejido conectivo intersticial circundante, 3) movimiento a través de linfa o vasculatura, 4) migración por medio de las membranas basales, por ejemplo: la membrana basal endotelial y 5) desarrollo de una masa tumoral en un lugar distante secundario (20). En varios trabajos de investigación tanto in vivo como in vitro se ha demostrado el importante

desempeño que tienen los componentes del sistema fibrinolítico en el proceso de proteólisis extracelular, estos son en orden de importancia: u-PA, u-PAR, PAI-1 y ATP.

Respecto al u-PA se ha demostrado una sobre expresión de este en líneas celulares neoplásicas y en tumores malignos de mama, colon, próstata, pulmón, páncreas y cerebro en donde induce proteólisis de la matriz al activar al plasminógeno y a otras enzimas proteolíticas secretadas en forma latente como el grupo de las metaloproteinasas las cuales son activadas principalmente por plasmina (3,5,6,20,21,22,23). Por otra parte, el u-PA tiene un receptor específico (u-PAR) que es una proteína con un peso molecular aproximado de 55 a 60 KD enlazada a la membrana plasmática celular através del glucosil-fosfatidilinositol (GPI), se encuentra normalmente en monocitos, fibroblastos, placenta (24,25) y además en una gran variedad de líneas celulares de origen neoplásico así como en varios tumores malignos como el de mama, colon, pulmón, próstata, a continuación en la figura No. 3 se presenta el esquema de la estructura de u-PAR:

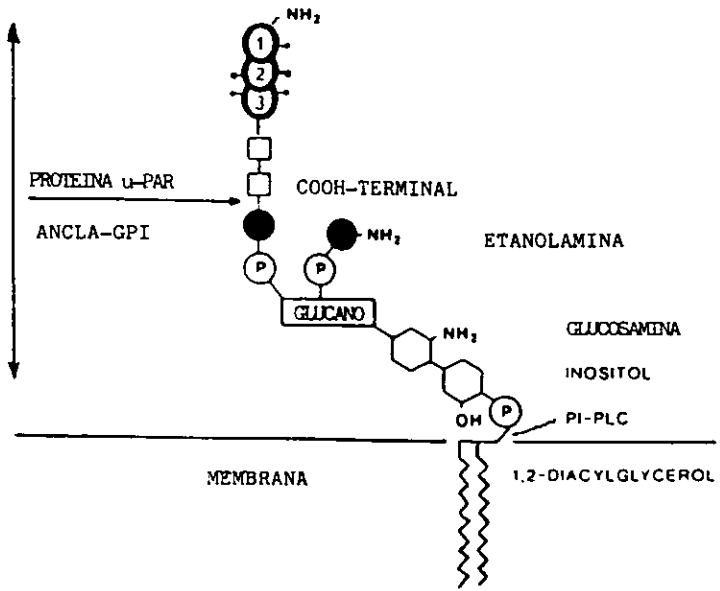


Fig. No. 3: estructura de u-PAR donde se observa su enlace a la membrana celular através del GPI.

Actualmente se sugiere que el u-PAR capacita a la célula tumoral a ejercer una proteólisis focal y direccional de la matriz extracelular, siendo el sitio de conversión de pro-uPA a u-PA de cadena doble potenciando la proteólisis de la matriz extracelular circundante al tumor (26,27). El PAI-1 participa en : la neutralización de los activadores de plasminógeno en células tumorales, inhibición de la fragmentación de la matriz extracelular dependiente de plasmina y tiene un importante papel en la protección del estroma tumoral de la autofragmentación (20,22).

Dentro de las investigaciones realizadas para determinar la relación entre la concentración de los componentes del sistema fibrinolítico y la malignidad tumoral en diversos tipos de cáncer están los siguientes estudios: Del Vecchio S. y colaboradores encuentran que los carcinomas de mama tienen 19 veces más u-PA que los tumores benignos (malignos: 32.9 ± 7.2 ng/mg Prot., benignos: 1.7 ± 0.4 ng/mg Prot. cuantificados por ELISA) y 5 veces más u-PAR (malignos: 31.38 ± 4.32 na/mg Prot. , benignos: 6.48 ± 1.2 ng/mg Prot., "estudio inmunohistoquímico") (6); en el estudio realizado por Landau B y colaboradores en tumores malignos de cerebro (glioblastoma multiforme) encuentra que el u-PA y el PAI-1 están significativamente elevados (u-PA: 2.86 ± 3.01 ng/mg Prot., PAI-1: 8.19 ± 5.57 ng/mg Prot., cuantificados por ELISA) en comparación con muestras de cerebro normal donde fueron indetectables (22); Takeuchi Y. y colaboradores evaluaron la expresión de u-PA, PAI-1 y ATP en 97 carcinomas pancreáticos donde reportan que el u-PA se expresó en 76 (78%), el PAI-1 en 80 (82.5%)

y el ATP en 8 (8.2%) especímenes diagnosticados clínicamente, utilizando un método de inmunotinción (20). En todos estos estudios la alta concentración de u-PA, u-PAR y PAI-1 en el tumor, esta relacionada a un acortamiento en la supervivencia libre de enfermedad y por lo tanto a un pronóstico desfavorable para el paciente; en el caso particular del cáncer de mama se sugiere que estos tres componentes del sistema fibrinolítico pueden ser factores independientes de pronóstico para identificar pacientes con alto riesgo de recaída.

Debido a todo lo anteriormente mencionado y no habiendo hasta la fecha ningún reporte de un estudio de este tipo en la población mexicana se decidió realizar éste, determinando marcadores de fibrinólisis en citosol tumoral y plasma de pacientes con cáncer de mama diagnosticadas clínicamente en estadios tempranos I y II de acuerdo al criterio T N M (tamaño del tumor, estado nodular y extensión general) de la población atendida en el Hospital de Gineco Obstetricia del Centro Médico Nacional "La Raza" con el objeto de corroborar la información reportada en otros trabajos de investigación para establecer a futuro su importancia en el criterio temprano de manejo terapéutico de estas pacientes.

5.0. OBJETIVO.

Determinar si existe diferencia en los niveles de marcadores de actividad fibrinolítica: activador de plasminógeno tipo urocinasa (u-PA), receptor de activador de plasminógeno tipo urocinasa (u-PAR) y complejo activador tisular de plasminógeno/inhibidor de activador de plasminógeno tipo-1 (ATP-PAI-1) en citosol de tejido tumoral y plasma entre un grupo de pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos I y II comparado contra un grupo control de pacientes con tumores benignos.

6.0. HIPOTESIS.

Verdadera:

Los niveles de u-PA, u-PAR y complejo ATP-PAI-1 se encuentran elevados tanto en citosol tumoral como en plasma de pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos I y II en comparación con un grupo control.

Nula:

Los niveles de u-PA, u-PAR y complejo ATP-PAI-1 no se encuentran incrementados en citosol tumoral y plasma de pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos I y II en comparación a un grupo control.

7.0. MATERIAL Y METODOS.

7.1. Pacientes y métodos.

Se realizó un estudio descriptivo, comparativo, abierto y prospectivo. Se incluyeron pacientes con sospecha de cáncer de mama que ingresaron al servicio de Oncología del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico Nacional "La Raza" tomando en cuenta los criterios que a continuación se enlistan.

7.1.1. Criterios de inclusión.

- * Diagnóstico histopatológico de cáncer de mama.
- * Estadio clínico I y II.
- * No haber recibido previamente quimioterapia y/o radioterapia.

7.1.2. Criterios de exclusión.

- * Dificultad técnica en la toma de muestras.
- * Fragmento de tumor con un peso menor a 100 mg.

Además se incluyeron pacientes con diagnóstico de fibroadenoma mamario (tumor benigno) como grupo control.

El periodo de recolección de las muestras se realizó en la fecha del 12-VIII-95 al 4-XI-96.

7.1.3. Análisis estadístico.

La prueba estadística que se utilizó para el análisis de resultados fue el análisis de varianza ANOVA.

7.2. Material.

7.2.1. Material.

- * Mortero
- * Cronómetro
- * Tubos de plástico con tapón de rosca de 50 ml
- * Papel parafilm

- * Barras magnéticas
- * Agitador magnético
- * Hielera
- * Tubos de ensaye
- * Tubos ependorf
- * Cubetas de plástico para lector de ELISA
- * Matraz aforado de 1 lit.
- * Matraz aforado de 50 ml
- * Pipeta automática de 1 ml
- * Pipeta automática de 200 microlitros
- * Pipeta automática multicanal de 200 microlitros
- * Pipeta graduada de 10 ml
- * Pipeta graduada de 1 ml
- * Puntas para pipeta automática de 1 ml y 200 microlitros

* Gradilla

* Trombotubos

* Pipetas pasteur

7.2.2. Aparatos.

* Refrigerador (4°C)

* Congelador (-80°C)

* Lector para placa de ELISA

* Balanza analítica

* Centrífuga

* Ultracentrífuga

7.2.3. Reactivos.

* Kit ELISA u-PA (American Diagnostica Inc.)

* Kit ELISA u-PAR (American Diagnostica Inc.)

* Kit ELISA complejo t-PA-PAI-1 (Stago)

* Tritón 100-X

* Ac. clorhídrico

* Ac. fosfórico

* Alcohol etílico absoluto

* Colorante azul Serva

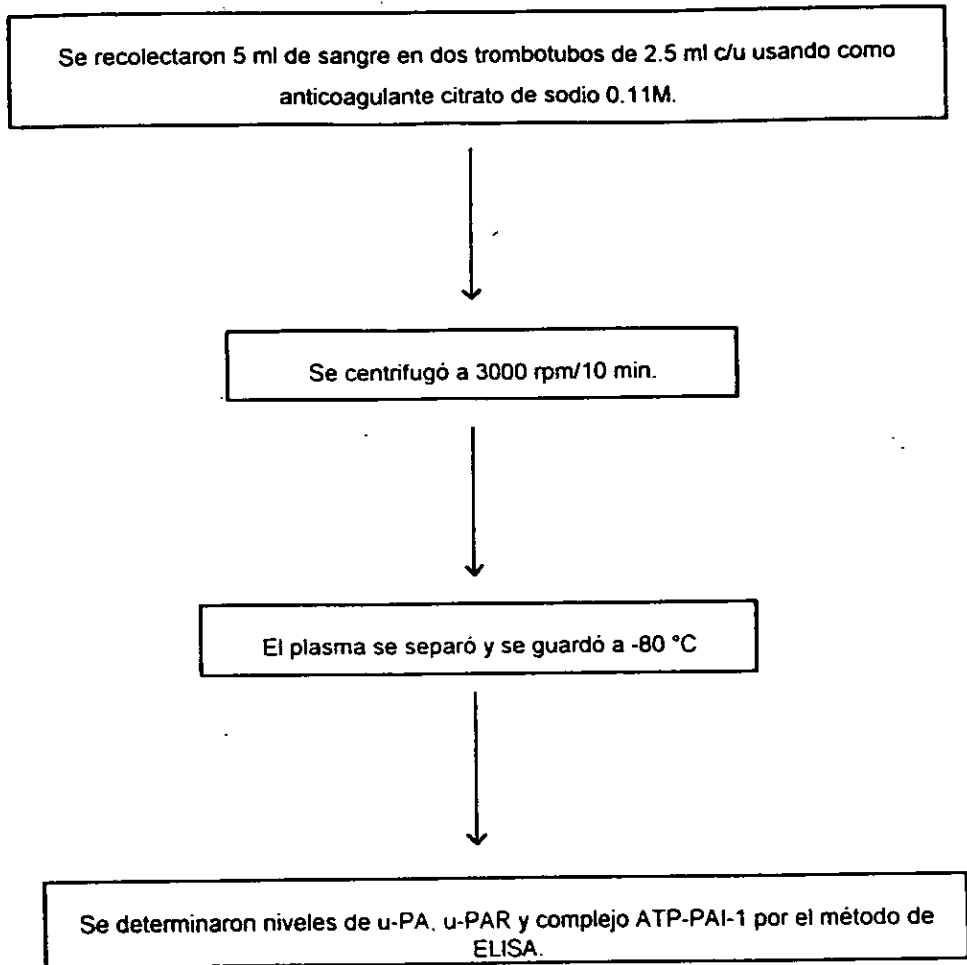
* Sal tris-(hidroximetil)-aminometano

* Albúmina estándar

* Citrato de sodio 0.11 M

7.3. Recolección y procesamiento de muestras.

7.3.1. Plasma.



7.3.2. Muestra de Tumor.

Se recolectó una muestra de tumor de mama maligno (estadio clínico I y II) o benigno (Fibroadenoma) y se colocó rápidamente en hielo (cada muestra se recolectó durante la cirugía excisional).



Se eliminó la grasa y se hizo un corte para obtener una muestra de 100 a 300 mg.



Se congeló inmediatamente a -80°C .



La muestra congelada fue pulverizada rápidamente en un mortero previamente enfriado a -80°C / 15 min.



A la muestra pulverizada se le adicionó 9.8 ml de TBS (Buffer Tris salino) y 0.2 ml de Tritón X-100 al 10%.



Se agitó 12 hrs. a 4°C y se ultracentrifugó a $100\,000\text{ Xg}$ / 60 min a 4°C



El sobrenadante se separó y se congeló a -80°C



Se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Bradford y se ajustó a $2\text{-}3\text{mg Prot. / ml}$ con TBS.



Se determinó la concentración de $\alpha\text{-PA}$, $\alpha\text{-PAR}$ y complejo ATP-PAI-1 por el método de ELISA

La determinación de u-PA, u-PAR y complejo ATP-PAI-1 en plasma y citosol se realizó por el método de ELISA con equipos comercialmente disponibles.

7.4. Cuantificación de u-PA. ..

Esta prueba se fundamenta en el empleo de un anticuerpo (Ac) monoclonal contra el u-PA humano, utilizado como anticuerpo de captura. Las muestras se incuban en micropozos recubiertos, un segundo Ac biotinilado reconoce las moléculas de u-PA enlazadas. Por adición de un conjugado enzimático con peróxidasa de rábano (HRP) se completa la formación del complejo de detección anticuerpo-enzima. La adición del substrato perborato/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y su reacción con HRP desarrolla un color azul; la sensibilidad se incrementa agregando ácido sulfúrico para detener la reacción, formándose un color amarillo. Los niveles de u-PA se cuantifican midiendo la absorbancia a 450 nm e interpolando el valor en una curva estándar.

El u-PA se cuantificó utilizando dos equipos de diferente lote, con un equipo se evaluaron 7 pacientes con tumores malignos y 9 con tumores benignos haciendo una dilución del citosol 1:10 y de plasma 1:20, con el otro equipo se evaluaron 15 pacientes con tumores malignos y 7 con tumores benignos haciendo una dilución del citosol 1:2 y de plasma 1:5.

7.5. Cuantificación de u-PAR.

Esta prueba emplea un anticuerpo policlonal de conejo contra el u-PAR humano como Ac de captura. Las muestras se incuban en micropozos recubiertos, un segundo Ac biotilado reconoce las moléculas de u-PAR enlazadas. Por adición de un conjugado enzimático con peróxidasa de rábano (HRP) se completa la formación del complejo de detección anticuerpo-enzima. La adición del sustrato perborato/3,3',5,5-tetrametilbenzidina (TMB) y su reacción con HRP desarrolla un color azul; la sensibilidad se incrementa agregando ácido sulfúrico para detener la reacción, formandose un color amarillo. Los niveles de u-PAR se cuantifican midiendo la absorbancia a 450 nm e interpolando este valor en una curva estándar.

u-PAR sólo se evaluó en 15 pacientes con tumores malignos y 9 con tumores benignos.

7.6. Cuantificación del complejo ATP-PAI-1.

Se utiliza una placa de plástico recubierta con un anticuerpo monoclonal de ratón (anti ATP humano), que al incubarse con las muestras, enlaza los complejos ATP/PAI-1 a la placa através del determinante antigénico de ATP. Se adiciona otro Ac conjugado a una peróxidasa y se enlaza reconociendo el epítoto de PAI-1 formando así un "sandwich". La peróxidasa enlazada se revela por su actividad en un tiempo determinado sobre su

sustrato (OPD) en presencia de peróxido de hidrógeno, produciendo un cambio de color que es directamente proporcional a la concentración del complejo ATP-PAI-1 inicialmente presente en la muestra. Para calcular la concentración se debe medir la absorbancia a 492 nm e interpolar el valor en una curva estándar.

El complejo ATP-PAI-1 se evaluó en 22 pacientes con tumores malignos y 16 con tumores benignos.

8.0. RESULTADOS

8.1. u-PA.

En las tablas 2 y 3 se reporta la concentración de u-PA en plasma y citosol respectivamente de un grupo de mujeres con cáncer de mama en estadios tempranos I y II y otro de mujeres con tumores benignos, ambos grupos fueron comparados utilizando el análisis de varianza ANOVA hallándose una diferencia estadísticamente significativa del contenido de u-PA en citosol con una $p=0.02$, una concentración promedio en tumores malignos ($n=22$) de $\bar{X}=0.78$ ng/mg Prot. con un rango de 0.24 a 1.32 ng/mg Prot. y en benignos una ($n=16$) una $\bar{X}=0.036$ ng/mg Prot. con un rango de 0.006 - 0.066 ng/mg Prot.

Respecto al plasma no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos: $p=0.5$, una concentración promedio de u-PA en plasma de mujeres con tumores malignos de una $\bar{X}=0.56$ ng/ml con un rango de 0.49 - 0.63 ng/ml y en plasma de mujeres con tumores benignos una $\bar{X}=0.52$ ng/ml con un rango de 0.35 - 0.69 ng/ml.

Es importante mencionar que para realizar el análisis estadístico en el plasma el tamaño de las muestras se redujo a una $n=16$ pacientes con cáncer de mama y una $n=6$ pacientes con tumores benignos, esto se debió a que los plasmas se evaluaron con dos equipos de diferente lote y con diferentes diluciones. Con un equipo se evaluaron 7 muestras de pacientes con cáncer de mama y 9 de pacientes con tumores benignos usando una dilución 1:20 siendo la concentración de u-PA indetectable a esta dilución por lo cual se tomó la decisión de trabajar el resto de las muestras a una dilución 1:5 con el otro equipo, en donde sí fue posible cuantificar el u-PA en plasma. Para eliminar el error de haber usado dos diluciones diferentes sólo se tomaron en cuenta los datos obtenidos con la última dilución.

TABLA 2. CONCENTRACIÓN DE u-PA EN PLASMA.

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	u-PA (ng / ml)	PACIENTE No.	u- PA (ng /ml)
EQUIPO No. 1			EQUIPO No. 1	
1	II B	0.0	1	0.0
2	II B	0.0	2	0.0
3	II B	0.0	3	0.0
4	II B	0.0	4	0.0
5	II B	0.0	5	0.0
6	II B	0.0	6	0.0
7	----	0.0	7	0.0
EQUIPO No. 2			8	0.0
8	II B	0.48	9	0.0
9	I B	0.47	EQUIPO No. 2	
10	II A	0.74	10	----
11	II B	0.42	11	0.65
12	II A	0.55	12	0.56
13	II B	0.76	13	0.70
14	II B	0.79	14	0.50
15	II A	0.66	15	0.25
16	II B	0.48	16	0.44
17	II B	0.57		
18	II B	0.48		
19	II B	0.37		
20	II A	0.51		
21	II B	0.43		
22	I A	0.66		

n= 15

$\hat{x}=0.56$

Rango: 0.49 - 0.63 ng/ml

p=0.5

n= 6

$\hat{x}= 0.52$

Rango: 0.35 - 0.69ng/ml

p=0.5

TABLA 3. CONCENTRACIÓN DE u-PA EN CITOSOL.

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	u-PA(ng/mg Prot)	PACIENTE No.	u-PA(ng/mg Prot)
EQUIPO No. 1			EQUIPO No. 1	
1	II B	0.0	1	0.0
2	II B	5.3	2	0.0
3	II B	0.0	3	0.0
4	II B	0.0	4	0.0
5	II B	1.3	5	0.0
6	II B	1.4	6	0.0
7	---	1.55	7	0.0
EQUIPO No. 2			8	0.0
8	II B	0.05	9	0.0
9	I B	0.22	EQUIPO No. 2	
10	II A	0.08	10	0.16
11	II B	2.4	11	0.04
12	II A	0.84	12	0.05
13	II B	0.04	13	0.16
14	II B	1.55	14	0.07
15	II A	0.10	15	0.05
16	II B	0.09	16	0.04
17	II B	0.10		
18	II B	0.20		
19	II B	0.25		
20	II A	1.60		
21	II B	0.14		
22	I A	0.06		

n = 22

\bar{x} = 0.78

Rango: 0.24 - 1.32 ng/mg Prot.

ρ = 0.02

n = 16

\bar{x} = 0.036

Rango: 0.006 - 0.66 ng/mg Prot.

ρ = 0.02

8.2. Complejo ATP-PAI-1.

(*n* malignos = 22, *n* benignos = 16). En plasma (tabla 4) no se encontró diferencia estadísticamente significativa del contenido de este complejo entre ambos grupos: se obtuvo una *P* = 0.16, una concentración promedio en plasmas de mujeres con tumores malignos de \bar{x} = 0.16 ng/ml con un rango de 0.89 - 1.23 ng/ml y en plasmas de mujeres con tumores benignos una \bar{x} = 0.88 ng/ml con un rango de 0.69 - 1.07 ng/ml. Por otra parte en el citosol de tejido tumoral si hubo diferencia estadísticamente significativa con una *p* = 0.05, una concentración promedio en tumores malignos de \bar{x} = 1.25 ng/mg Prot. con un rango de 0.63 - 1.87 ng/mg Prot. y en benignos \bar{x} = 0.51 ng/mg Prot. con un rango de 0.25 - 0.77 ng/mg Prot. (tabla 5).

TABLA 4. CONCENTRACIÓN DEL COMPLEJO ATP-PAI-1 EN PLASMA

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	u-PA (ng / ml)	PACIENTE No.	u- PA (ng /ml)
1	II B	1.42	1	0.58
2	II B	0.47	2	0.52
3	II B	1.50	3	0.49
4	II B	0.30	4	0.62
5	II B	0.81	5	0.90
6	II B	0.66	6	0.54
7	---	0.58	7	0.5
8	II B	1.43	8	0.74
9	I B	1.10	9	0.72
10	II A	0.99	10	---
11	II B	1.04	11	1.14
12	II A	0.62	12	1.39
13	II B	0.76	13	1.48
14	II B	1.21	14	1.41
15	II A	1.04	15	1.1
16	II B	1.71	16	1.04
17	II B	1.38		
18	II B	1.40		
19	II B	1.02		
20	II A	1.10		
21	II B	1.20		
22	I A	1.50		

n = 22
 \bar{x} = 1.06
 Rango : 0.89 - 1.23 ng/ml ; *p* = 0.16

n = 16
 \bar{x} = 0.88
 Rango: 0.69 - 1.07 ng/ml; *p* = 0.1

TABLA 5. CONCENTRACIÓN DEL COMPLEJO ATP-PAI-1 EN CITOSOL

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	ATP-PAI-1 (ng/mg Prot.)	PACIENTE No.	ATP-PAI-1 ng/mg Prot.
1	II B	0.49	1	0.13
2	II B	7.06	2	0.38
3	II B	2.05	3	0.53
4	II B	0.17	4	1.87
5	II B	1.13	5	0.51
6	II B	1.75	6	0.33
7	---	1.2	7	0.21
8	II B	0.24	8	1.19
9	I B	0.82	9	0.67
10	II A	0.25	10	0.18
11	II B	1.54	11	0.26
12	II A	1.94	12	0.4
13	II B	0.38	13	0.86
14	II B	2.01	14	0.22
15	II A	0.86	15	0.25
16	II B	0.72	16	0.18
17	II B	0.87		
18	II B	1.03		
19	II B	0.66		
20	II A	0.70		
21	II B	1.00		
22	I A	0.64		

n = 22

\bar{x} = 1.25

Rango : 0.63 - 1.87 ng/mg Prot.

p = 0.05

n = 16

\bar{x} = 0.51

Rango : 0.25 - 0.77 ng/mg Prot.

p = 0.05

8.3. u-PAR.

("n" malignos = 15, "n" benignos = 7) . El u-PAR no fue detectable en plasma (tabla 6) pero si en citosol (tabla 7) aunque no se encontró diferencia significativa al comparar ambos grupos por el análisis estadístico de varianza ANOVA en este se obtuvo una $p = 0.18$, con una concentración promedio en tumores malignos de 2.58 ng/mg Prot. con un rango de 1.25 - 3.9 ng/mg Prot. y en tumores benignos una $\hat{x} = 1.2$ ng/mg Prot. con un rango de 0.0 - 2.44 ng/mg Prot.

TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE u-PAR EN PLASMA

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	u-PAR ng/ml	PACIENTE No.	u- PAR ng/ml
1	II B	-----	1	-----
2	II B	-----	2	-----
3	II B	-----	3	-----
4	II B	-----	4	-----
5	II B	-----	5	-----
6	II B	-----	6	-----
7	----	-----	7	-----
8	II B	0.0	8	-----
9	I B	0.0	9	-----
10	II A	0.0	10	-----
11	II B	0.0	11	0.0
12	II A	0.0	12	0.0
13	II B	0.0	13	0.0
14	II B	0.0	14	0.0
15	II A	0.0	15	0.0
16	II B	0.0	16	0.0
17	II B	0.0		
18	II B	0.0		
19	II B	0.0		
20	II A	0.0		
21	II B	0.0		
22	I A	0.0		

n = 15

n = 6

TABLA 7. CONCENTRACIÓN DE u-PAR EN CITOSOL

TUMORES MALIGNOS			TUMORES BENIGNOS	
PACIENTE No.	ESTADIO (TNM)	u-PAR ng/mg Prot.	PACIENTE No.	u- PAR ng/mg Prot.
1	II B	----	1	----
2	II B	----	2	----
3	II B	----	3	----
4	II B	----	4	----
5	II B	----	5	----
6	II B	----	6	----
7	---	----	7	----
8	II B	0.80	8	----
9	I B	1.70	9	----
10	II A	0.56	10	2.26
11	II B	1.99	11	0.82
12	II A	3.90	12	1.95
13	II B	5.45	13	3.40
14	II B	0.22	14	0.00
15	II A	4.83	15	0.00
16	II B	0.00	16	0.00
17	II B	7.70		
18	II B	2.84		
19	II B	1.42		
20	II A	0.65		
21	II B	0.87		
22	I A	5.73		

n = 15

$\hat{x} = 2.58$

Rango : 1.25 - 3.9 ng/mg Prot.

$\rho = 0.175$

n = 7

$\hat{x} = 1.2$

Rango : 0 - 1.24 ng/mg Prot.

$\rho = 0.175$

9.0 DISCUSION.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones (3, 7 , 11, 15) respecto al papel que desempeñan los componentes del sistema fibrinolítico tales como la plasmina, u-PA, u-PAR, ATP PAI-1 y PAI-2 en los procesos de metástasis e invasión tumoral donde se ha encontrado que participan en la proteólisis de la matriz extracelular facilitando la migración de la célula neoplásica. Se sabe que el u-PA junto con su receptor localizado en la membrana plasmática celular (u-PAR) focalizan dicha proteólisis pericelular la cual se puede llevar a cabo de manera directa por u-PA o bien por plasmina; ambos (u-PA y plasmina) pueden activar a otras pro-enzimas secretadas en forma latente como el grupo de las metaloproteinasas formando un mecanismo de autoamplificación.

Retomando la hipótesis más reciente (11) que explica el proceso de invasión tumoral, podemos visualizar en la figura 4.0 que consta de tres pasos : el primer paso es la adhesión de la célula tumoral a la matriz extracelular. Esta adhesión puede estar mediada por glucoproteínas como la láminina o la fibronectina que se unen a receptores de la membrana plasmática de la célula tumoral (fig. 4.1.); en el segundo paso, después de la adhesión, la célula tumoral secreta enzimas proteolíticas o induce la secreción de éstas por las células huésped para fragmentar localmente la matriz (fig. 4.2.) y el tercer paso es la locomoción de la célula tumoral a la región de la matriz fragmentada (fig. 4.3.). La invasión de la matriz puede ser continua al repetirse estos tres pasos y una vez que las células han penetrado en el estroma, pueden tener acceso a los vasos sanguíneos o linfáticos lo cual les permite invadir un lugar distante secundario (órgano blanco).

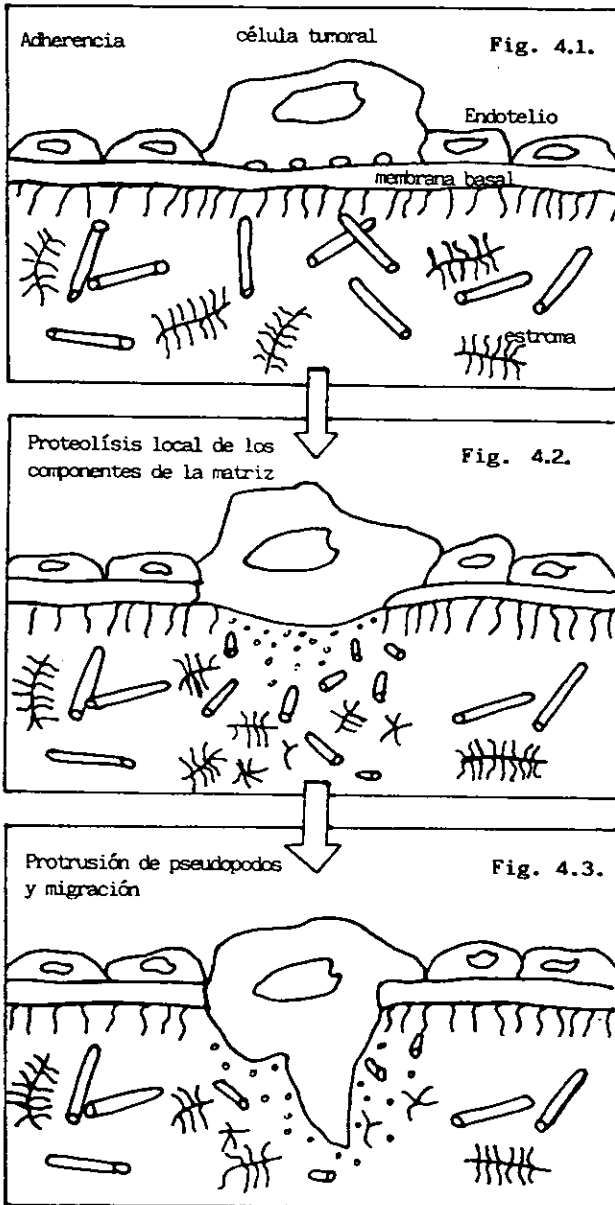


Fig. 4.0 Hipótesis de la invasión tumoral.

Fig. 4.1. Adhesión

Fig. 4.2. Proteólisis

Fig. 4.3. Locomoción

En investigaciones clínicas y experimentales (4,5,6,11,20,30) se ha correlacionado un incremento en citosol y extracto tumoral de los niveles de u-PA, u-PAR y PAI-1 en el tumor maligno con un acortamiento del período de supervivencia libre de enfermedad y por lo tanto con un pronóstico desfavorable para el paciente en varios tipos de cáncer tales como el de mama, colon, próstata, pulmón y cerebro.

En este estudio encontramos que dos de los marcadores de fibrinólisis evaluados u-PA y complejo ATP-PAI-1, están aumentados en el citosol de células de cáncer de mama con respecto al grupo control, dando una diferencia estadísticamente significativa y siendo mayor en cuanto a u-PA. Estos datos están acorde con lo reportado en otros trabajos (3,4,5,6) en donde el u-PA se ha encontrado elevado tanto en citosol como en extracto tisular de tumores malignos de mama; entre ellos Foekens y colaboradores encuentran un contenido promedio de u-PA en citosol de 671 tumores de mujeres con cáncer de mama primario de 0.7 ng/mg Prot., siendo muy similar al valor promedio que obtuvimos en el grupo de pacientes con tumores malignos de mama de 0.78 ng/mg Prot.

El aumento de u-PA no fué homogéneo en todo el grupo, ni tampoco dependiente del estadio de la enfermedad. También se observó que del grupo de pacientes captadas aleatoriamente, el 91% fué estadio II y en este; dos pacientes tuvieron un aumento tres veces mayor, una 10, cinco 19, una 30 y una 60 veces más respecto al grupo control. En lo referente a u-PAR algunos investigadores (6) han encontrado que el aumento de u-PA y u-PAR en tumores malignos de mama correlacionan entre sí. Nosotros no observamos dicha correlación, sin embargo no es posible dar una conclusión definitiva por el pequeño tamaño de la muestra.

Para poder definir lo anterior sugerimos aumentar el número de muestras y determinarlo en extracto tisular. Por otra parte, la elevación estadísticamente significativa del complejo ATP-PAI-1 en el citosol de tumores malignos respecto al grupo control es un nuevo hallazgo ya que hasta ahora no ha sido evaluado en ningún otro trabajo. Este aumento fué independiente del estadio de la enfermedad y no fué homogéneo en el grupo de pacientes con cáncer de mama; una paciente lo incrementó 13 veces, nueve tres y doce no lo elevaron; estos resultados nos indican que también aumenta la actividad fibrinolítica mediada por ATP y sugiere que parte del PAI-1 que se ha reportado aumentado en algunos de estos pacientes (9, 20, 22). se utiliza en neutralizar tal actividad del ATP y tal vez la cantidad restante queda tanto libre o bien hallarse en su forma latente. Para realizar una mejor interpretación de estos resultados sugerimos evaluar además del complejo ATP-PAI-1, al ATP y al PAI-1 por el método de ELISA que determina tanto la forma unida como la libre, haciéndolo en extracto tisular.

Se cree que una co-expresión de u-PA, u-PAR y PAI-1, son necesarios para focalizar y optimizar la invasividad, así como también la actividad angiogénica regulada por factores de crecimiento entre los que están: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), además también se ha demostrado que el u-PA puede provocar un efecto mitogénico directo en ciertas líneas tumorales humanas y puede activar factores de crecimiento latentes directamente o a través de un mecanismo mediado por plasmina.

En contraste, la expresión de ATP no se ha relacionado a la malignidad tumoral pero sí se encuentra elevado en cultivos de líneas celulares malignas y en tumores malignos como el de mama y pancreas (20). Por otra parte el incremento de PAI-1 y su correlación con un acortamiento en el período de recaída y sobrevida libre de enfermedad es hasta hoy un motivo de controversia, ya que parece ser incongruente, que el aumento de la enzima (u-PA) y su inhibidor (PAI-1) correlacionen con la malignidad tumoral, pues se esperaría una inhibición de la actividad de u-PA, algunos investigadores que han tratado de explicar el papel que desempeña el PAI-1 en la malignidad tumoral proponen que el PAI-1 interviene de manera importante en la protección del estroma tumoral de la actividad proteolítica de u-PA y más recientemente se ha sugerido que también puede estar involucrado en la modulación del enlace de u-PAR localizado en la membrana plasmática de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, láminina, etc.) favoreciendo su adhesión (30). Al respecto pensamos que no todo el PAI-1 se ocupa en la inactivación de u-PA sino que una fracción de éste interactúa con otros componentes que también se encuentran en la masa tumoral, como por ejemplo el ATP en algunas pacientes y tal vez el PAI-1 restante no sea suficiente para neutralizar toda la actividad de u-PA. Por otro lado el pro-uPA no es inhibido por PAI-1, pero sí puede enlazarse a u-PAR en la membrana plasmática de la célula tumoral en donde es activado por plasmina para producir proteólisis pericelular, favoreciendo la migración (fig. 5.0.)

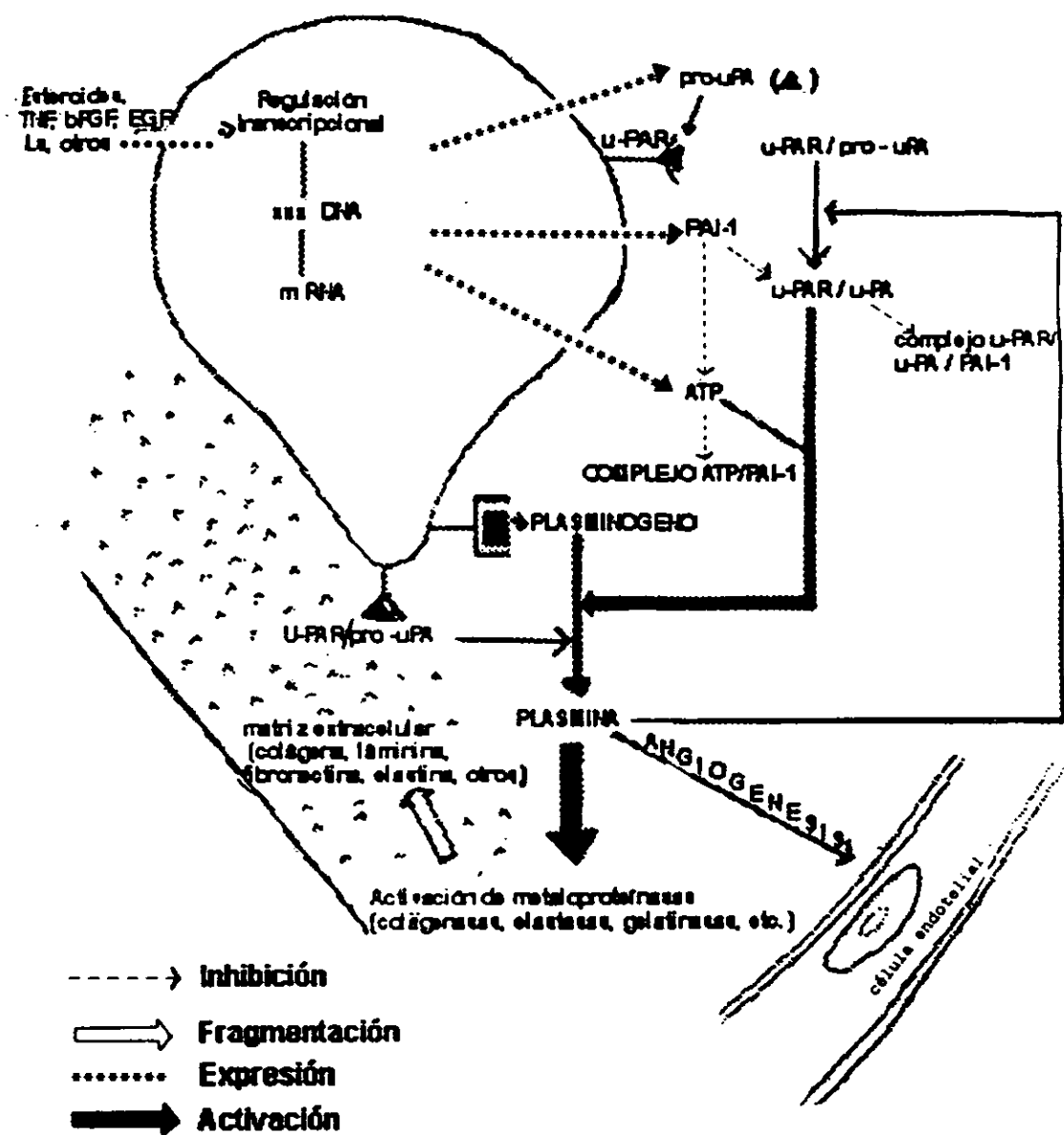


Fig. 5.0. Hipótesis de la participación de los factores fibrinolíticos en la invasión tumoral.

Por último, al comparar los tres parámetros fibrinolíticos evaluados en tejido tumoral maligno observamos que correlacionan entre sí solamente en dos casos, en seis sólo dos de ellos (cinco pacientes tienen elevado el u-PA y el complejo ATP-PAI-1 y una paciente el u-PAR y el complejo), en ocho casos hay incremento en uno (dos pacientes elevan u-PA, tres el complejo ATP-PAI-1 y tres pacientes aumentan el u-PAR) y en seis casos ninguno.

Haciendo una proyección a futuro de lo que podemos esperar en la evolución de las pacientes con cáncer de mama, según los resultados obtenidos y tomando en cuenta los más recientes hallazgos sobre el papel que desempeñan los factores del sistema fibrinolítico en los procesos de metástasis e invasión tumoral, pensamos que aquellas pacientes con u-PA elevado y el complejo ATP-PAI-1 bajo en citosol tumoral tengan un pronóstico desfavorable que probablemente se refleje en una recaída temprana, indicando también mayor agresividad tumoral; en el caso de las pacientes con elevación del complejo ATP-PAI-1 y u-PA bajo tal vez tengan una mayor sobrevida libre de enfermedad, tomando en cuenta la comunicación verbal del Dr. Schmit de que un aumento del ATP y receptores estrogénicos son de buen pronóstico; en lo que se refiere a aquellas pacientes que tienen concentraciones elevadas tanto de u-PA como del complejo ATP-PAI ó ninguno de ellos creemos que, su evolución es impredecible.

También es posible estratificar a las pacientes de acuerdo al tipo de marcador fibrinolítico que esta aumentado, la importancia que cada marcador tenga en la sobrevida de estas pacientes tendrá que ser evaluada en el seguimiento de ellas a largo plazo, el periodo de tiempo que proponemos es de 5 años (periodo marcado en la literatura), hasta

la fecha las pacientes con cáncer de mama incluidas en este estudio tienen entre 10 a 19 meses después de cirugía sin recaída.

10.0 CONCLUSIONES.

En la población mexicana estudiada se confirma que en el citosol tumoral de mujeres con cáncer de mama en estadios tempranos I y II se encuentran elevadas significativamente las concentraciones de u-PA y complejo ATP-PAI-1 respecto a un grupo control (tumores de mama benignos), en cuanto a u-PAR no encontramos diferencia significativa, aunque debemos tomar en cuenta que el número de muestras fue pequeño.

En plasma no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en lo que se refiere a u-PA, complejo ATP-PAI-1 y u-PAR.

No hay un incremento homogéneo de los tres factores fibrinolíticos evaluados en el citosol tumoral de mujeres con cáncer de mama, de acuerdo a esto es posible estratificar a las pacientes según el marcador fibrinolítico que tengan elevado para hacer una proyección a futuro de su probable evolución. Para corroborarlo se dará seguimiento a largo plazo de las pacientes en un período de tiempo de 5 años, verificando así el valor pronóstico de los marcadores fibrinolíticos determinados, hasta la fecha las pacientes tienen entre 10 a 19 meses después de cirugía sin recaída.

11.0. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- **Información estadística del Sector Salud y Seguridad Social INEGI.**
Cuaderno No.10.
- 2.- Duffy M, O' Grady P, Devaney D, et al. ***Urokinase plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas.*** Cancer. 1988; 62:531-533.
- 3.- Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, et al. ***Urokinase type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer.*** The Lancet. 1989; 2:1049.
- 4.- Duffy M, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, et al. ***Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer.*** Cancer Res.1990; 50:6827-6829.
- 5.- Foekens J, Schmitt M, Peters H, et al. ***Prognostic value of urokinase type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients.*** Cancer Res. 1992 52:6101-6105.
- 6.- Del Vecchio S, Stopelli P, Carriero M, et al. ***Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumor by in vitro quantitative autoradiography comparison with urokinase level.*** Cancer Res. 1993; 53:3198-3206.
- 7.- Garne J, Aspegren K, Linell F, et al. ***Primary prognostic factors in invasive breast cancer with apecial reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade.*** Cancer. 1994; 73:1438-1448.
- 8.- Sitrin R, Todd R, Mizukami I, et al. ***Cytokine-specific regulation of urokinase receptor (CD87) expression by U937 mononuclear phagocytes.*** Blood. 1994; 84:1268- 1275.
- 9.- Kwaan H, Keer H, Radosevich J, et al. ***Components of the plasminogen-plasmin system in human tumor cell lines.*** Sem. Throm. Hemos. 1991; 17:175-182.

- 10.- Cohen R, Crowley C, Lucas K. et al. *Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells*. Blood. 1991; 2:479-487.
- 11.- Aznavoorian S, Murphy A, Stetler-Stevenson W, et al. *Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis*. Cancer. 1993; 71:1368-1378.
- 12.- Colman R, Hirsh J, Marder V, and Salzman E. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Tomo 1. Edit. J:B: Lippincott Company. U.S.A. 1987, Pag 269-390.
- 13.- Astrup Tage. *Fibrinolysis: past and present, a reflection of fifty years*. Sem. Throm. Hemos. 1991; 17:161-174.
- 14.- Verstraete M. *The fibrinolytic system: from petri dishes to genetic engineering*. Thrombosis and Haemostasis. 1995; 74:25-35.
- 15.- Ichinose A, Fujikawa K, y Suyama T. *The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin*. J Biol. Chem. 1986; 261:3486-3489.
- 16.- Hajjar K A. *Cellular receptor in the regulation of plasmin generation*. Thrombosis and Haemostasis. 1995; 74:294-301.
- 17.- Sprengers E. D, Kluit C. *Plasminogen activator inhibitors*. Blood. 1987; 69:381- 387.
- 18.- Wiman Björn. *Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease*. Thrombosis and Haemostasis. 1995; 74:71-76.
- 19.- Bachmann F. *The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects*. Thrombosis and Haemostasis. 1995; 74:172-179.
- 20.- Takeuchi Y, Nakao A, Harada A, et al. *Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human pancreatic carcinoma: immunohistochemical*. AM J Gastroenterology. 1993; 88:1928-1933.

- 21.- Porreau-Schneider N, Delori P, Boutiere B, et al. *Modulation of plasminogen activator system by matrix components in two breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA MB-231*. J Natl. Cancer Inst. 1989; 81:259-266.
- 22.- Landau B, Kwaan H, Verrusio E. and Brem S. *Elevated levels of urokinase type plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type-1 in malignant human brain tumors*. Cancer Res. 1994; 54:1105-1108.
- 23.- Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, et al. *Urokinase overproduction results in creased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo*. Cancer Res. 1994; 54:2372-2377.
- 24.- Ploug M, Behrendt N, Lober D y Dano K. *Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator*. Sem, Throm. Hemos. 1991; 17:183-193.
- 25.- Ellis V. and Dano K. *Plasminogen activation by receptor-bound urokinase*. Sem.Throm.Hemos. 1991; 17:194-200.
- 26.- Behrendt N, Ronne E and Dano K. *The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface*. Biol. Chem Hoopé-Seyler. 1995; 376:269-279.
- 27.- Bianchi E, Cohen R, Thor A, et al. *The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue*. J Cancer Res. 1994; 85:861-866.
- 28.- Morimoto A, Tada K, Nakayama Y, et al. *Cooperative roles of hepatocyte growth factor and plasminogen activator in tubular morphogenesis by human microvascular endothelial cells*. Jpn. J Cancer Res. 1994; 85:53-62.
- 29.- Goldberg I.D. y Rosen E.M. *Regulation of Angiogenesis*. Birkhäuser Verlag Germany. 1997. Pag 113-405.

30.- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, et al. *Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy*. Thrombosis and Haemostasis. 1997. 78:285-296.