

11281

8

2ej

**"CORRELACION ENTRE LA PRODUCCION DE ENZIMAS PROTEOLITICAS Y LA CAPACIDAD INVASIVA DE DIFERENTES TIPOS DE CANCER PULMONAR"**

**Autor: Georgina González Avila**

**Tutor: Dr. Ruy Pérez Tamayo**

**Comité tutorial: Dr. Moisés Selman Lama**

**Dra. Annie Pardo Semo**

**Dr. Ruy Pérez Montfort**

Esta tesis fue realizada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas,  
de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

261289

1998



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 esta 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.

**“En su afán por conquistar un mayor territorio, las células neoplásicas transforman al organismo que las alberga, sin importar si dicha transformación ocasiona a la larga su propia destrucción.”**

**gga**

**A Santiago y Sebastián quienes han sido parte de esta accidentada tesis.**

**Gracias por su paciencia y su cariño.**

**INDICE**

	<b>pag</b>
<b>Resumen</b> -----	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	
¿Fuma? -----	8
Una enfermedad y su historia natural -----	9
La última estación: La metástasis -----	12
Participación de las metaloproteasas de matriz en la metástasis:	
¿la clave? -----	17
La tesis -----	23
<b>Material y métodos</b>	
Cultivo de células -----	26
Ensayo de actividad colagenolítica intersticial -----	27
Ensayo de actividad gelatinolítica -----	28
Zimografía en geles de gelatina y caseína -----	29
Análisis por inmunocitoquímica -----	30
Análisis por Western blot -----	31
Ensayo de invasión <i>in vitro</i> -----	32
Cultivo de células en presencia de diferentes sustratos -----	33
Análisis estadístico -----	34
<b>Resultados</b>	
Actividad colagenolítica intersticial -----	34

Actividad gelatinolítica y caseinolítica -----	35
Inmunocitoquímica -----	36
Western blot -----	37
Invasión <i>in vitro</i> -----	39
Actividad gelatinolítica de las células en presencia de diferentes sustratos -----	41
Concentración y electroforesis de las proteínas presentes en los cultivos con Matrigel y gelatina -----	42
Discución -----	44
Conclusiones -----	57
Bibliografía -----	59

## Resumen

El objetivo de la presente tesis fue determinar la presencia y actividad enzimática de las metaloproteasas de matriz (MMPs), así como de sus inhibidores TIMP-1 y TIMP-2, en células de cáncer pulmonar. La actividad enzimática presente en los medios de cultivo y extractos celulares se determinó por medio de zimogramas de gelatina y caseína, y de ensayos de actividad colagenolítica y gelatinolítica utilizándose sustratos radiactivos. La presencia de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 inmunorreactivos se corroboró por estudios de inmunocitoquímica y Western blot. Se midió la capacidad de invasión de las células neoplásicas en un ensayo de invasión *in vitro* con Matrigel. Se estudió también la influencia del Matrigel y de la gelatina sobre la actividad gelatinolítica de las células neoplásicas.

La mayor actividad colagenolítica se encontró en los medios que correspondían a una línea celular de adenocarcinoma. La mayor actividad gelatinolítica se observó en los extractos celulares del carcinoma de células pequeñas. No se pudo detectar actividad caseinolítica en ninguna de las muestras. En todas las células se identificaron MMP-3 y MMP-9 en estado activo y/o latente. MMP-1 y MMP-2 se observaron sólo en los carcinomas epidermoides y de células pequeñas. TIMP-1 se encontró en todos los medios de cultivo con excepción del carcinoma de células pequeñas, como una banda de 21 kD, y como polímeros. TIMP-2 se halló formando complejos inmunorreactivos de alto peso molecular que

podrían corresponder a los complejos proMMP-2/TIMP-2. Los ensayos de invasión mostraron que las células neoplásicas y los fibroblastos, tenían la misma capacidad invasiva, y que esta capacidad era diferente a la de las células epiteliales normales. La presencia del Matrigel o de la gelatina en los cultivos celulares, activaron a MMP-2 y MMP-9.

Estos resultados mostraron que las células neoplásicas pulmonares son capaces de producir MMPs y sus inhibidores, encontrándose la mayor actividad gelatinolítica en los extractos celulares correspondientes a carcinoma de células pequeñas. Esta actividad enzimática aunada a la ausencia del inhibidor TIMP-1 podría estar en relación con el comportamiento clínico metastásico que se observa en este tipo de cáncer pulmonar. Finalmente, la capacidad de invasión de las células parece no sólo depender del papel que tienen las MMPs en la degradación de la matriz extracelular. Las interacciones que las células establecen con la matriz pueden activar mecanismos independientes en los que participan las MMPs, que permiten la migración de las células.



## Abstract

The aim of the present study was to examine the presence and enzymatic activity of matrix metalloproteases (MMPs), and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in lung cancer cells. Enzymatic activity from cultured media and cell extracts, was measured by gelatin and casein zymography, and radiolabeled gelatin and collagen degradation assays. Immunocytochemistry and Western blot analysis were performed to corroborate the presence of immunoreactive MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 proteins. Invasion capacity was examined in an *in vitro* invasion assay with Matrigel. It was also studied the influence on neoplastic cells gelatinolytic activity by Matrigel and gelatin.

The highest collagenolytic activity was found in the media from an adenocarcinoma cell line. The highest gelatinolytic activity was observed in the cell extracts from a small cell carcinoma cell line. It was not possible to detect caseinolytic activity in any sample. MMP-3 and MMP-9 were identified in all cells in their active and/or latent forms. MMP-1 and MMP-2 were only observed in the epidermoid and small cells carcinomas. TIMP-1 was found in the media of all cells as a 21 kD band, and as TIMP-1 polymers with the exception of the small-cell carcinoma samples. TIMP-2 was found as higher-order molecular immunoreactive complexes that may correspond to proMMP-2/TIMP-2 complexes.

Invasion assays showed that neoplastic and fibroblasts cells have the same invasion capacity but different from normal epithelial cells. MMP-2 and MMP-9 were activated by the presence of Matrigel and gelatin in cell cultures.

These results demonstrated that lung neoplastic cells produce MMPs and their inhibitors, with the small cell carcinoma cell extracts showing the highest gelatinolytic activity. This enzymatic activity plus the absence of TIMP-1 inhibitor fits well with the clinical metastatic behavior of this type of lung cancer. Finally, the cells invasion capacity is not just the result of extracellular matrix degradation by MMPs. Cell migration may results from cells and matrix interactions that activate independent mechanisms in which MMPs participate.

## Introduccion

### ¿Fuma?

Una de las preguntas obligadas que se le hace a un paciente cuando se sospecha de la presencia de cáncer pulmonar (CAP), es sí tiene el hábito de fumar, ya que tradicionalmente, se ha considerado al tabaquismo como uno de los factores de riesgo más frecuentemente asociado a esta enfermedad. Esta asociación ha colocado a las campañas antitabaquismo como las medidas preventivas más eficaces.<sup>1</sup> Sin embargo, a pesar de ellas el CAP se ha incrementado ocupando en los países industrializados como USA la primera causa de mortalidad por neoplasias en el sexo masculino, mientras que en el sexo femenino ha sufrido un incremento tal que sólo el cáncer de mama se encuentra por arriba, con una tendencia a incrementarse.<sup>2,3</sup> En México a pesar de no existir un registro epidemiológico que abarque a toda nuestra población, los datos obtenidos en 1996 por parte de SSA indican que esta neoplasia ocupa el primer lugar de fallecimientos por cáncer en la población masculina y el tercero en la femenina.<sup>4</sup> Por otro lado, sólo el 20% de los adictos al tabaco desarrollan la enfermedad, por lo que otros factores de riesgo deben considerarse, además del tabaquismo, sea activo o pasivo.<sup>5</sup> Entre estos factores se encuentran factores ocupacionales como la exposición a asbesto, la exposición intradomiciliaria a radiaciones alfa (radón), factores nutricionales, contaminación ambiental y unido a todo ello, la susceptibilidad genética del individuo a adquirir este tipo de

neoplasia. Todas estas condiciones pueden variar de un tipo de población a otra, aún dentro de un mismo país, y su interacción puede ser determinante para que un individuo desarrolle CAP.<sup>6-12</sup>

Para disminuir la incidencia de CAP es necesario conocer más de sus mecanismos etiopatológicos para que tanto las medidas de prevención como las terapéuticas sean realmente efectivas. Desafortunadamente existe también el grave problema de que los pacientes con CAP llegan a consultar al médico cuando ya presentan metástasis a otros órganos como son hígado y cerebro. Los resultados del tratamiento de estos pacientes son desalentadores pues mientras el tumor primario puede responder al tratamiento, no lo hacen así las metástasis. Este es un problema general para todos los tipos de cáncer por lo que se están llevando a cabo estudios para entender los mecanismos moleculares y eventos celulares que permiten la formación de las metástasis.

#### Una enfermedad y su historia natural.

El cáncer pulmonar es sólo una de las más de 100 formas que existen de cáncer. En términos generales, se dice que el cáncer es un proceso microevolutivo que ocurre en una población celular en una escala de tiempo que varía de meses a años, y que depende de los mismos principios de mutación y selección natural que rigen la evolución de los seres vivos.<sup>13</sup>

En la historia natural de esta enfermedad (familia de enfermedades), se pueden identificar diferentes etapas de acuerdo a los eventos moleculares y celulares que en ella ocurren. Estas etapas son similares para todos los cánceres

independientemente de su origen celular. Por ejemplo, para un carcinoma (cáncer de origen epitelial) la enfermedad se inicia cuando una célula dentro del tejido normal sufre una mutación silenciosa, irreversible, por efecto de un agente carcinogénico o inductor como sustancias químicas, virus oncogénicos, radiaciones como la ultravioleta, etc. La célula que posee esta mutación así como sus descendientes morfológicamente se ven normales. Sin embargo puede existir un aumento en la proliferación celular (hiperplasia) cuando la mutación se localiza en una de las copias de un proto-oncogen (mutación oncogénica). Después de varios meses o años, y por la exposición a estos agentes en repetidas ocasiones o cuando las células "iniciadas" se encuentran en contacto con los llamados agentes promotores, (como los ésteres de forbol), las células pueden adquirir otras mutaciones que originen la pérdida del control del crecimiento y de la proliferación celular. La morfología de las células se altera así como su orientación, y se dice que en el tejido existe una lesión displásica. Estos cambios estarían en la denominada etapa promotora. Después de un tiempo pueden existir más mutaciones que ocasionen completa pérdida del control de la proliferación celular, así como un cambio completo de la morfología de la célula en relación con el tejido normal (etapa de progresión). Si las células aún no han invadido los tejidos vecinos, es decir, las membranas basales se encuentran intactas, se dice que existe un carcinoma *in situ*, el cual se considera una neoplasia benigna. Pero las células pueden aún presentar más mutaciones y entonces adquirir la habilidad de migrar fuera de lo que sería el tumor primario, e

invadir los tejidos vecinos, y a través de los vasos sanguíneos y linfáticos llegar a órganos y tejidos distantes donde iniciarían una nueva colonia. A este último evento dentro de la etapa de progresión se le conoce como metástasis.<sup>14-16</sup>

La etapa de iniciación o inducción así como la etapa de promoción se han estudiado ampliamente logrando la identificación de dos clases de genes que se encuentran involucrados en el control del ciclo celular. Los oncogenes dominantes que codifican para proteínas que estimulan la división celular, y los genes recesivos o genes supresores del fenotipo tumorogénico (anti-oncogenes), que codifican para proteínas que inhiben el ciclo celular. Los oncogenes pueden activarse a partir de genes normales (proto-oncogenes) por diferentes mecanismos como son la mutación (ras), y la sobre-expresión o amplificación (myc), lo que ocasiona que las células pierden la regulación de su proliferación y se transforman en células neoplásicas.<sup>17-19</sup> Entre los oncogenes asociados a CAP están la familia de los genes myc y ras, los genes neu, myb, raf y jun, siendo de mayor utilidad pronóstica por su frecuencia de asociación con determinados tipos histológicos de CAP: ras, myc y neu (Tabla 1).<sup>20-21</sup>

Alteraciones en los llamados antioncogenes también se han relacionado con la aparición de CAP. Estudios de citogenética que se han realizado en células neoplásicas pulmonares, han revelado la presencia de mutaciones y deleciones en cromosomas que albergan genes recesivos o antioncogenes (Tabla 2). Entre ellas se han encontrado alteraciones en el cromosoma 13q donde se encuentra el gen del retinoblastoma (rb), y en el cromosoma 17p donde se localiza el gen p53.

**Tabla 1. Oncogenes asociados a cáncer pulmonar.**

<b>Gen</b>	<b>Estirpe histológica</b>	<b>Tipo de mutación</b>	<b>Frecuencia</b>
Ki-ras	CCNP	mutación puntual	26-50 %
(adenocarcinoma)			
Ha-ras	CCNP	delección	9 %
c-myc	CCP CCNP	amplificación, sobre expresión sobre expresión	11-44 % 10 %
L-myc	CCP CCNP	sobre expresión sobre expresión	5-33 % 4 %
N-myc	CCP	sobre expresión	6-25 %
Her2/neu	CCNP	sobre expresión	27-37 %
c-myb	CCP	sobre expresión	87 %
c-raf-1	CCP CCNP	sobre expresión sobre expresión	común común
c-jun	CCP CCNP	expresión expresión	--- ---

**CCP = carcinoma de células pequeñas.**

**CCNP = carcinoma de células no pequeñas como carcinomas epidermoides y adenocarcinomas.**

**Tabla 2. Antioncogenes asociados a cáncer pulmonar**

<b>Gene</b>	<b>Estirpe hitológica</b>	<b>Tipo de mutación</b>	<b>Frecuencia</b>
Rb	CCP	delección mutación puntual	+90 %
p53	CCP	delección, mutación puntual, rearreglo	+50 %
	CCNP		+45 %
3p	CCP	delección	+90 %
	CCNP	delección	25-50 %

**CCP = carcinoma de células pequeñas**

**CCNP = carcinoma de células no pequeñas como adenocarcinomas y carcinomas epidermoides**



así mismo, parece existir una relación de CAP, principalmente del carcinoma de células pequeñas con deleciones en el brazo corto del cromosoma 3 (3p).

Por otro lado, mientras los oncogenes y antioncogenes se han asociado ha las etapas de iniciación y progresión del CAP, existe creciente evidencia de que los factores de crecimiento pueden jugar un papel crucial como agentes promotores en este tipo de neoplasias, involucrándose en su acción tanto mecanismos paracrinós como autocrinós. Entre los factores de crecimiento más frecuentemente asociados con CAP se encuentran el péptido liberador de gastrina (GRP) (bombesina en anfibios), presente principalmente en carcinoma de células pequeñas, y el receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGF) presente hasta en un 80% de los carcinomas epidermoides principalmente en estadios avanzados (III).<sup>22</sup>

La proliferación celular anormal, acompañada de la pérdida del control del crecimiento celular no son el único mecanismo necesario para que un grupo de células se conviertan en células neoplásicas, sino que también existe una represión de los genes que inducen la apoptosis, inhibiéndose este proceso.<sup>3,23-24</sup>

Además, la disminución de la muerte celular programada parece relacionarse con un aumento en la población celular resistente a la quimioterapia lo cual compromete aún más la vida del paciente.

#### La última estación: La metástasis.

Dentro de la evolución natural del cáncer, existe un porcentaje de células que debido a la serie de mutaciones que han acumulado desarrollan la capacidad de

invadir los tejidos vecinos, escapando a todo tipo de control que mantiene a una célula determinada en un lugar específico. Estas células por sí solas, y en algunos casos auxiliadas por el médico, salen hacia el torrente sanguíneo para formar lo que se conoce como micrometástasis que si no se tratan, tarde o temprano crecerán y se harán clínicamente manifiestas.

El mecanismo(s) molecular responsable de la formación de metástasis no se conoce con exactitud. Sin embargo algunos principios generales se han logrado esclarecer. Conforme la neoplasia evoluciona comienza a existir una heterogenicidad celular en cuanto al grado de crecimiento, cariotipo, contenido de receptores, respuesta hormonal, susceptibilidad a la terapia antineoplásica, inmunogenicidad y potencial metastásico.<sup>25</sup> Esta última característica consiste en la capacidad que adquieren las células neoplásicas de invadir los tejidos vecinos y formar colonias celulares en lugares distantes al tumor primario con fines de "supervivencia". El potencial metastásico no aparece al mismo tiempo en todas las células de un tumor primario, e inclusive existen diferencias en el grado en que se manifiesta esta habilidad entre una célula y otra. Además la capacidad metastásica de una neoplasia puede ser diferente de un paciente a otro aunque en ambos casos se trate del mismo tipo de cáncer e inclusive de la misma variedad histológica, por lo que el pronóstico en ambos casos puede ser muy diferente. Esto confirma que existen otros factores tanto intrínsecos como extrínsecos, relacionados con el desarrollo de las metástasis.

Al igual que se ha observado una asociación entre las etapas de iniciación y promoción con la activación e inhibición de genes específicos, se ha buscado una relación similar con la adquisición del potencial metastásico, es decir, la identificación de los llamados genes de la metástasis o metastogénesis.<sup>25-26</sup> Se ha propuesto la amplificación de oncogenes como el mecanismo que induce la etapa de progresión de la neoplasia. Sin embargo, se han encontrado diferencias en cuanto a la expresión de oncogenes entre el tumor primario y sus metástasis los cuales pueden estar igualmente expresados, sobre expresados, o no expresarse del todo, lo que lleva nuevamente a la conclusión de que para que una célula sea metastásica se requiere además de otros factores. El oncogen que se ha relacionado con mayor frecuencia con la capacidad metastásica es el gen *ras*, encontrándose un aumento de la proteína que codifica (p21), en células altamente metastásicas. Los oncogenes *mos*, *raf*, *src*, *fos* y *fms* también se han relacionado con la aparición del potencial metastásico sin embargo parece ser que estos efectos se ejercen a través de la acción del oncogen *ras*.<sup>27-28</sup> Otros oncogenes asociados al comportamiento metastásico de ciertas neoplasias en humanos son HER-2/neu en cáncer de mama y N-myc en neuroblastomas.<sup>25-26</sup> En el carcinoma pulmonar de células pequeñas se ha encontrado N-myc, sin embargo no se ha logrado establecer una correlación clara entre el grado de metástasis y la amplificación de este oncogen.<sup>29</sup>

Por otro lado, existe también la posibilidad de que el control genético de la metástasis se lleve a cabo por la desactivación de genes específicos, los genes

supresores de la metástasis.<sup>30</sup> Este tipo de genes bien pueden funcionar incrementando la inmunogenicidad de la célula neoplásica en el huésped, o bien, codificar para una proteína que actúe como inhibidor en alguno de los eventos que ocurren dentro del proceso de metástasis o actuar directamente en el ADN o ARN asociados a los metastogénes. Entre los genes supresores de metástasis se encuentra el gen nm-23 cuya expresión se ha observado disminuida en adenocarcinoma pulmonar, y en carcinoma de mama y colon con alto potencial metastásico.<sup>31-33</sup> Sin embargo, existe también evidencia de una expresión independiente de este gen, de la capacidad metastásica en células de melanoma de ratón, y en células neoplásicas renales y de colon de origen humano.<sup>34</sup> Otro oncogen que se ha relacionado con la regulación del potencial metastásico en ratón, es c-fos que parece ejercer su acción al activar la transcripción de la proteína H-2K. Esta proteína está relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad y su expresión aumenta la inmunogenicidad tumoral.<sup>35</sup> En el humano el papel de c-fos en este contexto, aún no está claro. Otros genes cuya expresión se ha encontrado aumentada en células de adenocarcinoma mamario de rata no metastásicas, son WDNM1 y WDNM2.<sup>36-37</sup> La expresión de estos genes está disminuida en las células con potencial metastásico.

El estudio del control genético de la metástasis es difícil pues implica el estudio de cada uno de sus pasos lo cual lo hace sumamente complicado. Esta serie de eventos o pasos se inician con el desprendimiento de la célula del tumor primario y de la matriz extracelular (ME), es decir, cuando aparecen alteraciones en las

moléculas de adhesión como la E-caderina que mantiene una célula unida con otra, y las integrinas que mantienen las células unidas a su matriz extracelular.<sup>38-41</sup>

Las células neoplásicas abandonan el tumor primario penetrando hacia los vasos sanguíneos y linfáticos que se encuentran cercanos al tumor, o bien a través de los capilares que ellas mismas han generado para su nutrición (angiogénesis).

Una vez en la circulación la célula se tiene que enfrentar a los mecanismos inmunológicos del huésped así como al estrés mecánico del torrente circulatorio, y sobrevivir hasta encontrar el sitio de salida hacia un tejido donde pueda desarrollarse. Esta es una carrera también contra el tiempo pues una célula neoplásica tiene que encontrar donde anherirse antes que los mecanismos de apoptosis se activen por inhibición del complejo proteico conocido como E-CDK2 ciclina que participa en la regulación del crecimiento y proliferación celular. Esta dependencia de la adhesión está mediada por integrinas específicas que se encuentran en las matrices extracelulares y que difieren de un tejido a otro.<sup>42</sup>

Paget se refería a ello cuando decía que existía una "tierra" (soil) apropiada para cada tipo de "semillas" (seeds), identificando al tejido como la tierra y a las células como las semillas.<sup>25</sup> Esto se puede observar clínicamente dentro del proceso de metástasis donde existen sitios que por su red capilar y su localización, serían los sitios predecibles para una metástasis como son el hígado y el pulmón, pero hay tejidos donde no existe tal relación y aún así, las células neoplásicas encuentran un lugar apropiado para establecer una nueva colonia. A nivel molecular puede considerarse que cada célula tiene un "código postal" determinado por receptores

de membrana que se unen a integrinas específicas. Si la célula neoplásica no encuentra su correspondiente "código postal" o si se une a una matriz diferente, se activan la apoptosis y la célula muere. Sin embargo, la carrera no termina aquí, pues la célula tumoral tiene que proliferar para crear una nueva colonia lo cual depende del microambiente local constituido por factores de crecimiento y hormonas que produce el huésped, factores de crecimiento que sintetizan las mismas células neoplásicas, factores angiogénicos que le permitan a la nueva colonia la formación de una red capilar que le garantice su nutrición y la futura liberación de células que inicien una nueva carrera (Fig. 1).

#### Participación de las metaloproteasas de matriz en la metástasis: ¿la clave?

Uno de los principales criterios para definir la malignidad de un tumor es la pérdida de integridad de la membrana basal (MB). Si esto ocurre por ejemplo, en un tumor de origen epitelial éste deja de ser considerado una lesión benigna (carcinoma in situ), para ser ahora catalogado como una lesión maligna (carcinoma invasivo).<sup>43</sup> La invasividad se define como la capacidad que tienen las células neoplásicas de lesionar y penetrar en los tejidos circundantes. Es además un evento que se presenta no sólo al separarse una célula del tumor primario, sino que es recurrente durante la historia natural de la formación de las metástasis.<sup>44</sup> Durante el crecimiento del tumor mientras las células invaden los tejidos adyacentes, células endoteliales invaden a su vez a la neoplasia, desde las vénulas y capilares vecinos, proceso que se conoce como angiogénesis. A

### **Figura 1. La cascáda de la metástasis.**

La metástasis es el proceso por el cual las células neoplásicas malignas colonizan órganos distantes. Primero, las células neoplásicas se desprenden del tumor primario e invaden la membrana basal que las separa del resto del tejido. Después penetran en los vasos sanguíneos que las nutren hacia el torrente circulatorio. Las células que sobreviven al "estres mecánico" y a las defensas inmunológicas del huésped y que llegan a un capilar adecuado, puedan adherirse a las células endoteliales y penetrar la membrana basal. Una vez en el nuevo tejido, sí el microambiente se los permite, las células proliferan formándose una nueva colonia. Afortunadamente, sólo un pequeño porcentaje -una en 10,000- de las células neoplásicas que abandona el tumor primario sobrevive para iniciar una nueva colonia.

## CASCADA DE LA METASTASIS



**Desprendimiento del tumor primario**



**Dstrucción de membranas basales  
y matriz extracelular**



**Atravesar pared vascular o linfática**



**Sobrevivir al "estres mecánico" del sistema  
circulatorio y evadir las defensas del huésped**



**Salir de la circulación para entrar  
al nuevo órgano**



**Multiplicarse en el nuevo sitio, con un  
microambiente distinto**



través de la nueva red capilar que así se forma, por un lado las células de la respuesta inmune emergen hacia la neoplasia, y por otro, las células neoplásicas penetran hacia la luz de los capilares (intravasación), y de ahí, a la circulación sistémica. Cuando las células encuentran un tejido que favorece su crecimiento, invaden las paredes de los vasos (extravasación), hacia los tejidos para formar una nueva colonia.

La capacidad de invasión de la célula neoplásica depende de diferentes mecanismos entre los cuales destacan: 1) el aumento de la movilidad de la célula, que es consecuencia de la disminución en las uniones intercelulares y de aquellas que unen a las células con la matriz extracelular (ME); 2) aumento en la velocidad de duplicación celular que por mecanismos estrictamente mecánicos desplazan a los tejidos vecinos; y 3) la degradación activa de la ME.<sup>45</sup> Este último punto es de particular interés ya que las MEs constituyen un microambiente extracelular que influye en la diferenciación, proliferación y organización de las células, participando en eventos como la organogénesis, embriogénesis, reparación tisular, implantación de la placenta, etc.<sup>46-47</sup> Es por esto que se ha hecho particular énfasis en la relación de las células neoplásicas y la ME, y en el efecto que tienen sobre las células normales los cambios en la ME causados por el proceso de invasión.

La invasión de la ME por las células neoplásicas es un proceso localmente controlado, que consta de tres pasos: 1) las uniones células-ME se rompen mediante la proteólisis de la laminina y fibronectina, y de los otros componentes

de la ME que se encuentran en contacto con la célula; 2) la célula migra a través de las proteínas que se degradaron; y 3) se vuelven a establecer uniones con la ME, repitiéndose este ciclo una y otra vez (proteólisis, migración, unión, etc).<sup>48</sup>

En la "destrucción" de la ME, las células neoplásicas requieren de una serie de enzimas proteolíticas que degraden cada uno de los componentes de la ME. Las enzimas que se han involucrado en este proceso pueden dividirse en tres grupos: 1) las serinproteasas como la plasmina, elastasa, y catepsina G; 2) las cisteinproteasas como la catepsina B y D; y 3) las metaloproteasas de matriz (MMPs).<sup>44</sup> De estas enzimas las MMPs son las que se han encontrado con mayor frecuencia en asociación con el fenotipo invasivo de las células neoplásicas.

Las MMPs son un grupo de endopeptidasas dependientes de calcio y zinc, que se han clasificado en subgrupos en base a la especificidad con que degradan determinados sustratos en: colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelisin, elastasas, y una subclase que incluye miembros con características que no se habían observado en otras MMPs (Tabla 3).<sup>49-50</sup> Algunas de las enzimas que pertenecen a esta subclase poseen un dominio transmembranal permitiendo su localización en la membrana celular. Tal es el caso de las metaloproteasas de matriz de membrana MT-MMP-1, MT-MMP-2 y MT-MMP-3.<sup>51-53</sup> También se ha encontrado en algunas MMPs la presencia de una secuencia rica en residuos de aminoácidos básicos RXKR que corresponde al sitio de reconocimiento de la enzima furina.<sup>54</sup> Esta secuencia parece estar involucrada en la activación intracelular de la estromelisin-3, y en la activación

Tabla 3. La familia de las metaloproteasas de matriz (MMP).

Subgrupo	Nombre común	MMP	Activa	Mr	Latente	Substratos
Colagenasas Intersticiales	Colagenasa Intersticial-1	MMP-1	42 KD	52 KD		Clg I-III, VII, VIII.
	Colagenasa de Neutrofilo-2	MMP-8	46 KD	56 KD		
	Colagenasa-3	MMP-13	65 KD	75 KD		Clg I-III
	Estromelisinina-1	MMP-3	nd	54 KD		Clg I, II
	Estromelisinina-2	MMP-10	45 KD	56 KD		LMN, FBN, elastina
	Matrilisinina	MMP-7	28 KD 55 KD	59 KD 60 KD		promMMPs Igual que MMP-3
Gelatinasas	Estromelisinina-3	MMP-11	19 KD	28 KD		FBN, LMN, clg IV, gel, promMMPs, PrG, elastina
	Gelatinasa A	MMP-2	—	29 KD		alfa-1-antitripsina
	Gelatinasa B	MMP-9	62 KD	72 KD		Clg IV, V, gel
Elastasas	Metaloelastasa	MMP-12	84 KD	92 KD		Clg IV, V, gel
	MT-MMP-1	MMP-14	nd	53 KD		Elastina
	MT-MMP-2	?	—	66 KD		promMMP-2
	MT-MMP-3	?	—	76 KD		?
MMP de membrana				70 KD		promMMP-2

Clg = colágena, FBN = fibronectina, LMN = laminina, gel = gelatina, PrG = proteoglicanos

de las MMPs de membrana. Este hallazgo rompe con el mito de que todas las MMPs se secretan como zimógenos requiriéndose para su activación de la hidrólisis del extremo amino en el espacio extracelular.

La actividad de estas enzimas la regulan inhibidores específicos extracelulares que se conocen como TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) los cuales se unen a las formas activas de las enzimas en una relación estequiométrica de 1:1.<sup>55,56</sup> Se han identificado hasta el momento tres de estos inhibidores. TIMP-1, una glicoproteína soluble de 28 kD que inhibe la actividad de MMP-9, MMP-1 y MMP-3. Este inhibidor se ha encontrado unido también a proMMP-9 participando probablemente en la activación de esta enzima junto con la estromelina.<sup>57</sup> Un segundo inhibidor es TIMP-2, el cual es una proteína soluble no glicosilada de 21 kD que bloquea la actividad de MMP-2. A este inhibidor se le ha encontrado también formando parte del complejo proMMP-2, TIMP-2, y MT-MMP-1 en las membranas plasmáticas de algunas células donde su función parece ser la activación de proMMP-2.<sup>58</sup> Por último se ha identificado un tercer inhibidor de MMPs, el TIMP-3, una proteína de 21 kD, que se encuentra unida a la ME.<sup>59</sup> Esta proteína parece también promover la expresión del fenotipo tumorigénico (células transformadas), al incrementar el desprendimiento de las células de la matriz extracelular, además de aumentar su capacidad de proliferación.

La expresión de la mayoría de los miembros de la familia de las MMPs, se ha demostrado en diferentes tipos de cáncer utilizándose tanto anticuerpos monoclonales contra estas enzimas, o mediante la identificación del ARNm

correspondiente. Así se ha identificado la presencia por ejemplo, de colagenasa tipo I en carcinoma de colón y neoplasias de cabeza y cuello;<sup>60-62</sup> las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente) en carcinoma de mama, piel, colón y próstata;<sup>63-66</sup> las estromelisininas en neoplasias de cabeza y cuello, cáncer de mama y en carcinoma de células basales;<sup>62,67,68</sup> la matrilisina en cáncer gástrico, de colón y próstata.<sup>69-71</sup> Aunque algunas MMPs se expresan preferentemente en un tipo determinado de neoplasia como la estromelisinina en el cáncer de mama y la matrilisina en el cáncer gástrico, esto no significa que exista una relación específica. Lo que se ha encontrado, es un aumento de los niveles de MMPs asociado a la recurrencia local de la neoplasia, a las metástasis a nódulos linfáticos o a distancia, y a un mal pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado, existe discrepancia en determinar cual es el origen celular de las MMPs, ya que éstas pueden provenir de las células neoplásicas o de las células inflamatorias y del estroma circunvecino, como es el caso de la colagenasa intersticial y la estromelisinina que se han identificado en los fibroblastos adyacentes a las células neoplásicas, o por el contrario, la gelatinasa A así como la matrilisina que se han detectado preferentemente en las células neoplásicas de origen epitelial.<sup>67,72-74</sup> Estos estudios indican que existen diferencias en los mecanismos que participan en la síntesis de las MMPs en las distintas neoplasias humanas. Además, parece existir una interacción entre las células neoplásicas y las células normales vecinas, participando las primeras en la síntesis y regulación de la actividad de la MMPs que proviene de las células normales.<sup>75</sup> Un ejemplo

de esto lo encontramos en el cáncer de células basales en piel donde las células neoplásicas producen un factor que estimula la síntesis de colagenasa intersticial, estromelisina y gelatinasa A por parte de los fibroblastos adyacentes.<sup>76,77</sup> Otra forma de interacción entre las células neoplásicas y las células normales se ha identificado en carcinoma de colón y mama, En estos tipos de cáncer se ha detectado por hibridación in situ la presencia del ARNm de la gelatinasa A en los fibroblastos mientras que por inmunohistoquímica la proteína se localizó en las células neoplásicas. Esto ha sugerido que las células neoplásicas almacenan la enzima vía un receptor de membrana específico.<sup>78,79</sup>

Los niveles de MMPs también se han querido utilizar para definir la agresividad de una neoplasia, particularmente los niveles de las gelatinasas A y B ya que estas enzimas tienen como uno de sus sustratos a la colágena tipo IV componente de las MBs. En este sentido se ha encontrado una correlación positiva entre la presencia de estas MMPs y la progresión del cáncer a estadios avanzados como en el caso del carcinoma de vejiga, el de próstata y el de mama.<sup>80-82</sup> Esta relación se ha corroborado también por estudios in vitro hechos con líneas celulares provenientes de neoplasias humanas y en células transformadas.<sup>28,83-88</sup> En estos trabajos se ha podido establecer una correlación entre el potencial invasivo de las células neoplásicas y la presencia de gelatinasas A y B.

En CAP se ha documentado la presencia de diferentes MMPs, sin embargo, existe discrepancia acerca del origen celular de estas enzimas (células neoplásicas vs.

células normales), y de su participación en el proceso metastásico.<sup>89,90</sup> Aunado a esto, la evidencia que existe en relación a la producción de MMPs y la capacidad metastásica de las diferentes estirpes histológicas de cáncer pulmonar es escasa y contradictoria.

En general, toda esta evidencia de la participación de la MMPs en la progresión de una neoplasia sugiere que para evitar las metástasis habría que inhibir de alguna manera, la actividad y de ser posible la síntesis, de estas enzimas. Sin embargo, dada la heterogeneidad de los mecanismos moleculares involucrados así como de las MMPs que participan en la progresión de los diferentes cánceres humanos, ha sido necesario estudiar cada neoplasia como una entidad independiente.

### La tesis

Como ya se mencionó, una de las principales causas de mortalidad en nuestro país es el cáncer pulmonar. Los pacientes con esta enfermedad cuando llegan al servicio clínico, la gran mayoría llega con metástasis óseas, a hígado, y/o a cerebro. A estos pacientes se les da tratamiento y en algunos casos el tumor primario casi llega a desaparecer mas no así las metástasis, muriendo los pacientes a consecuencia de éstas.

La metástasis es un fenómeno complejo que incluye numerosas interacciones entre diferentes células y componentes de la ME, lo cual ha hecho difícil comprender en su totalidad este proceso, mas si se quiere comprender utilizándo

sólo un tipo de metodología. Tal es el caso de la discrepancia en los resultados que se han obtenido de los estudios *in vitro*, y el comportamiento y propiedades de las células neoplásicas *in vivo*. Además, como regla general, los cánceres que derivan de diferentes estirpes histológicas, tienen una evolución y una respuesta al tratamiento diferente, y el CAP no es la excepción. El más agresivo de las estirpes histológicas más frecuentes de cáncer pulmonar, es el carcinoma de células pequeñas, ya que es de rápido crecimiento, encontrándose la mayoría de las veces metástasis en etapas tempranas, a hígado, cerebro, riñón y suprarrenales. A pesar de los avances en quimioterapia su pronóstico es muy pobre con una sobrevivida a 5 años en el 11 % de los casos. El adenocarcinoma pulmonar le sigue en agresividad. Este tipo de neoplasia es más frecuente en no fumadores y mujeres, aunque en los últimos años ha aumentado en la población masculina. Su localización es subpleural por lo que tiende a invadir pleura visceral, y dá metástasis hasta en un 80 % de los casos con una distribución similar al carcinoma de células pequeñas. Finalmente, el carcinoma epidermoide (el menos agresivo de las tres estirpes histológicas), originalmente se había asociado con el hábito de fumar, sin embargo en los últimos años ha registrado una disminución en su incidencia sin que esto quiera decir que la tasa de fumadores halla bajado. Este cáncer es de localización central y aunque tiende ha permanecer localizado en tórax puede dar metástasis a distancia. El carcinoma epidermoide es el cáncer pulmonar con mejor pronóstico con una sobrevivida a 5 años en un 60 % de los



casos. Estos tres tipos constituyen más del 90 % de todos los cánceres primarios de pulmón.<sup>91</sup>

Para entender cuales son los mecanismos que hacen que la célula neoplásica, en este caso, derivada de un cáncer pulmonar, llegue a establecer una colonia metastásica es necesario estudiar no sólo al cáncer pulmonar de manera independiente, sino a cada uno de los tipos histológicos más frecuentes.

En esta tesis se evaluó la capacidad de las células neoplásicas pulmonares de producir diferentes MMPs, el estado metabólico en que estas enzimas se encontraban y la influencia de la ME en la capacidad de migración de las células neoplásicas. Los estudios se realizaron con líneas celulares derivadas de diferentes estirpes histológicas de cáncer pulmonar humano.

### Hipótesis

1. La capacidad de invasión de los diferentes tipos histológicos de cáncer pulmonar está directamente en correlación con la actividad de las enzimas que degradan las proteínas de la matriz extracelular.
2. La interacción de la matriz extracelular con la célula neoplásica influye en la actividad de las metaloproteasas de matriz, que a su vez favorecen la capacidad de invasión de las células.

## Objetivos

1. En células neoplásicas provenientes de carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma epidermoide, determinar la presencia y actividad enzimática de las metaloproteasas de matriz que degradan componentes de las membranas basales y de la matriz intersticial.
2. Determinar si existe una correlación entre la capacidad de invasión de las células neoplásicas derivadas de cáncer pulmonar en un modelo *in vitro* de invasión, y la actividad de la metaloproteasas de matriz.
3. Determinar si existen diferencias en la actividad de la metaloproteasas de matriz de diferentes estirpes celulares de cáncer pulmonar, al encontrarse las células neoplásicas en contacto con diferentes moléculas de la matriz extracelular.

## Material y métodos

### Cultivo de células

Se utilizaron células neoplásicas humanas de la American Type Culture Collection (ATCC, USA), que corresponden a adenocarcinoma pulmonar (A-427, y SKLU-1), carcinoma epidermoide pulmonar (SKMES-1, y CALU-1), y carcinoma de células pequeñas (NCI-H69). Como células controles se utilizaron fibroblastos (MRC-5) y células epiteliales de amnios (WISH). Las células se cultivaron en cajas de 75 cm<sup>2</sup>, medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino, suplementado con aminoácidos esenciales, 50 µg/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomicina, en

una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez que se obtuvieron 2.5 x 10<sup>6</sup> células, éstas se utilizaron para los siguientes ensayos: actividad enzimática de colagenasa intersticial, actividad enzimática de gelatinasa, determinación de la presencia de MMPs y de sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2), ensayos de invasión en un modelo *in vitro*, subcultivo de las células en presencia de diferentes componentes de la ME.

#### Ensayo de actividad colagenolítica intersticial

Para este ensayo, al obtenerse 2.5 x 10<sup>6</sup> células, el medio de cultivo se sustituyó por medio libre de suero, y se cultivaron las células en estas condiciones por 24 horas. Al cabo de este tiempo se separó el medio de cultivo de las células por centrifugación a 5 000 x g por 10 minutos. El medio se concentró 10 veces en una liofilizadora (Labconco Lyph-Lock 4.5L). Las células se lizaron con Tritón X-100 al 0.1% a 4°C por 1 hora. Las células lizadas y el medio de cultivo se dializaron contra un buffer que contenía Tris-HCl 0.15 M, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 20 mM y 0.02% de azida de sodio, a un pH de 7.4 (buffer TNC). Posteriormente se les midió proteína por el método de Bradford.<sup>92</sup>

La actividad colagenolítica presente en las muestras de medio de cultivo y en los extractos celulares (EC), se cuantificó por el método de Terato y col<sup>93</sup> que usa como sustrato colágena humana tipo I marcada con <sup>3</sup>H-anhidrido acético (Amersham International).<sup>94,95</sup> Cinco microgramos de proteína tanto de los medios concentrados como de los EC, se incubaron con 20 µg de colágena tipo I tritiada (actividad específica 1.5 x 10<sup>6</sup> dpm/mg), en presencia del buffer TNC, en

presencia o ausencia de EDTA 80 mM (concentración final), a 30°C por 24 horas. Como controles se utilizaron colágena radiactiva con buffer TNC, como blanco, y colágena en presencia de colagenasa de clostridium (Sigma) (1 mg/ml), como control positivo. Para inhibir la actividad de otras proteasas diferentes a colagenasa se utilizaron 0.1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) y 2.5 M de N-etil-maleimida (NEM). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La reacción se paró al agregar EDTA a una concentración final de 80 mM. Las muestras se centrifugaron a una velocidad de 10 000 x g por 10 minutos y se tomó una alícuota del sobrenadante para contarla en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman LS-100). Se consideró como actividad colagenolítica a la degradación de colágena radiactiva inhibible con EDTA y los resultados se expresaron en microgramos de colágena degradada/5 µg de proteína incubada. Para detectar actividad colagenolítica latente las muestras se incubaron con acetato de *p*-aminophenylmercurio (APMA) a una concentración final de 1 mM, en las condiciones que arriba se señalan.

#### Ensayo de actividad gelatinolítica

La actividad gelatinolítica se cuantificó en los medios de cultivo y EC, por medio del método de Sunada y Nagai,<sup>96</sup> Con esta técnica se puede detectar la actividad gelatinolítica de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Cinco microgramos de proteína de cada muestra se incubaron con 20 µg de gelatina tritiada, la cual se preparó a partir de colágena tipo I por desnaturalización térmica (actividad específica de  $1.7 \times 10^6$  dpm/mg). La incubación se llevó acabo por 24 horas a

37°C en presencia de buffer TNC, y en ausencia y presencia de EDTA 80 mM (concentración final). Como controles se usaron gelatina radiactiva en presencia de buffer TNC, y gelatina radiactiva incubada con colagenasa de clostridium (1mg/ml) como control positivo. Los ensayos se hicieron por triplicado. La reacción se paró con 80 mM de EDTA, y la gelatina que no se degradó durante el ensayo se precipitó con una mezcla de dioxano-metanol 1:4 a 4°C durante una hora. Las muestras se centrifugaron a 10 000 x g, se tomó una alícuota de cada una y se contó en el espectrofotómetro de centelleo. Se consideró como actividad gelatinolítica a la degradación de gelatina-<sup>3</sup>H inhibible por EDTA. Los resultados se expresaron como microgramos de gelatina degradada/5 µg de proteína incubada. Se utilizó APMA a una concentración final de 0.1 mM para detectar la presencia de enzima latente.

#### Zimografía en geles de gelatina y caseína

Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 8 % con SDS de acuerdo a la técnica de Laemmli<sup>97</sup> en geles de 8 x 7 cm (Hoefer), para determinar cuales MMPs se encontraban presentes y que tuvieran actividad gelatinolítica o caseinolítica. Estos geles se prepararon de acuerdo a la técnica estándar sólo que se les incorpora gelatina tipo I de piel de cerdo al 0.1 % (para gelatinasas), o caseína al 0.1 % (para estromelisin).<sup>98</sup> Se agregaron 5 µg de proteína de cada muestra en condiciones no desnaturalizantes y se dejaron correr a una corriente constante de 10 mA. al terminar la electroforesis, los geles de gelatina se lavaron con Tritón al 2.5 %, y los de caseína se lavaron con Tritón 2.5%-EDTA 10 mM

por 30 minutos a temperatura ambiente. Los geles de gelatina se incubaron en presencia del buffer de TNC a 37°C por 24 horas, mientras que los geles de caseína se incubaron en TNC-EDTA 10 mM a 37°C por 48 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250; en cada gel se incluyó un estándar de marcadores de peso molecular preteñidos (Sigma). En un gel paralelo se corrieron gelatinasas A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9) (Triple Point), junto con los marcadores preteñidos. Para comprobar que la actividad se debe a metaloproteasas las muestras se corrieron también en presencia de EDTA 10 mM. La actividad gelatinolítica se detectó en esta técnica como bandas transparentes sobre un fondo oscuro.

#### Análisis por inmunocitoquímica

La presencia de metaloproteasas se evaluó utilizando anticuerpos policlonales anti-MMP-2 (A-45),<sup>99</sup> anti-MMP-9 (A-110),<sup>100</sup> y anti-TIMP-2.<sup>101</sup> (regalo del Dr. Stetler-Stevenson, del National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA). Se utilizó para las inmunotinciones la técnica de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector). El ensayo se realizó en células puestas en cultivo sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina (Sigma). Estos cubreobjetos con células se lavaron con PBS-BSA al 0.1 %, y luego se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 2% en metanol por 30 minutos. Los cubreobjetos posteriormente se incubaron con suero normal de cabra por 45 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron los anticuerpos primarios en las siguientes diluciones: anti-MMP-2 a 1:3000, anti-MMP-9 a 1:3000, y anti-

TIMP-2 a 1:500, incubándose durante la noche a 4°C. Se agregó el anticuerpo secundario biotinilado incubándose por 45 minutos y después, se incubó con el complejo avidina-peroxidasa por 45 minutos. Finalmente las células se incubaron con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno, y se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Se utilizaron como controles negativos células a las que se les incubó con IgG no inmune que reemplazó al anticuerpo primario.

#### Análisis por Western Blot

Se corrieron 15 µg de proteína de cada muestra (medios y EC), en geles de poliacrilamida-SDS al 8% de acuerdo a la técnica de Laemmli.<sup>97</sup> Para la visualización de MMP-9 las muestras se corrieron en condiciones no desnaturizantes, y para la detección de las otras MMPs, las muestras se desnaturizaron con 5 % de mercaptoetanol a ebullición por 5 minutos. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se colocaron en leche descremada al 2.5 % en un buffer de Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.1 %, pH 7.5 (buffer de TTBS) por 1 hora. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales primarios por 90 minutos a temperatura ambiente. Las concentraciones a las que se utilizaron los anticuerpos fueron las siguientes: anti-MMP-2 (Ab-1) 1 µg/ml, anti-MMP-9 (AB-1) 1µg/ml, y anti-TIMP-1 1 µg/ml (Calbiochem-Novabiochem International). El anticuerpo que no se unió a su antígeno se quitó lavando las membranas con el buffer de TTBS. Los anticuerpos primarios se detectaron usando un kit de avidina-biotina-peroxidasa (VectaStain ABC kit). Como controles

se usaron proteínas recombinantes de origen humano TIMP-1 y TIMP-2 (Calbiochem-Novabiochem International).

#### Ensayo de invasión in vitro

El ensayo que se hizo es una modificación del método utilizado por Albini et al.<sup>102</sup>

Se cultivaron las células en cajas de 25 cm<sup>2</sup> hasta llegar a subconfluencia. En ese momento se les agregó 20  $\mu$ Ci de timidina-<sup>3</sup>H y se continuó el cultivo hasta que llegaron las células a confluencia ( $8.3 \times 10^5$  células). Las células se tripsinizaron, y se lavaron por 2 ocasiones para eliminar la marca que no se incorporó, y se resuspendieron en medio de cultivo con suero fetal bovino al 1 %. Se tomó una alícuota para determinar la cantidad de Timidina-<sup>3</sup>H que se incorporó a las células, cantidad que se tomó como el 100 % de incorporación. Después de medir la viabilidad de las células con azul tripan, se subcultivaron en transwells de 6.5 mm de diámetro con un poro de 8  $\mu$ m. Estos transwell se habían cubierto la noche anterior con 100  $\mu$ l de Matrigel (Collaborative Research). Antes de colocar las células, el Matrigel se hidrató con medio de cultivo frío, con 1 % de suero fetal bovino. Se colocaron en cada transwell alrededor de  $5 \times 10^4$  células. 5  $\mu$ g de fibronectina (Sigma) en 0.5ml de medio con 1 % de suero fetal se colocaron en el compartimiento inferior para que funcionara como quimioattractante. El ensayo se realizó a diferentes tiempos: 1.5, 3, 6, 12, 18 y 24 horas. Al final de los períodos de incubación se tomó el medio de la parte superior del transwell, el matrigel y el medio de la cámara inferior. Los medios se centrifugaron a 2 000 x g por 10 minutos y las células se lizaron con Tritón X-100 al 0.1% a 4°C por 1 hora. Para



extraer las células atrapadas en el Matrigel, se le agregó Tritón X-100 al 0.1 % a 4°C por 1 hora. Después se colocó a -70°C por 1 hora y se descongeló rápidamente, repitiendo esta operación por 2 ocasiones. Cada ensayo se hizo por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentajes de células presentes en los diferentes compartimientos utilizándose como 100 % el total de cpm y células colocadas al inicio del estudio.

#### Cultivo de células en presencia de diferentes sustratos

Las células se cultivaron en cajas de 25 cm<sup>2</sup> hasta llegar a confluencia. Se tripsinizaron, se lavaron por dos ocasiones con medio sin suero y se resuspendieron en medio con 1 % de suero fetal bovino. 5 x 10<sup>4</sup> células se colocaron en cajas de 24 pozos que contenían colágena tipo I (1 mg/ml), colágena tipo IV (1 mg/ml), gelatina (1 mg/ml), elastina (2mg/ml) o Matrigel (200 µl). Como controles se cultivaron las células en pozos que contenían medio con 1 % de suero fetal, y cada uno de los sustratos solos en presencia del mismo medio. Cada pozo del ensayo se hizo por triplicado. Las células se dejaron en cultivo por 24 horas al cabo de las cuales se tomó el medio de cultivo, se centrifugó a 10 000 x g por 10 minutos y a los sobrenadantes se les determinó proteínas. Con estos sobrenadantes se hicieron zimogramas y ensayos de actividad gelatinolítica con gelatina radiactiva, utilizándose para cada ensayo 10 µg de proteína de cada muestra.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por la prueba de la U de Mann-Witney y se expresaron como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Las probabilidades de 0.05 o menores se consideraron como significativas.

### Resultados

#### Actividad colagenolítica intersticial

Se detectó actividad colagenolítica en todos los medios y extractos celulares de las células que se estudiaron, con excepción de los medios de CALU-1 (tabla 4). Con respecto a los medios, las células que presentaron mayor actividad fueron las A-427 ( $115.8 \pm 40.3$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada), con respecto a SKMES-1, SKLU-1 y NCI-H69 ( respectivamente:  $38.5 \pm 16.0$ ,  $21.0 \pm 9.0$  y  $18.9 \pm 5.4$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada) ( $p = 0.03$ ). Con la utilización del APMA se logró sólo significativamente activar la enzima presente en el medio de CALU-1 de cero actividad a  $6.9 \pm 3.0$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada ( $p < 0.03$ ).

En relación con los extractos celulares, los que mayor actividad colagenolítica tuvieron fueron los correspondientes a SKMES-1 ( $20.1 \pm 1.1$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada) ( $p < 0.03$ ). Con APMA sólo se logró aumentar significativamente la actividad colagenolítica en el caso de CALU-1 ( $2.6 \pm 0.6$  contra  $13.6 \pm 3.6$   $\mu\text{g}$  de colágena degrada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada, sin y

**Tabla 4. Actividad colagenolítica de células neoplásicas pulmonares.**

Células	Actividad colágenolítica*	
	sin APMA	con APMA
<b>CALU-1</b>		
Medio (n = 12)	0	6.9 ± 3.0
Extractos celulares (n = 8)	2.6 ± 0.6	13.6 ± 3.6
<b>SKMES-1</b>		
Medio (n = 6)	38.5 ± 16.0	44.0 ± 2.1
Extractos celulares (n = 8)	20.1 ± 1.1	20.1 ± 1.1
<b>NCI-H69</b>		
Medio (n = 12)	18.9 ± 5.4	20.9 ± 5.6
Extractos celulares (n = 10)	13.1 ± 4.2	13.1 ± 4.2
<b>A-427</b>		
Medio (n = 8)	115.8 ± 40.3	115.8 ± 40.3
Extractos celulares (n = 12)	4.1 ± 1.3	9.1 ± 3.0
<b>SKLU-1</b>		
Medio (n = 10)	21.0 ± 9.0	32.8 ± 10.9
Extractos celulares (n = 8)	9.7 ± 2.4	9.7 ± 2.4

\*Los valores se expresan en microgramos de colágena tipo I degradada/ 5 µg de proteína de cada muestra incubada.

Todos los valores se expresan como promedio ± desviación estándar

con APMA respectivamente) ( $p < 0.03$ ), y de A-427 ( $4.1 \pm 1.3$  contra  $9.1 \pm 3.0$   $\mu\text{g}$  de colágena degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada, sin y con APMA respectivamente) ( $p < 0.05$ ).

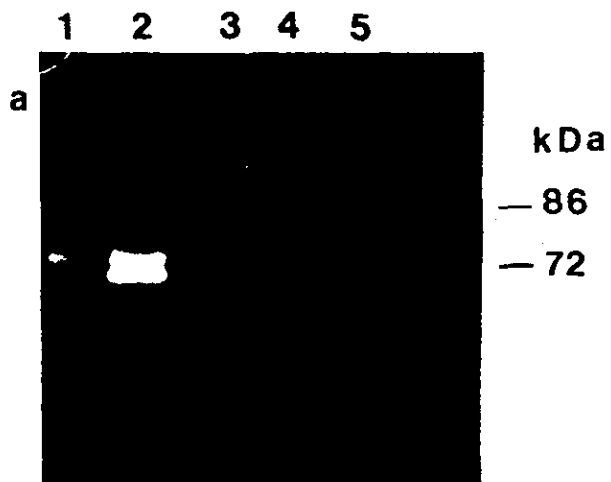
#### Actividad gelatinolítica y caseinolítica

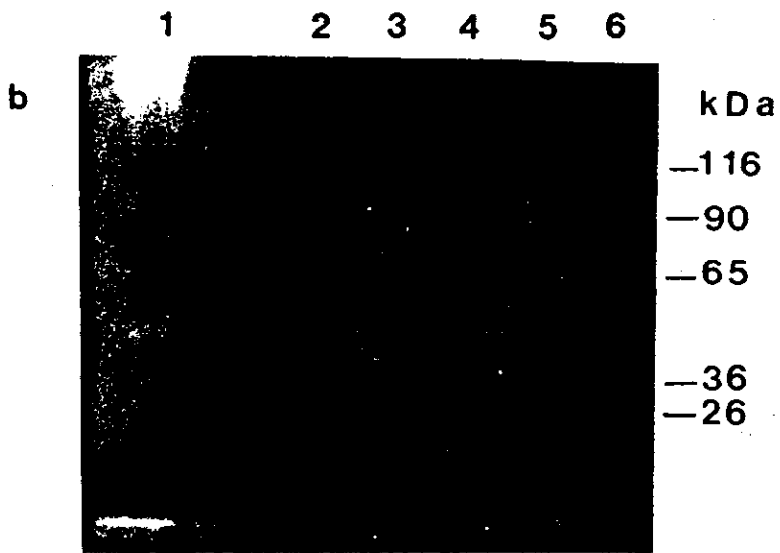
La actividad gelatinolítica de las MMPs se estudió en los medios y extractos celulares por medio de ensayos con gelatina- $^3\text{H}$  y por medio del zimograma. Mediante el zimograma se detectaron en los medios de CALU-1 y SKMES-1, dos bandas de lisis con un peso molecular aproximado de  $72$  y  $62$  kD (Fig 2a). Estas bandas podrían corresponder a la proenzima y a la forma activa de MMP-2 respectivamente. La actividad de estas bandas fue más intensa en los medios de SKMES-1. En los medios de las otras líneas celulares no fue posible detectar actividad gelatinolítica mediante esta técnica. La actividad gelatinolítica fue posible inhibirla con EDTA  $10$  mM (Fig 2b). En los extractos celulares no fue posible observar actividad gelatinolítica por zimograma (Fig 2c). Así mismo, el uso de APMA no reveló ninguna diferencia en la actividad tanto de los medios como de los extractos celulares.

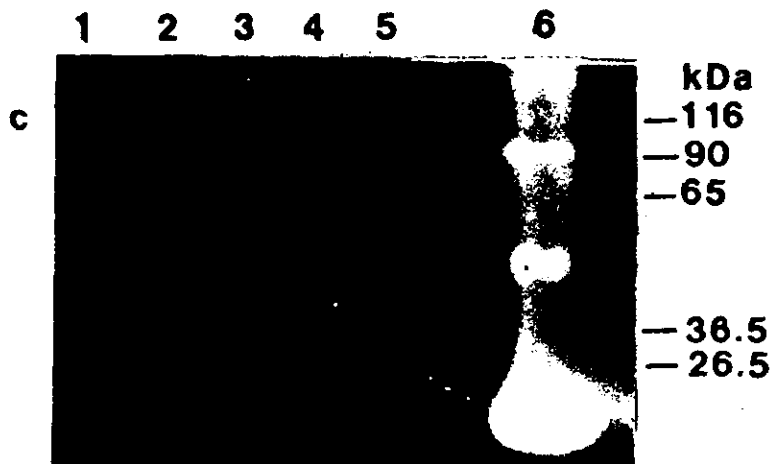
Por el contrario, el uso de sustrato radiactivo permitió detectar actividad gelatinolítica en todas las muestras que se estudiaron (tabla 5). Con respecto a los medios, la actividad enzimática que se encontró en el medio de las células NCI-H69 fue la menor en comparación con la que se encontró en los medios de las otras líneas celulares ( $0.4 \pm 0.1$   $\mu\text{g}$  de gelatina degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada contra  $1.4 \pm 0.5$ ,  $1.7 \pm 0.4$ , y  $1.6 \pm 0.1$   $\mu\text{g}$  de gelatina degradada/  $5$   $\mu\text{g}$

**Figura 2. Zimograma de gelatina de los medios de cultivo y extractos celulares de células neoplásicas pulmonares.**

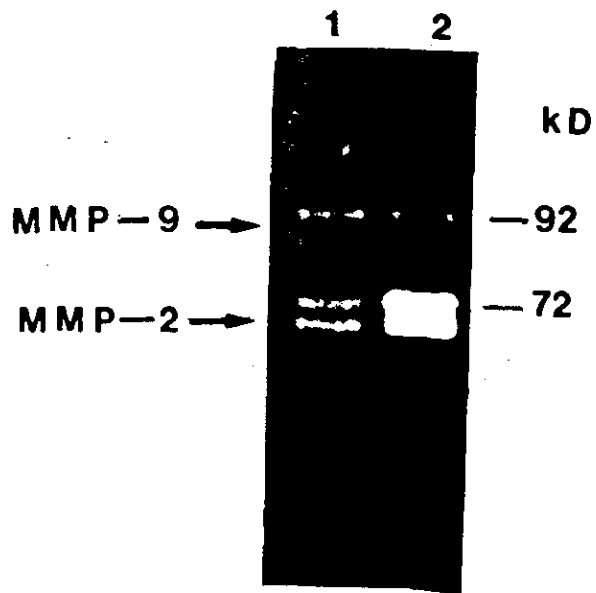
El zimograma se hizo colocando en cada carril 5  $\mu\text{g}$  de proteína a cada carril. a) MMP-2 se detectó en el medio de SKMES-1 (carril 2) y con una menor intensidad en CALU-1 (carril 1). En las otras muestras no fue posible observar actividad gelatinolítica. (NCI-H69, carril 3; A-427, carril 4; SKLU-1, carril 5). b) La actividad gelatinolítica se inhibió por completo con EDTA. En el carril 1 se pusieron 5  $\mu\text{g}$  de tripsina como control. c) Los extractos celulares no presentaron actividad aunque fueron preincubados APMA. En el carril 6 se pusieron 5  $\mu\text{g}$  de tripsina como control. d) Se corrieron 5 y 10  $\mu\text{g}$  (carriles 1 y 2 respectivamente) de MMP-2 y MMP-9 como controles. Los pesos moleculares se indican a la derecha de las figuras.











**Tabla 5. Actividad gelatinolítica en líneas de cáncer pulmonar**

Células	Actividad gelatinolítica*	
	sin APMA	con APMA
<b>CALU-1</b>		
Medio (n = 9)	1.0 ± 0.7	1.1 ± 0.5
Extractos celulares (n = 12)	1.3 ± 0.1	1.5 ± 1.0
<b>SKMES-1</b>		
Medio (n = 9)	1.4 ± 0.5	1.9 ± 0.3
Extractos celulares (n = 12)	0.9 ± 0.4	2.0 ± 0.5
<b>NCI-H69</b>		
Medio (n = 15)	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3
Extractos celulares (n = 12)	2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.6
<b>A-427</b>		
Medio (n = 12)	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.4
Extractos celulares (n = 15)	1.1 ± 0.4	1.9 ± 0.1
<b>SKLU-1</b>		
Medio (n = 18)	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Extractos celulares (n = 18)	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2

\*Los valores se expresan en microgramos de gelatina degradada / 5 µg de proteína incubada.

Todos los valores se expresaron como promedio ± desviación estándar.

de proteína incubada que corresponde a SKMES-1, A-427 y SKLU-1 respectivamente;  $p < 0.04$ ). Con el empleo de APMA no se logró una mayor actividad enzimática que fuera estadísticamente significativa.

Por otro lado, los extractos celulares correspondientes a las células NCI-H69 tuvieron la actividad gelatinolítica más alta al compararla con los extractos de las otras líneas celulares ( $2.4 \pm 0.1$   $\mu\text{g}$  de gelatina degradada/  $5$   $\mu\text{g}$  de proteína incubada;  $p < 0.05$ ). Un aumento del doble de actividad se obtuvo en las muestras correspondientes a SKMES-1 y A-427 cuando las muestras se incubaron con APMA. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la actividad gelatinolítica de las 5 líneas celulares al usar este activador.

En los zimogramas de caseína no pudo observarse ninguna banda de degradación ni en los extractos celulares ni en los medios de cultivo. En la figura 3 se muestra el zimograma de caseína correspondiente a los extractos celulares.

#### Inmunocitoquímica

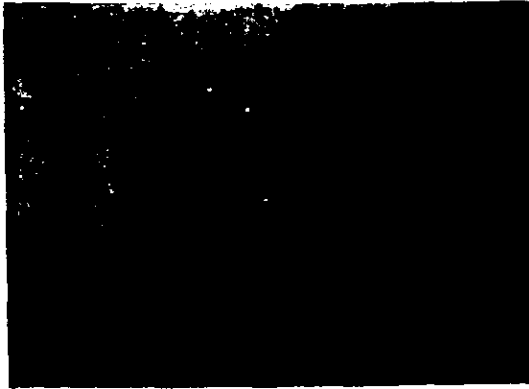
Para la identificación de cuales MMPs estaban involucradas en la degradación de colágena tipo I y gelatina, se utilizaron anticuerpos contra MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 tanto en cultivo de células como en Western blots.

Por medio de tinciones con inmunoperoxidasa, sólo se pudo detectar una ligera tinción para MMP-1 en el caso de las células de carcinoma epidermoide CALU-1 y SKMES-1, y de las células de carcinoma de células pequeñas, NCI-H69 (Fig 4). No hubo tinción para este anticuerpo en las células correspondientes a adenocarcinomas.

**Figura 3. Zimograma de caseína de los extractos celulares.**

A geles de poliacrilamida-SDS se les incorporó 0.1 % de caseína para detectar la actividad de MMP-3. Cinco microgramos de proteína de cada muestra se colocaron por carril. No se pudo detectar actividad caseinolítica en ninguna de las muestras que se ensayaron (medios y extractos celulares). En esta figura se muestra el análisis correspondiente a los extractos celulares: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1, carril 6, 5 µg de tripsina. Los pesos moleculares se encuentran indicados de lado derecho de la figura.

1 2 3 4 5 6



kD  
—116  
—65  
—20

Al utilizar el anticuerpo anti-MMP-3 se encontró una tinción muy intensa en el citoplasma de las líneas A-427 y SKLU-1 (adenocarcinomas), y menor para SKMES-1 y CALU-1. NCI-H69 mostró una tinción muy ténue para esta MMP (Fig 5).

MMP-2 se detectó en todas las células que se tiñieron para este anticuerpo detectándose mayor intensidad en la tinción en SKMES-1 y A-427 (Fig 6).

Las tinciones para MMP-9 se caracterizaron por una fuerte tinción presente en las células NCI-H69 y A-427, aunque una menor tinción se encontró en las otras líneas celulares (Fig 7).

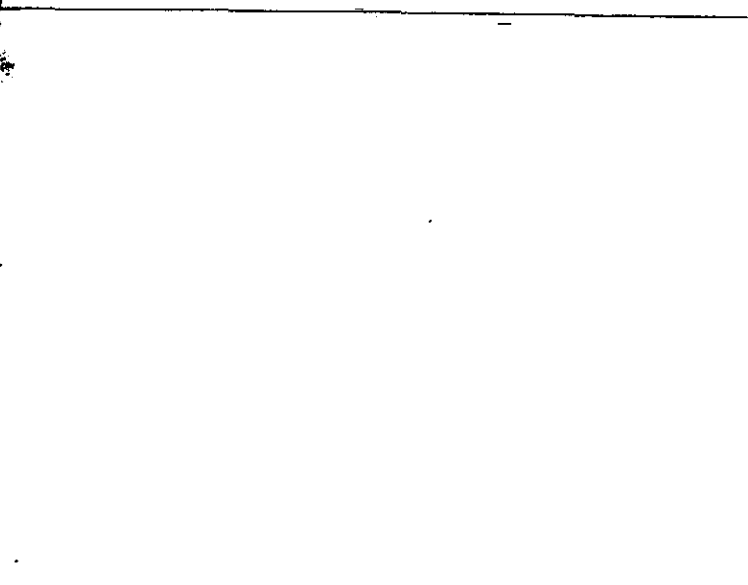
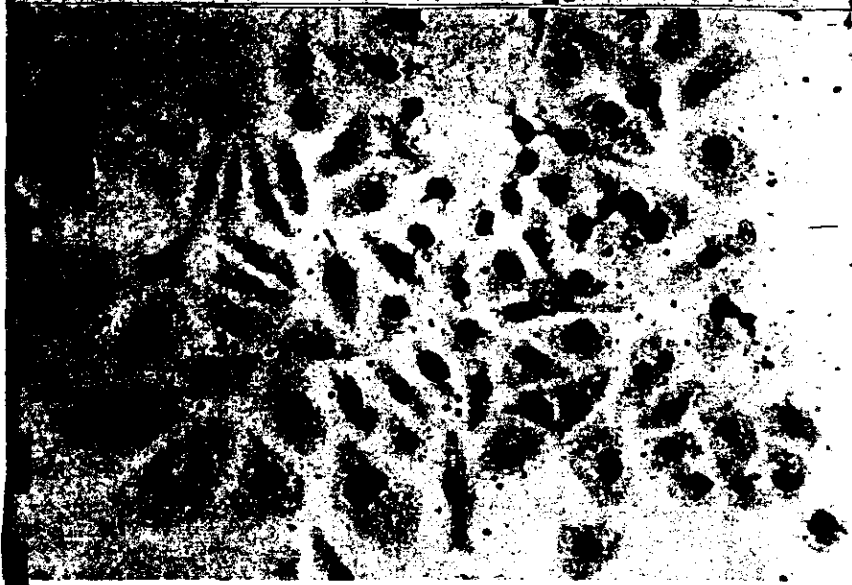
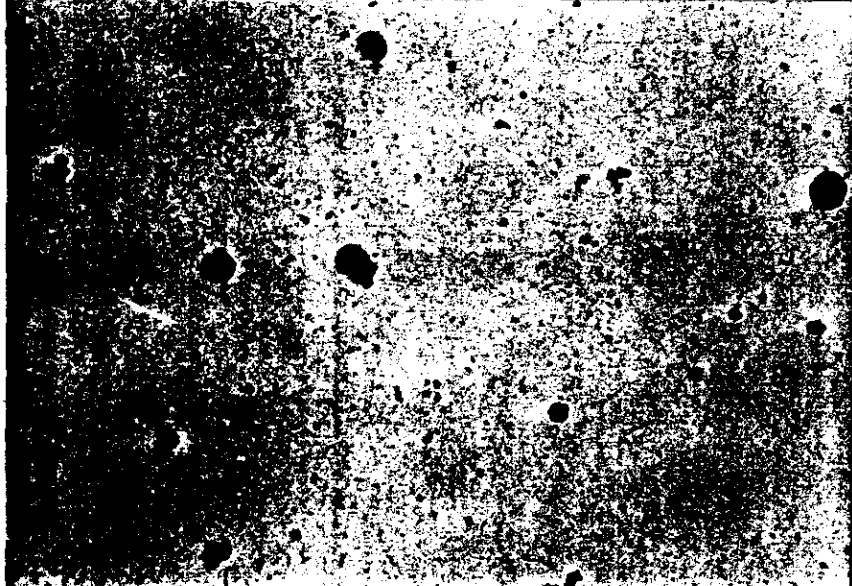
Las tinciones para TIMP-2 demostraron la presencia de este inhibidor en todas las células con excepción de CALU-1 donde sólo se tiñieron escasamente algunas células (Fig 8).

#### Western blots

Las muestras correspondientes a los medios y extractos celulares se analizaron por medio de la técnica de Western blot utilizándose anticuerpos monoclonales específicos contra varias MMPs. Con el anticuerpo contra MMP-1 se identificó una banda de 53 kD en los extractos celulares de CALU-1 y NCI-H69 (Fig 9), que pudiera corresponder a la forma latente de esta enzima. En los extractos celulares y en los medios de cultivo de las otras líneas celulares no se pudo detectar ninguna banda al usar este anticuerpo.

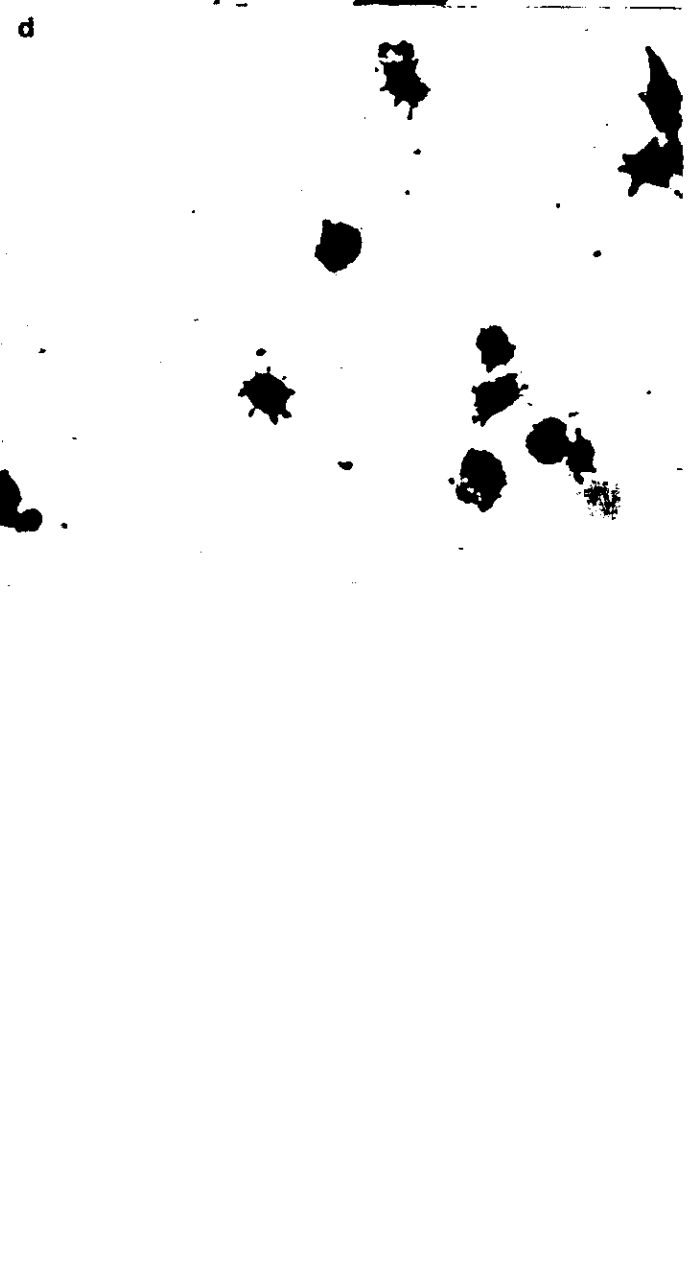
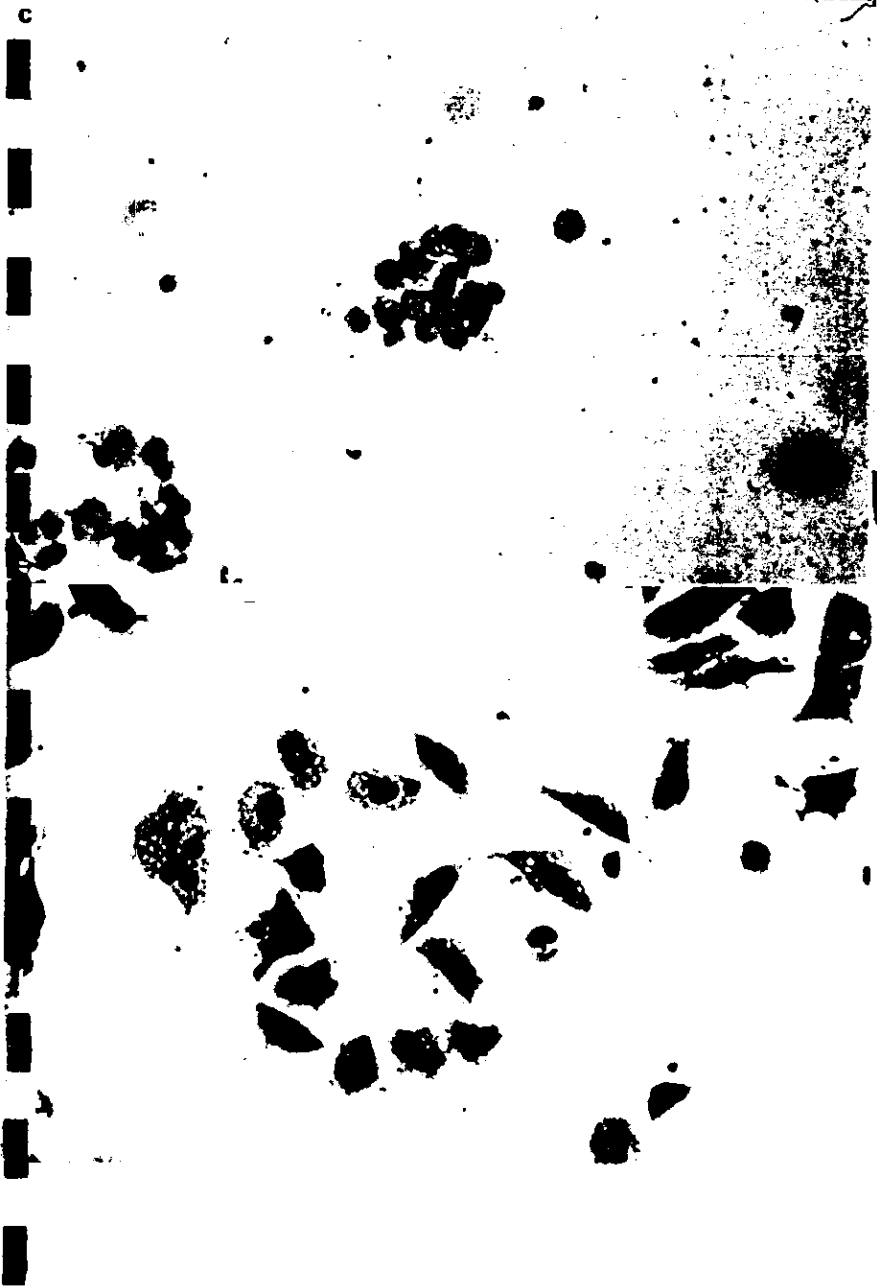
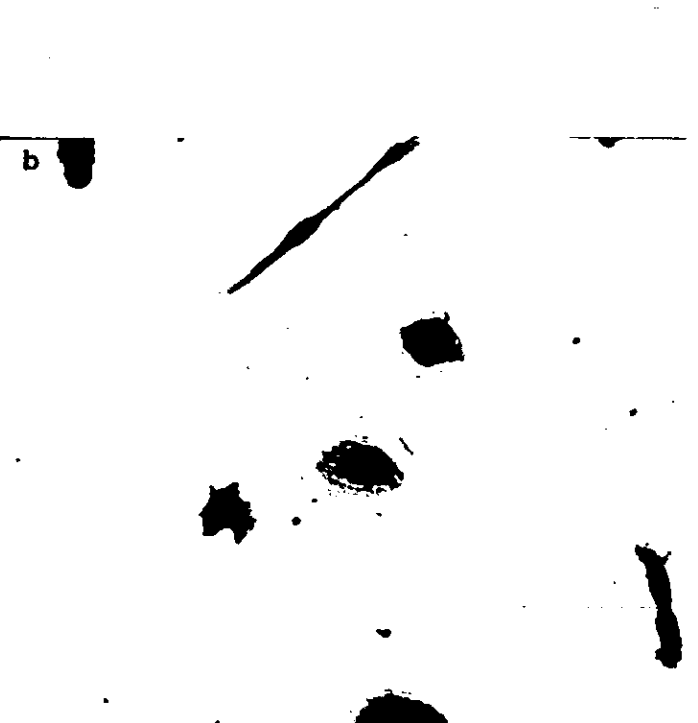
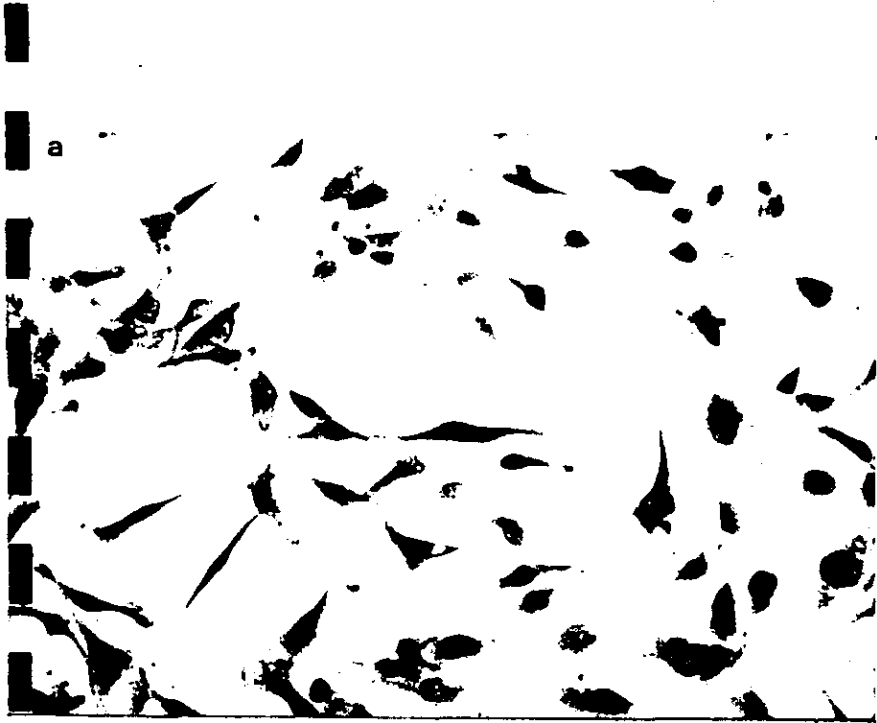
En los Westerns hechos para detectar MMP-3, se observó una banda de 58 kD en los extractos celulares de CALU-1, NCI-H69 y SKLU-1 que correspondería a pro-

**Fig 4. Estudios de inmunocitoquímica de MMP-1. La localización de MMP-1 se realizó en cultivos de células neoplásicas pulmonares en cubre objetos cubiertos con poli-L-lisina. Soló se pudo localizar MMP-1 en CALU-1 (a), SKMES-1 (b) y NCI-H69 (c). Los adenocarcinomas A-427 (d) y SKLU-1 (e), no mostraron tinción para este anticuerpo. x 200 (amplificación).**

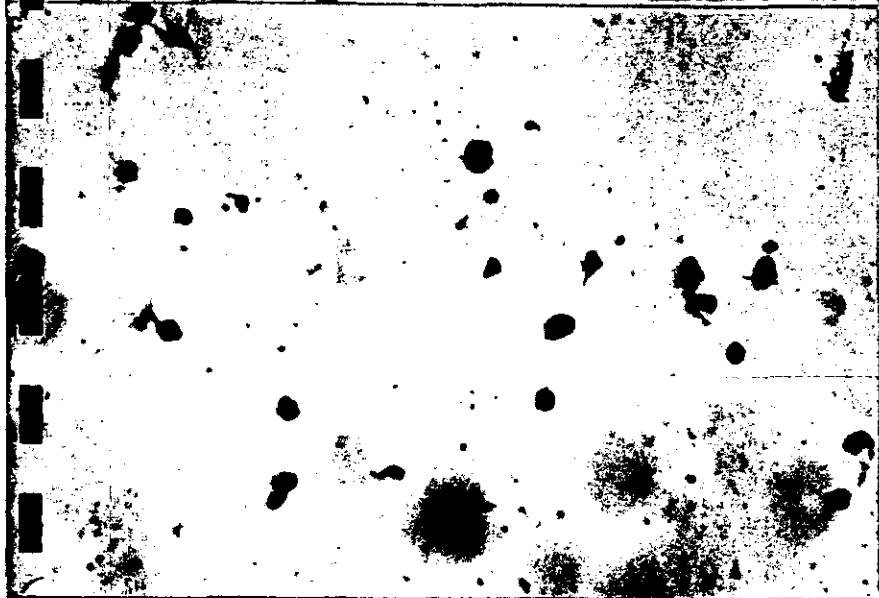
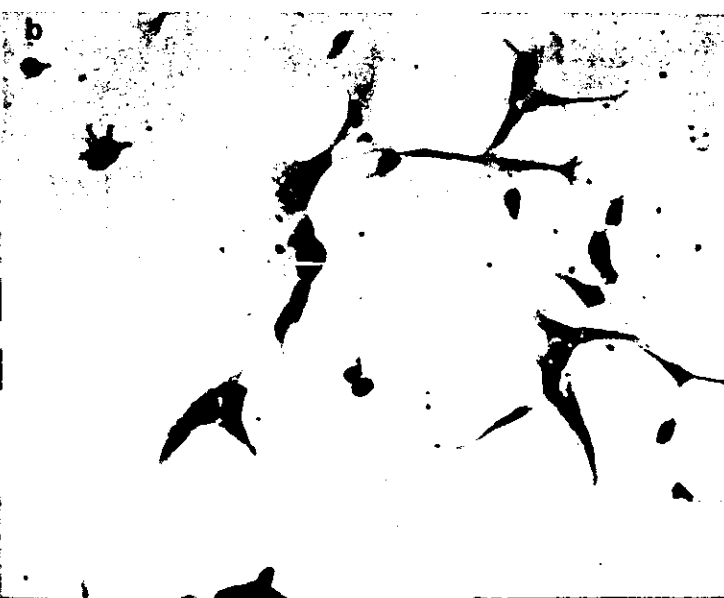
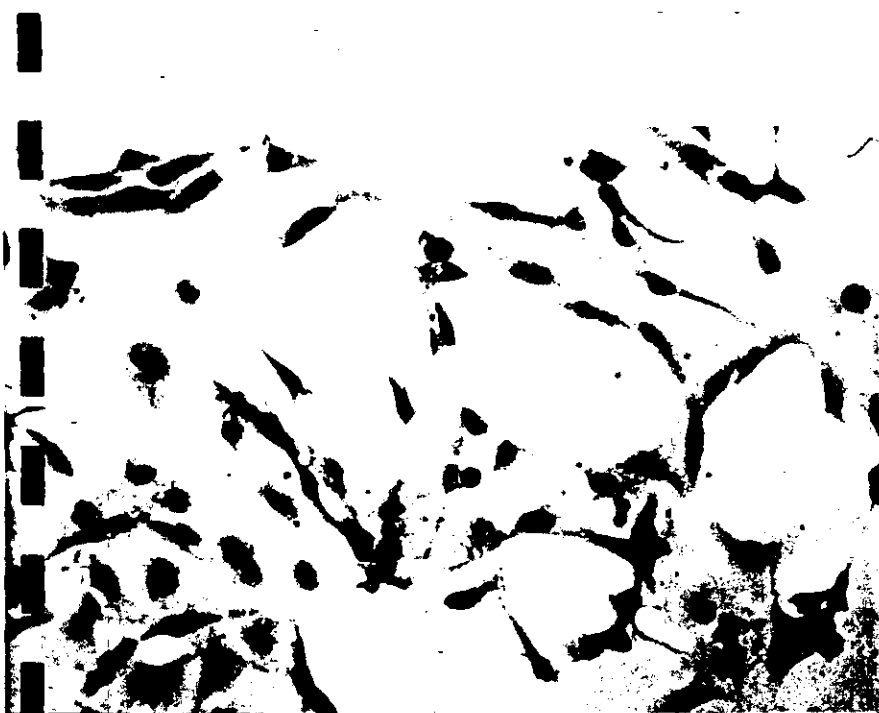




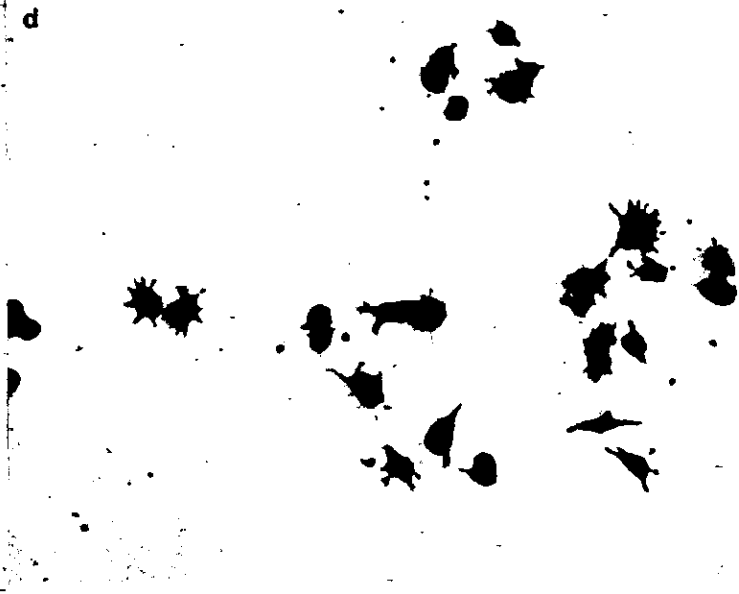
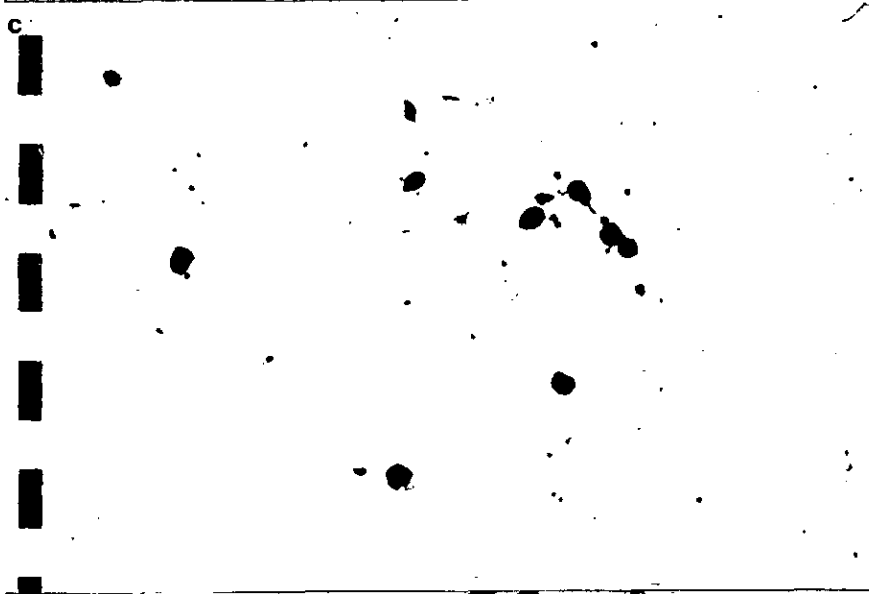
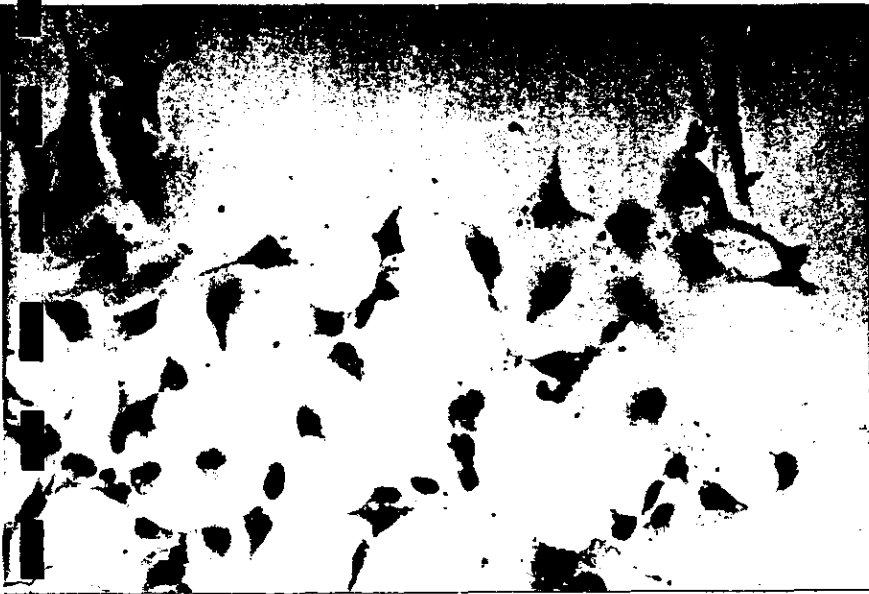
**Figura 5. Localización por inmunocitoquímica de MMP-3 en células de cáncer pulmonar. Por inmunotinción se pudo detectar la presencia de MMP-3 en las células A-427 y SKLU-1 (d y e). Las otras líneas celulares mostraron una menor tinción para esta MMP. a. CALU-1, b. SKMES-1, c. NCI-H69, d. A-427, e. SKLU-1. x 200 (amplificación).**



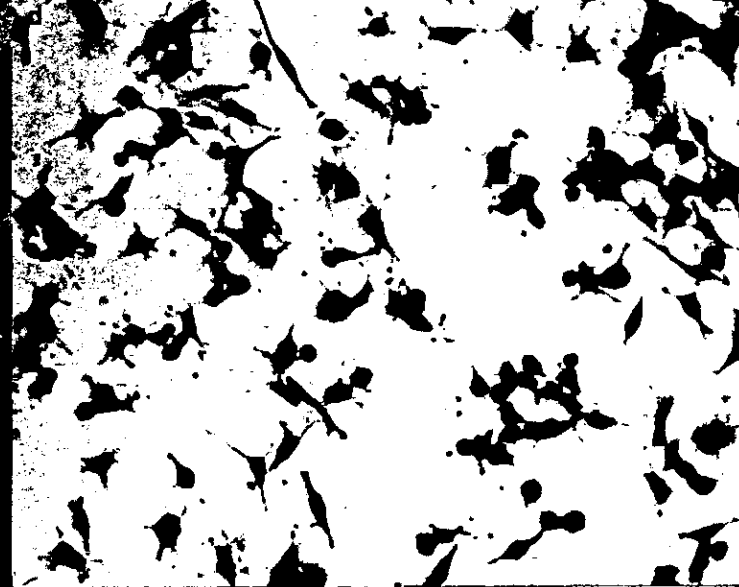
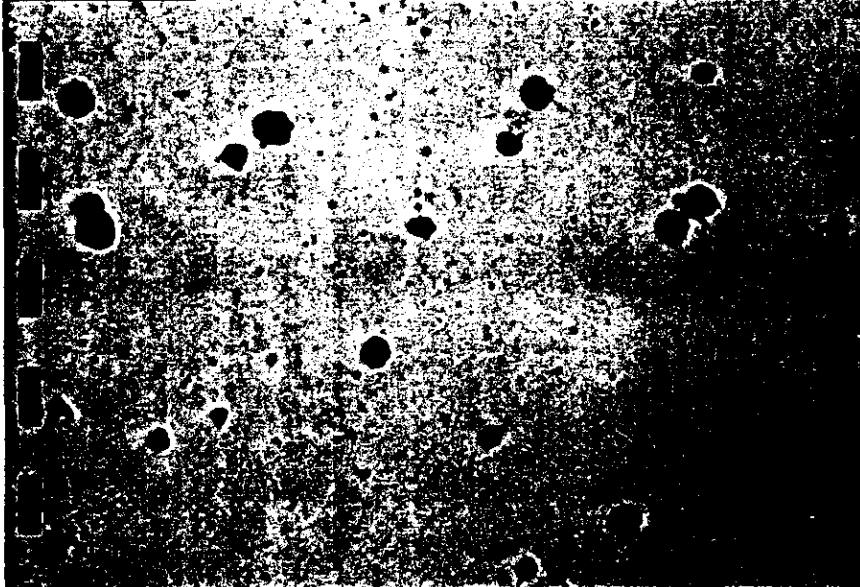
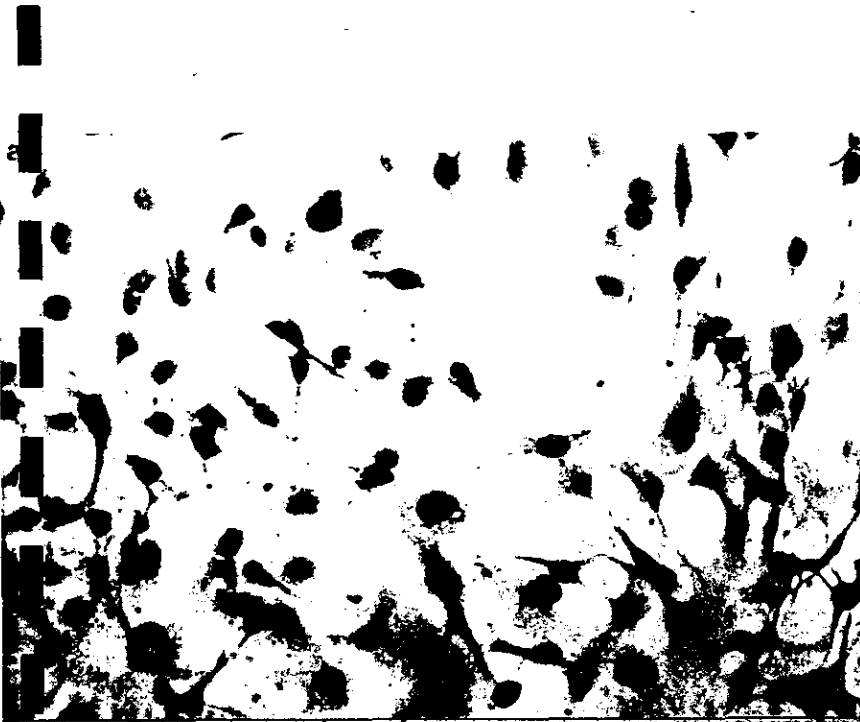
**Figura 6. Detección de MMP-2 por inmunocitoquímica en células de cáncer pulmonar. MMP-2 se detectó en el citoplasma de todas las células con el anticuerpo policlonal A-45, particularmente en SKMES-1 y A-427 (b y d). a. CALLU-1. b. SKME-1. c. NCI-H69. d. A-427. e. SKLU-1. x 200 (amplificación).**



**Figura 7. Expresión proteica de MMP-9 en células de cáncer pulmonar. Las células NCI-H69 (c) y A-427 (d) se tiñieron intesamente al utilizar un anticuerpo policlonal contra MMP-9 (A-110). SKMES-1 mostró una tinción débil (b), mientras que sólo se tiñeron algunas células correspondientes a CALU-1 (a) y a SKLU-1 (e) con este anticuerpo. x200 (amplificación).**



**Figura 8. Inmonolocalización de TIMP-2 en células neoplásicas. Con un anticuerpo policlonal contra TIMP-2 se localizó a esta proteína en casi todas las células, con excepción de CALU-1 donde la inmunotinción fue de baja intensidad (a). b. SKMES-1, c. NCI-H69, d. A-427, e. SKLU-1. f. No se observó tinción al hacer el análisis de inmonocitoquímica con una IgG no-inmune en lugar del anticuerpo primario. Este panel corresponde a la línea celular SKLU-1. x200 (amplificación).**





MMP-3 (Fig 10). En los medios de todas las líneas celulares aparecen bandas con un peso de 110 kD que podrían equivaler a complejos moleculares de esta enzima con otras MMPs y/o sus inhibidores.

El análisis de Western blot para MMP-2 mostró una banda de aproximadamente 72 kD de peso molecular en los extractos celulares de CALU-1, SKMES-1, y NCI-H69 y en los medios de CALU-1 y SKMES-1 (Fig 11). En las demás muestras se detectó una banda muy tenue de 72 kD. En los medios de SKMES-1 se observó una banda de 65 kD que puede representar a la forma activa de MMP-2.

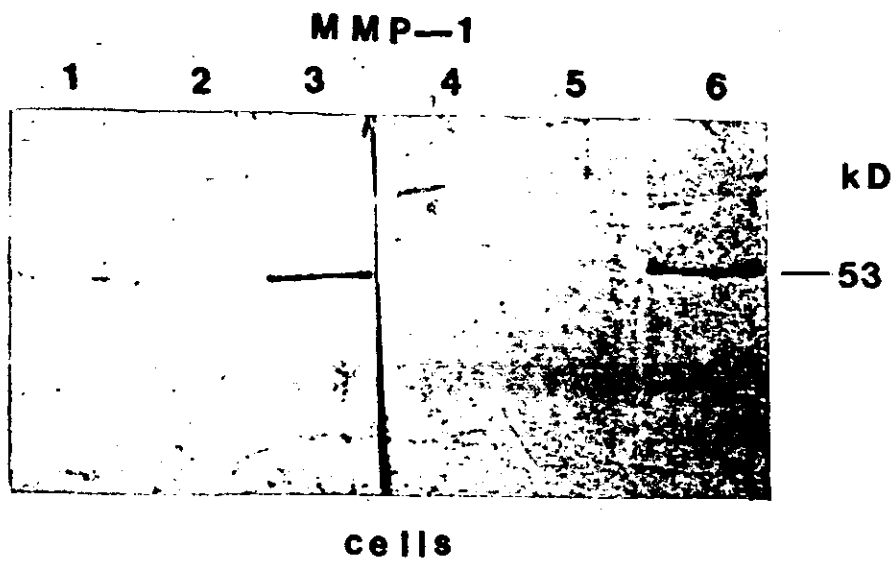
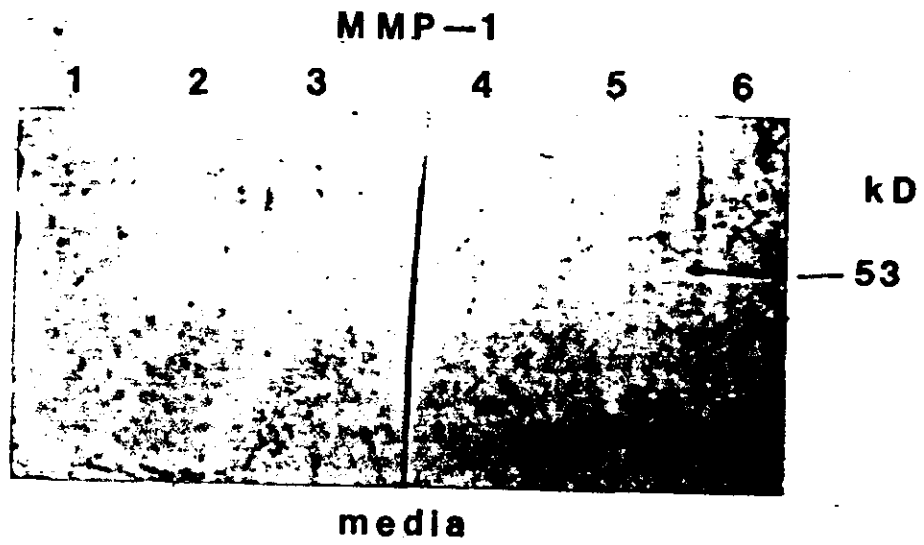
La enzima MMP-9 se detectó en todos los extractos celulares y medios en condiciones no reductoras, como una banda de 97 kD (Fig 12). Esta banda puede corresponder al zimógeno de MMP-9. Con este anticuerpo fue posible detectar también bandas de alto peso molecular en el medio y extractos celulares.

TIMP-1 se detectó como una banda de 28 kD de peso molecular en las muestras de medio con excepción de las muestras de NCI-H69 (Fig 13). En los extractos celulares no fue posible detectar bandas de 28 kD con este anticuerpo, sin embargo bandas dos bandas de 38 y 48 kD de baja intensidad, se localizaron en todas las muestras ( Fig 13).

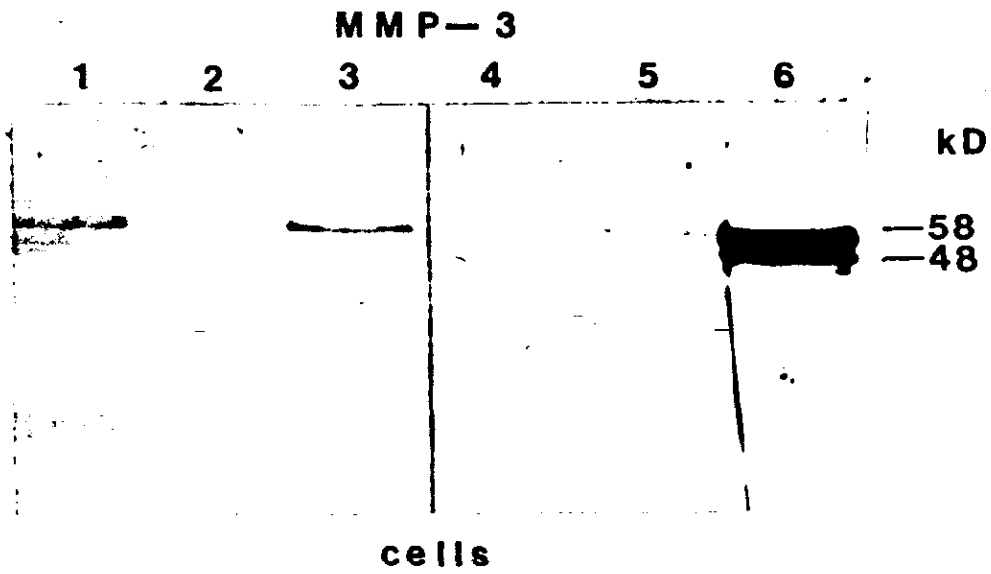
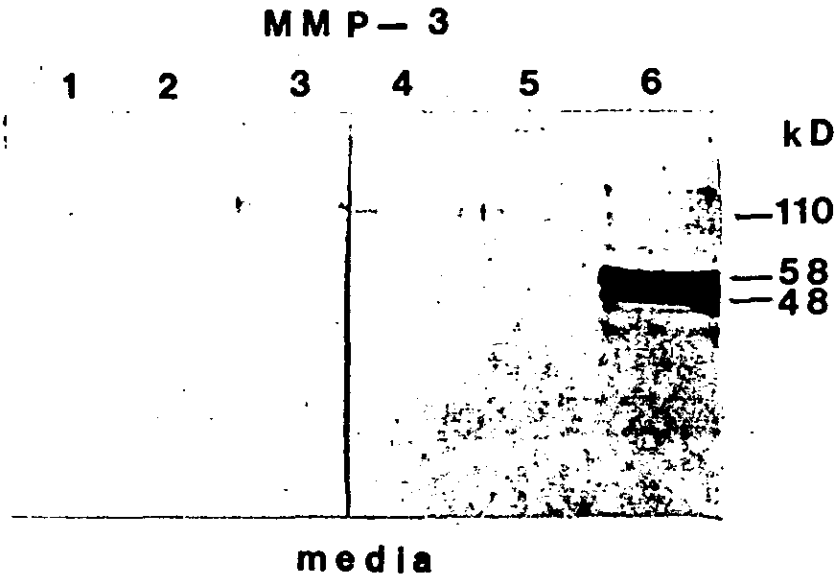
TIMP-2 no se detectó como una banda de 21 kD ni en los extractos celulares, ni en los medios, pero si se observaron bandas de pesos moleculares de 62 y 116 kD en los medios (Fig 14). La banda de 62 kD podría corresponder a polímeros de TIMP-2 ya que esta banda también está presente en el carril correspondiente al control que contiene la proteína recombinante humana TIMP-2 (Fig 14, carril 6). Al

**Figura 9. Identificación por Western blot de MMP-1 en cáncer pulmonar.**

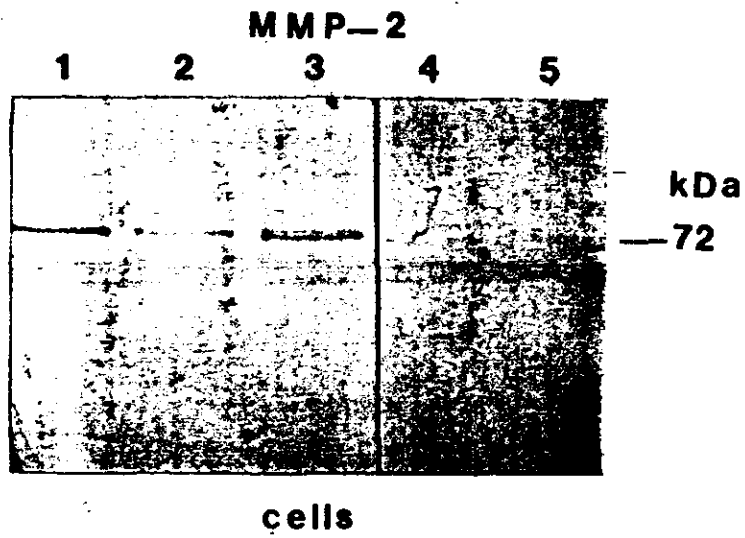
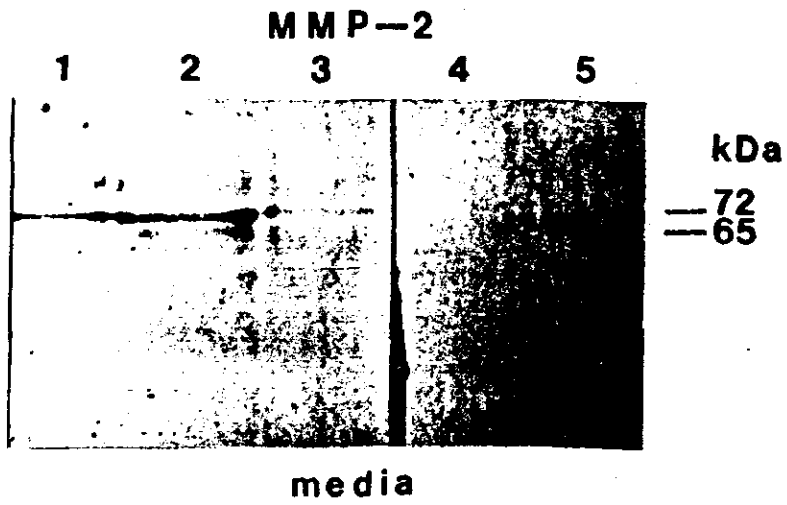
MMP-1 se identificó en su forma latente en los extractos celulares correspondientes a CALU-1 y NCI-H69, sin que se pudiera detectar ninguna banda ni en los otros extractos celulares de las demás muestras ni en los medios de cultivo. El orden de las muestras para ambos casos es: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1; carril 6, control de MMP-1. Los pesos moleculares se indican a la derecha de cada figura.



**Figura 10. Detección de MMP-3 por Western blot en los medios y extractos celulares de células neoplásicas de pulmón. En los extractos celulares se observó una banda de alto peso molecular que corresponde a complejos de MMP-3 con otras MMPs y/o sus inhibidores. En los medios de cultivo se detectó una banda que corresponde a proMMP-3 en CALU-1 (carril 1), NCI-H69 (carril 3) y SKLU-1 (carril 5), El orden de las muestras es: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1; carril 6, control para MMP-3 donde se aprecian la proenzima (58 kD) y la enzima activa (48 kD).**

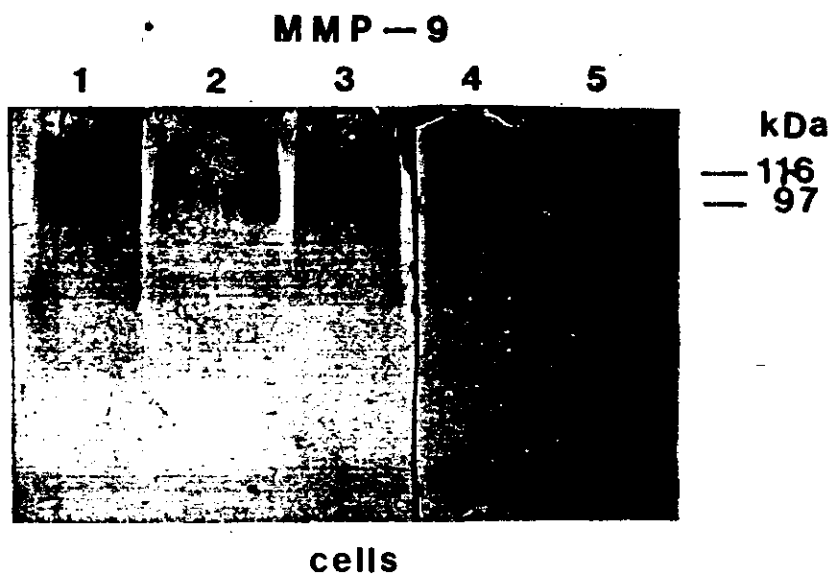
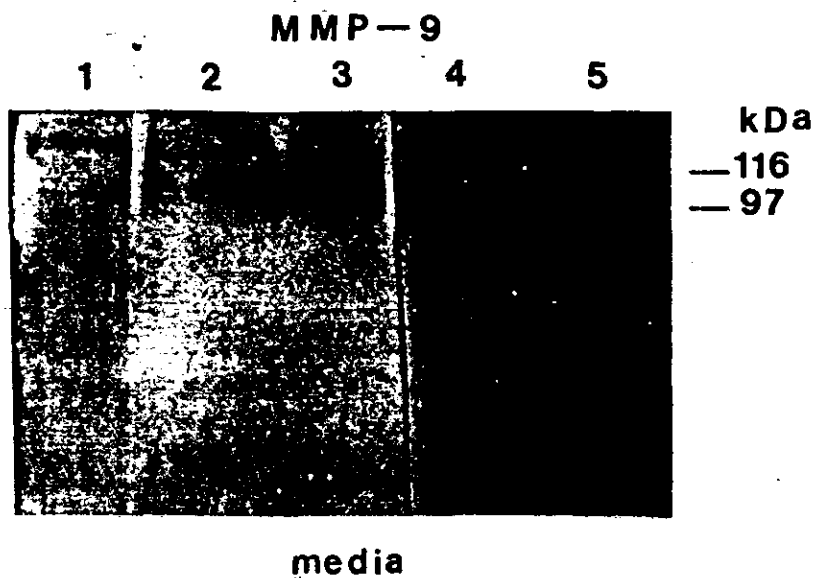


**Figura 11. Análisis tipo Western blot para la detección de MMP-2 en células de cáncer pulmonar. MMP-2 se observó en su forma latente en los medios y los extractos celulares de las células epidermoides correspondientes a CALU-1 y SKMES-1, y en el carcinoma de células pequeñas NCI-H69 en condiciones reductoras. En los medios de SKMES-1 se detectó una banda de 65 kD que corresponde a la forma activa de MMP-2. El orden de las muestras para ambos análisis fue: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1.**

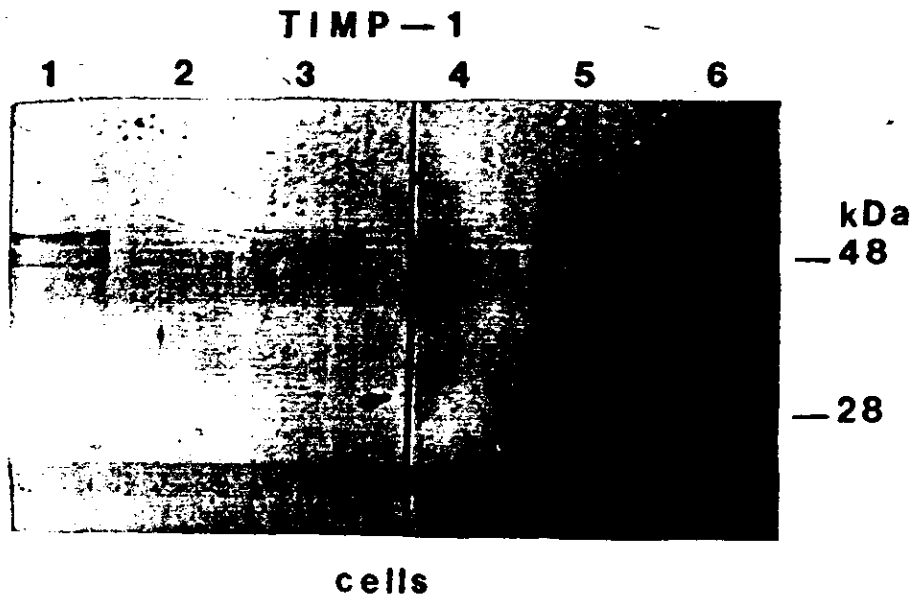
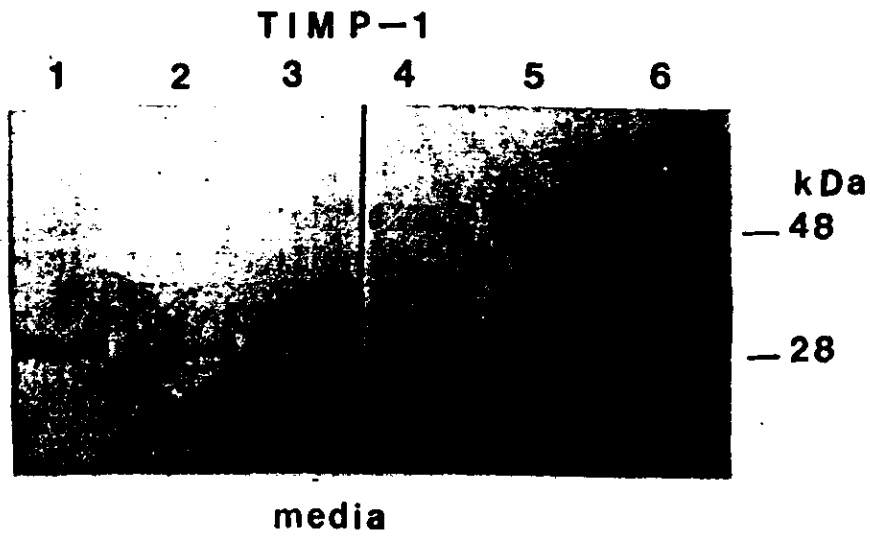


**Figura 12. Identificación de MMP-9 por Western blot. En condiciones no reductoras se pudo identificar MMP-9 en su forma latente en los medios y los extractos celulares de todas las muestras. Con este anticuerpo también se detectaron bandas de un peso molecular de 110 kd que corresponden a polímeros de esta enzima. El orden de las muestras para ambos blots fue: carril 1 CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1.**

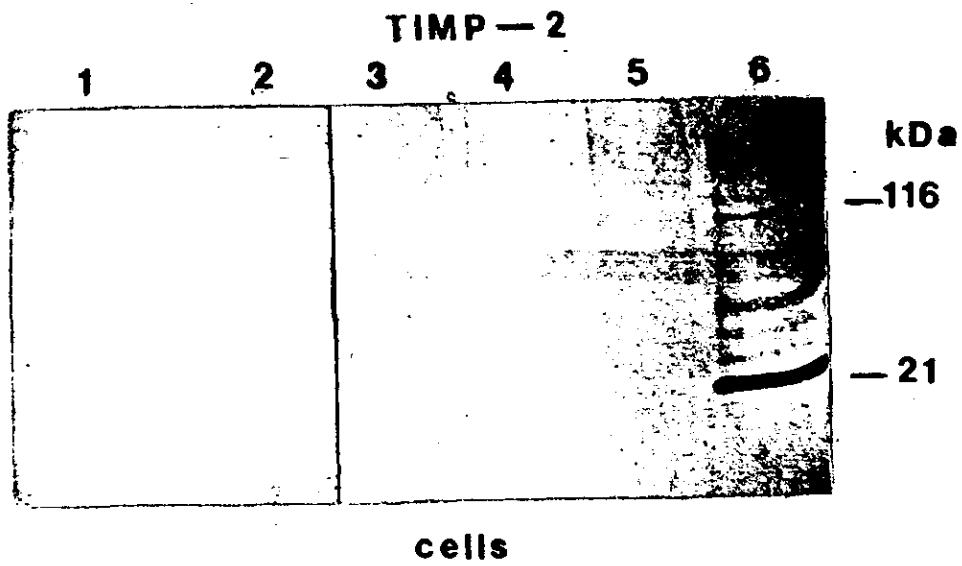
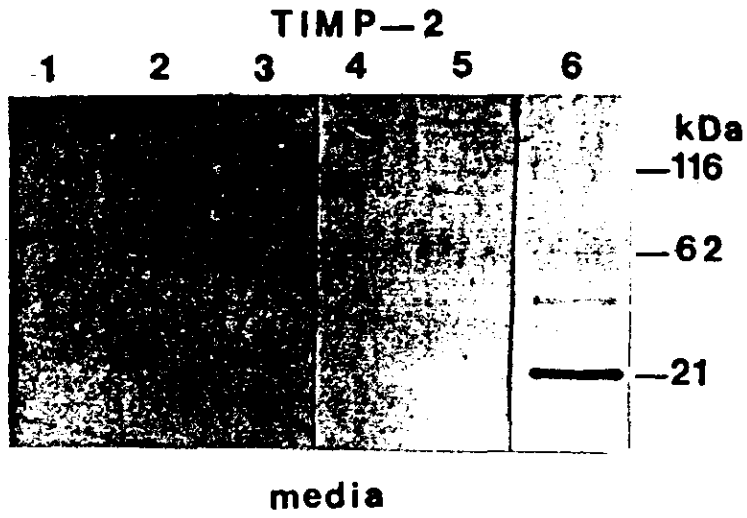




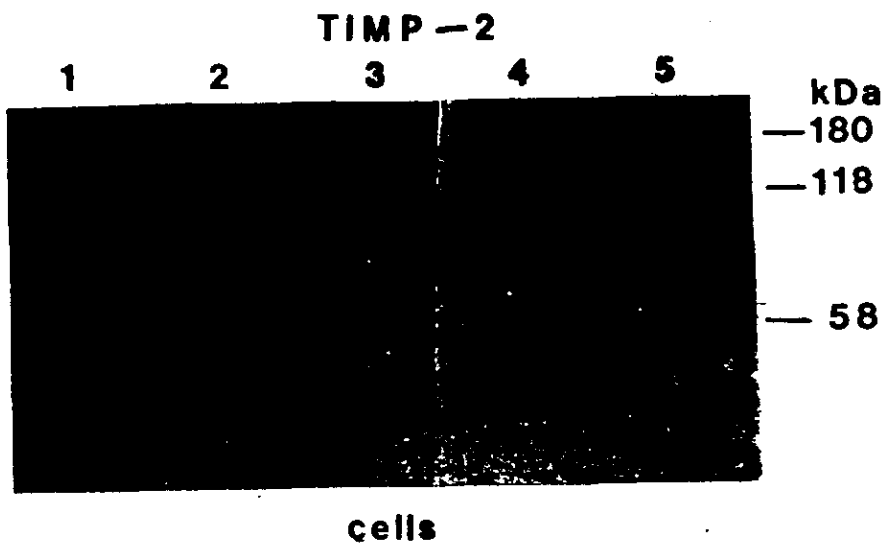
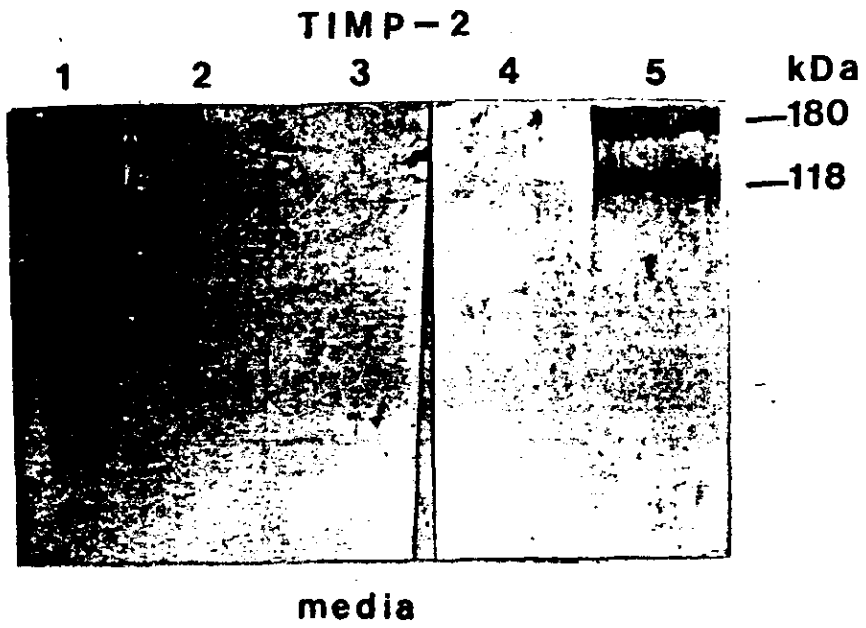
**Figura 13. Identificación de TIMP-1 en medios y extractos celulares de células de cáncer pulmonar. El análisis de Western blot para TIMP-1 se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal en condiciones reductoras. En los medios de cultivo se pudo identificar a esta proteína en todas las muestras como una banda de 28 kD. En los extractos celulares se detectó TIMP-1 como polímeros de 38 y 48 kD. La distribución de las muestras fue: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1; carril 6, TIMP-1 recombinante humano.**



**Figura 14. Western blot para la detección de TIMP-2 en cáncer pulmonar. En esta figura se muestran los resultados que se obtuvieron al utilizar en el ensayo un anticuerpo monoclonal en condiciones reductoras. Ni en los medios de cultivo ni en los extractos celulares se observó una banda de 21 kD que corresponde a la forma libre de este inhibidor. Sin embargo, una banda de aproximadamente 65 kD se detectó en los medios de cultivo con la excepción de NCI-H69. Una banda de 116 kD se observó también en los medios de CALU-1, SKMES-1, y NCI-H69. La distribución de las muestras fue: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril-3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1; carril 6; TIMP-2 proteína recombinante humana.**



**Figura 15. Identificación de complejos de alto peso molecular de TIMP-2 en células de cáncer pulmonar. El análisis de Western blot se realizó con un anticuerpo policlonal en condiciones no reductoras. Bandas de alto peso molecular de cerca de 118 y 180 kD se observaron en los medios y los extractos celulares. Estas bandas pueden corresponder a complejos moleculares proMMP-2/TIMP-2. La distribución de las muestras fue: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1.**



utilizar el anticuerpo policlonal anti-TIMP-2 del Dr Stetler-Stevenson, en condiciones no reductoras, se pudieron observar bandas de 118 y 180 kD en los medios y extractos celulares de SKLU-1 y en los medios de CALU-1 (Fig 15). Una banda de 58 kD se observó en las muestras de NCI-H69 y A-427 que pudiera corresponder a polímeros de TIMP-2.

### Invasión in vitro

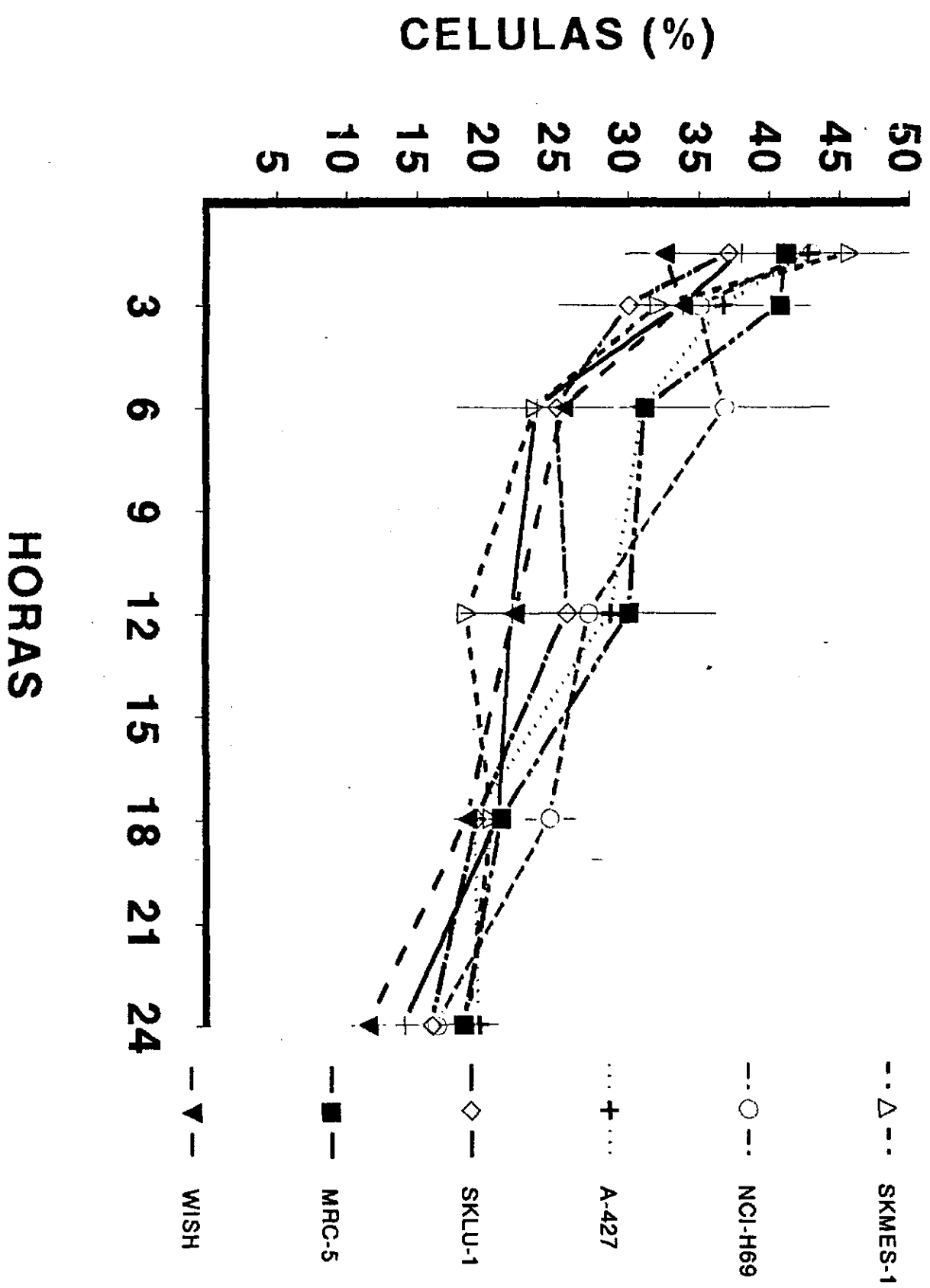
La habilidad de las células para penetrar y cruzar a través del Matrigel se representa en las figuras 16, 17 y 18. Conforme el ensayo transcurre las células que se encuentran sobre el Matrigel van disminuyendo gradualmente en número, con algunas variaciones entre las diferentes líneas celulares sobre todo a las 6 horas donde el número de células de NCI-H69 es mayor en comparación con el resto de las células (36.84 %,  $p < 0.03$ ) (Fig 16). Al final del ensayo (24 horas) no existen diferencias significativas entre el porcentaje de células de las diferentes líneas.

Al medir el porcentaje de células presente en el Matrigel se encontró que había células en éste a las 1.5 horas de haber colocado las células, encontrándose una mayor cantidad de las células WISH ( $30.41 \pm 3.7$  %,  $p = 0.0004$ ), seguida de las células que corresponden a los carcinomas epidermoides (CALU-1  $19.76 \pm 1.7$  % y SKMES-1  $14.7 \pm 1.7$  %,  $p = 0.03$ ) (Fig. 17). Conforme prosigue el estudio el número de células WISH se incrementa en el Matrigel hasta llegar a un máximo de  $70.72 \pm 1.1$  % a las 18 horas. El porcentaje de células de carcinoma epidermoide se mantiene constante hasta las 12 horas donde aumenta el



**Figura 16. Disminución del porcentaje de células presentes por encima del Matrigel.** En esta figura se representa la disminución progresiva del porcentaje de células del medio de cultivo que se encuentra sobre el Matrigel, conforme estas invaden este sustrato. En las primeras horas del ensayo, particularmente a las 6 horas, existen diferencias significativas entre las células que se examinaron, diferencias que no se observan al final del ensayo (24 horas).

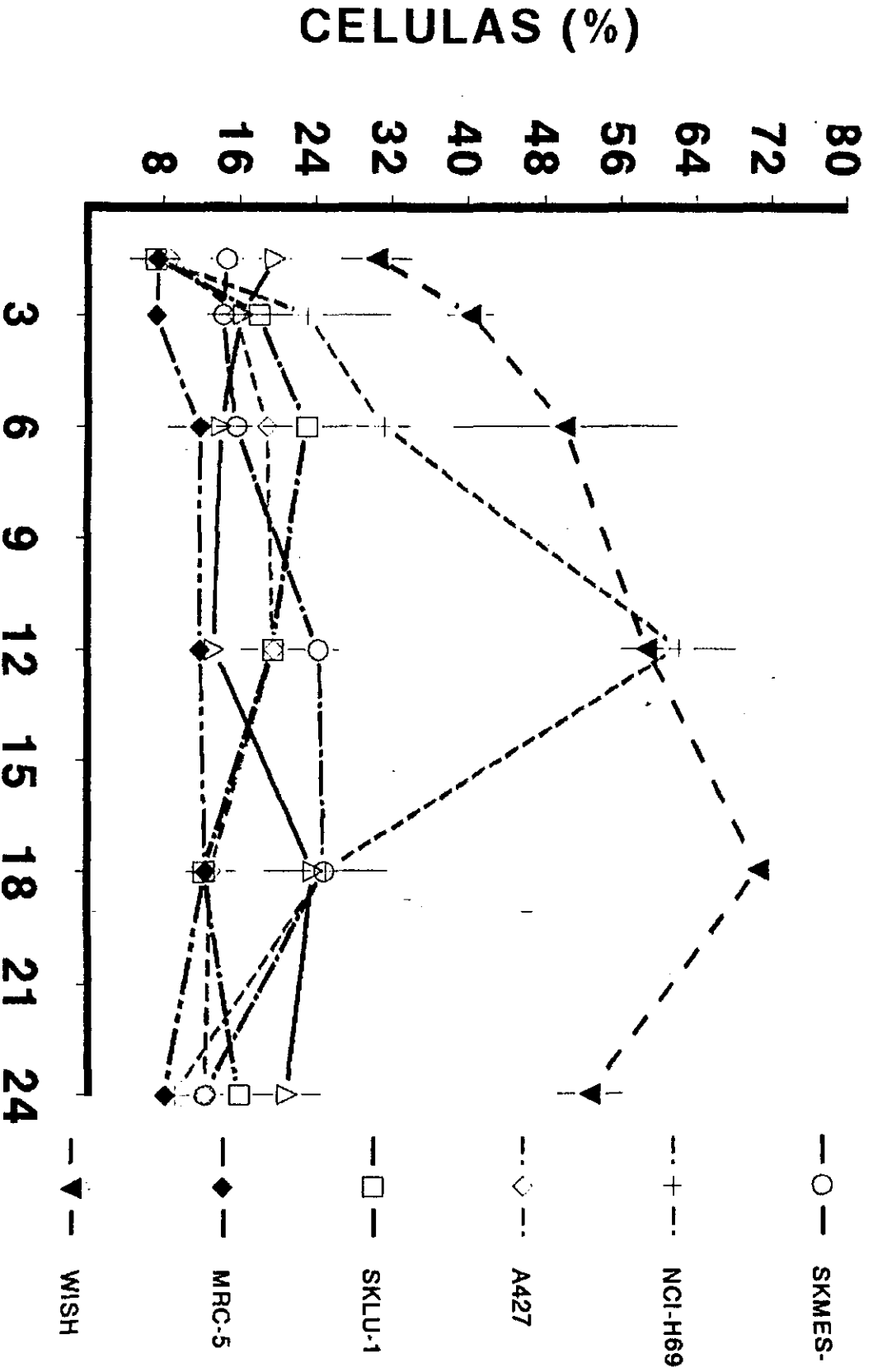
# CELULAS SOBRE EL MATRIGEL



**Figura 17. Interacción de las células neoplásicas pulmonares con el Matrigel.**

Un porcentaje promedio de  $17.39 \pm 4.2$  de las células de cáncer pulmonar, con excepción del carcinoma de células pequeñas (NCI-H69), se mantiene entre el Matrigel a lo largo de todo el ensayo. La cantidad de células de NCI-H69 va en aumento conforme el estudio progresa llegando a un pico máximo a las 12 horas del estudio, para después descender. Las células epiteliales WISH desde el inicio del ensayo permanecen atrapadas en el Matrigel existiendo un máximo de células a la 18 horas. Los fibroblastos tienen un comportamiento similar al de las células neoplásicas epidermoides y adenocarcinomas, aunque aparentemente las interacciones de adhesión que se establecen con el Matrigel son menores que las de las células neoplásicas.

# INTERACCION CON EL MATRIGEL



HORAS

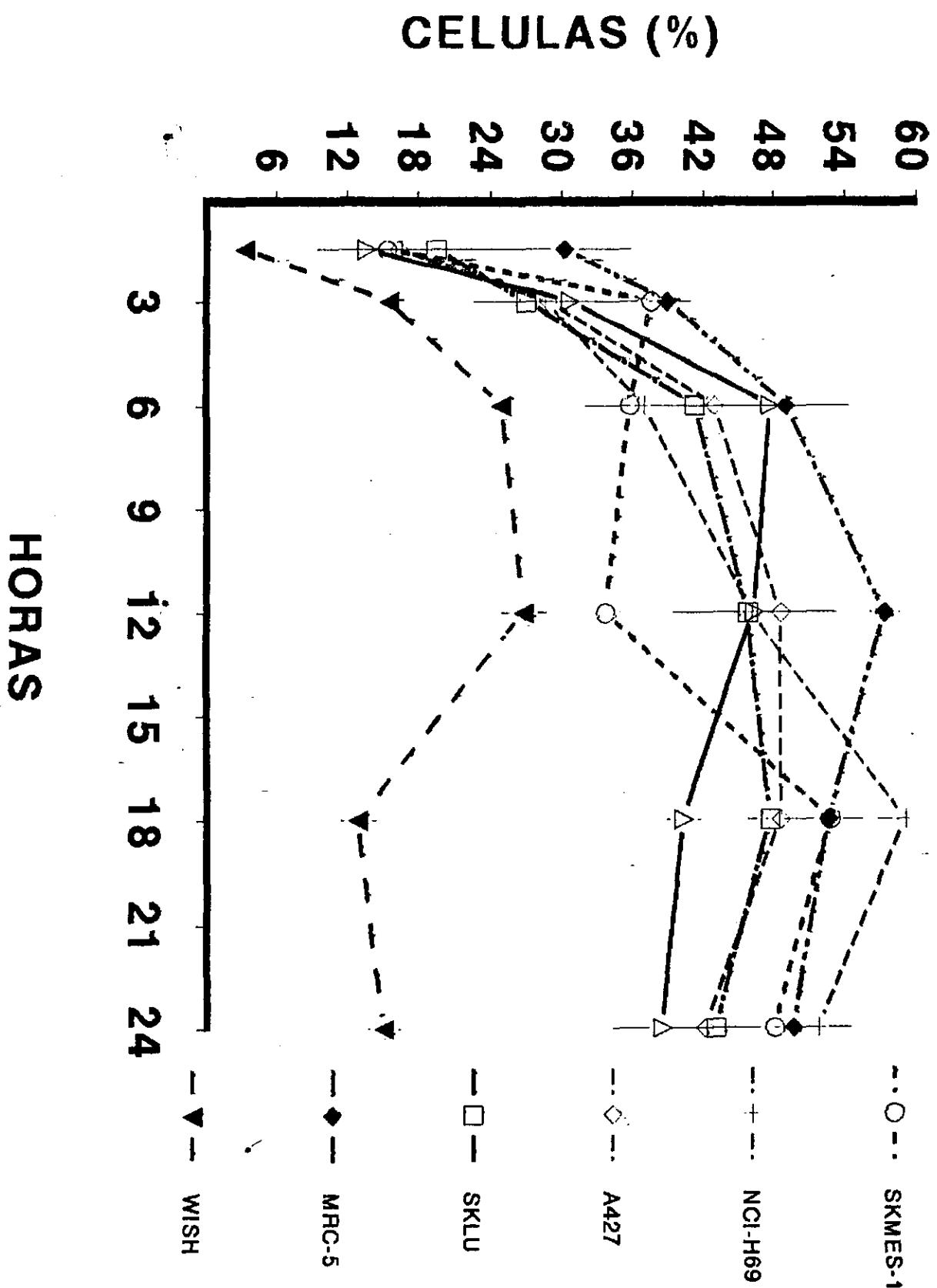
CELULAS (%)

porcentaje de SKMES-1 a  $24.3 \pm 2.1$  % ( $p = 0.004$ ) y a las 18 horas donde aumenta el de CALU-1 a  $23.7 \pm 3.6$  % ( $p = 0.004$ ). El porcentaje de células de adenocarcinoma A-427 y SKLU-1 al inicio del estudio (1.5 horas) fue de  $8.79 \pm 0.1$  % y  $7.29 \pm 0.01$  % respectivamente. SKLU-1 presenta un pico máximo de células en el Matrigel a las 6 horas mientras que A-427 a las 12 horas ( $23.02 \pm 4.7$  y  $19.6 \pm 0.1$  % respectivamente). En el Matrigel se encontró un porcentaje de células de NCI-H69 de  $62.17 \pm 6.1$  % a las 12 horas, el cual fue significativamente mayor que el que se encontró en las otras líneas de cáncer pulmonar en cualquier momento del ensayo ( $p = 0.004$ ).

La presencia de células en el compartimiento inferior se detectó (azul de Tripan) desde las 1.5 horas encontrándose que el menor porcentaje correspondía a las células WISH ( $3.34 \pm 0.34$  %,  $p < 0.03$ ) y el mayor a las MRC-5 ( $30.26 \pm 5.6$  %,  $p < 0.03$ ) (Fig 18). El porcentaje de células de cáncer pulmonar que atravesó el transwell fue en promedio de  $16.51 \pm 2.1$  % (promedio de las 5 líneas de cáncer) en este momento del estudio. Conforme avanzó el estudio, las células WISH se incrementaron hasta llegar a un máximo de 26.81 % a las 12 horas. Los porcentajes que se encontraron para esta línea celular fueron significativamente menores que los correspondientes a los fibroblastos (MRC-5) y a las líneas de cáncer pulmonar que se observaron a lo largo del estudio ( $p = 0.004$ ). Entre las 12 y las 18 horas del ensayo se encontraron en el compartimiento inferior los mayores porcentajes de células correspondiendo los valores más altos a NCI-H-69 y MRC-5 ( $59.12 \pm 2.4$  % a las 18 horas, y  $57.34 \pm 1.2$  % a las 12 horas

**Figura 18. Ensayo de invasion *in vitro* de células de cáncer pulmonar. Desde el inicio del ensayo hubo células que penetraron el Matrigel y pasaron a través del filtro hacia el pozo inferior. Las células WISH fueron el tipo celular que invadió y pasó a través del Matrigel y el filtro, en menor porcentaje. Las células neoplásicas, así como los fibroblastos, fueron pasando progresivamente hasta llegar a un máximo entre las 12 y las 18 horas del estudio.**

# ENSAYO DE INVASION



respectivamente). A final del estudio no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de células de las líneas de cáncer y las células MRC-5 obteniéndose un promedio de los porcentajes de las 6 líneas celulares de  $45.5 \pm 5.1 \%$ .

#### Actividad gelatinolítica de las células en presencia de diferentes sustratos

Se midió la actividad gelatinolítica presente en el medio de las células que se cultivaron en presencia de Matrigel y gelatina por zimograma, y utilizando gelatina radiactiva. Estos estudios sólo pudieron realizarse en estos cultivos ya que la cantidad de proteína presente en los medios de los cultivos con otros sustratos fue funcionalmente insuficiente ( $> 2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  de muestra).

En el zimograma de las muestras de incubaciones con Matrigel se observó una banda de 72 kD en las muestras de SKMES-1, MRC-5 y WISH (Fig 19, carriles 2,6 y 7). Esta banda puede corresponder a proMMP-2. También se observó una banda de 92 kD, que correspondería a la forma de proenzima de MMP-9, en las muestras de SKMES-1, A-427, MRC-5 y WISH (carriles 2, 4, 6 y 7). En las muestras de SKMES-1 se detectó también la presencia de una banda de 110 kD.

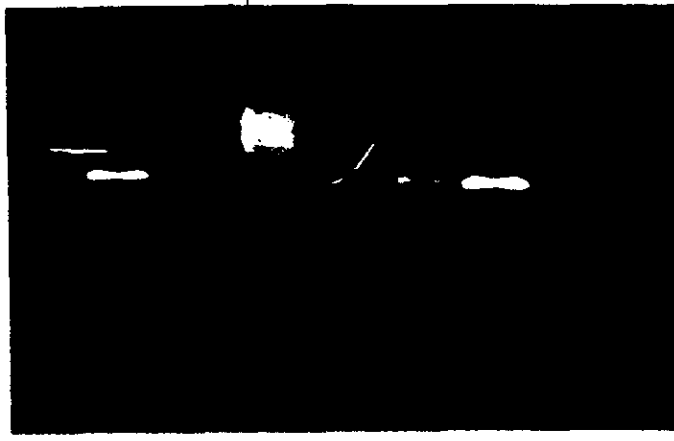
En el zimograma de los medios de las células que se cultivaron con gelatina, se observó una banda de 72 kD en las muestras de CALU-1, SKMES-1, MRC-5 y muy tenuemente en NCI-H69 (carriles 1, 2, 6 y 3 respectivamente). Una banda de 62 kD que puede corresponder a MMP-2, se detectó en las muestras de SKMES-1, MRC-5 y WISH (carriles 2, 6 y 7). También se encontró la presencia de una banda de 86 kD que coincide con la forma activa de MMP-9, en las muestras de



**Figura 19. Zimograma de gelatina de los medios de cultivo de las células en presencia de diferentes sustratos. Las células neoplásicas se cultivaron en presencia de Matrigel o de gelatina. De los medios que se recolectaron se tomaron 10 µg de proteína de cada muestra para hacer los zimogramas. En el zimograma correspondiente a los cultivos con Matrigel se encontró la presencia de proMMP-2 en SKMES-1, MRC-5 y WISH (carriles 2, 6 y 7 respectivamente). proMMP-9 pudo también detectarse en SKMES-1, A-427, MRC-5 y WISH (carriles 2, 4, 6 y 7). Polímeros activos de MMP-9 se detectaron en SKMES-1. El zimograma de los medios de los cultivos hechos en presencia de gelatina mostró la presencia de proMMP-2 en CALU-1, SKMES-1, NCI-H69 y MRC-5 (carriles 1, 2, 3 y 6). MMP-2 en su forma activa se detectó en SKMES-1, MRC-5 y WISH (carriles 2, 6 y 7). MMP-9 en su forma activa así como polímeros de esta enzima también se detectaron en SKMES-1 y WISH (carriles 2 y 7). En ninguno de los zimogramas se detectó actividad en los medios de los sustratos incubados solos (carriles 8 para ambos geles). La distribución de las muestras para los dos zimogramas fue: carril 1, CALU-1; carril 2, SKMES-1; carril 3, NCI-H69; carril 4, A-427; carril 5, SKLU-1; carril 6, MRC-5; carril 7, WISH; carril 8, medio de cultivo de Matrigel o de gelatina que se incubaron solos.**

MATRIGEL

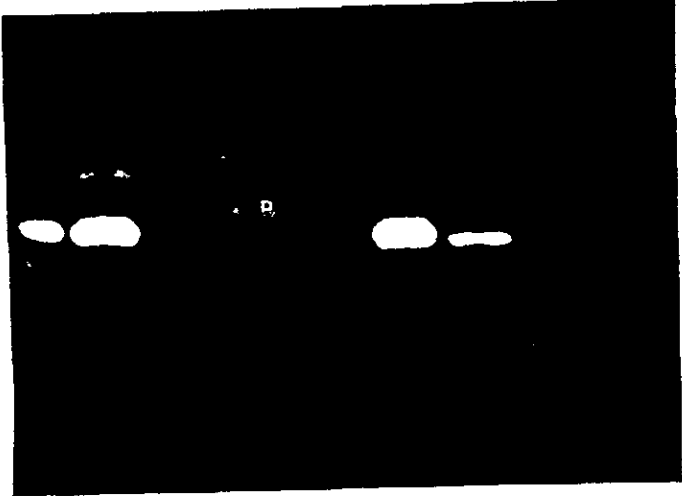
1 2 3 4 5 6 7 8



kD  
— 110  
— 92  
— 72

GELATIN

1 2 3 4 5 6 7 8



kD  
— 110  
— 86  
— 62

SKMES-1, SKLU-1 y WISH (carriles 2, 5 y 7). La presencia de bandas de 110 kD se pudo observar en todas las muestras con excepción de NCI-H69 y WISH (carriles 3 y 7).

Al medir actividad gelatinolítica con sustrato radiactivo se detectó actividad enzimática en todas las muestras menos en los cultivos de Matrigel solo (Tabla 6). La mayor actividad correspondió a los cultivos de Matrigel con células NCI-H69 ( $8.37 \pm 0.3$   $\mu$ g de gelatina degradada/ 10  $\mu$ g de proteína incubada,  $p < 0.03$ ).

En las muestras de los cultivos con gelatina se detectó actividad gelatinolítica tanto en presencia de las células, como en las incubaciones de gelatina sola ( $2.6 \pm 1.7$   $\mu$ g de gelatina degradada/ 10  $\mu$ g de proteína incubada, actividad basal), (Tabla 6). Al restar la actividad basal, las células que mayor actividad gelatinolítica presentaron fueron SKMES-1 con una actividad de  $10.81 \pm 0.9$   $\mu$ g de gelatina degradada/ 10  $\mu$ g de proteína incubada. En los cultivos con NCI-H69 y WISH no fue posible detectar actividad por este método.

#### Concentración y electroforesis de las proteínas presentes en los cultivos con Matrigel y gelatina

Se comparó la cantidad de proteína presente en los cultivos de células solas y de Matrigel y gelatina solas con la que se encontró en los cultivos de células con estos sustratos (Tabla 7).

En los cultivos de Matrigel y gelatina que se incubaron sólo con el medio de cultivo con 1 % de suero fetal, se encontró una cantidad de proteína mayor a la del medio con 1 % de suero ( $19.8 \pm 3.9$  y  $10.46 \pm 1$   $\mu$ g de proteína por 20  $\mu$ l de

muestra para Matrigel y gelatina respectivamente, contra  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g}$  de proteína/  $20 \mu\text{l}$  de muestra para el medio con 1 % de suero). Por otro lado, en los cultivos de células en presencia de Matrigel o gelatina había una mayor cantidad de proteína en comparación de los cultivos de células solas con excepción de WISH. Se observó una mayor cantidad de proteína en los cultivos con Matrigel en comparación con los de gelatina particularmente con las células SKLU-1 ( $31.6 \pm 1.4 \mu\text{g}$  de proteína/  $20 \mu\text{l}$  de muestra).

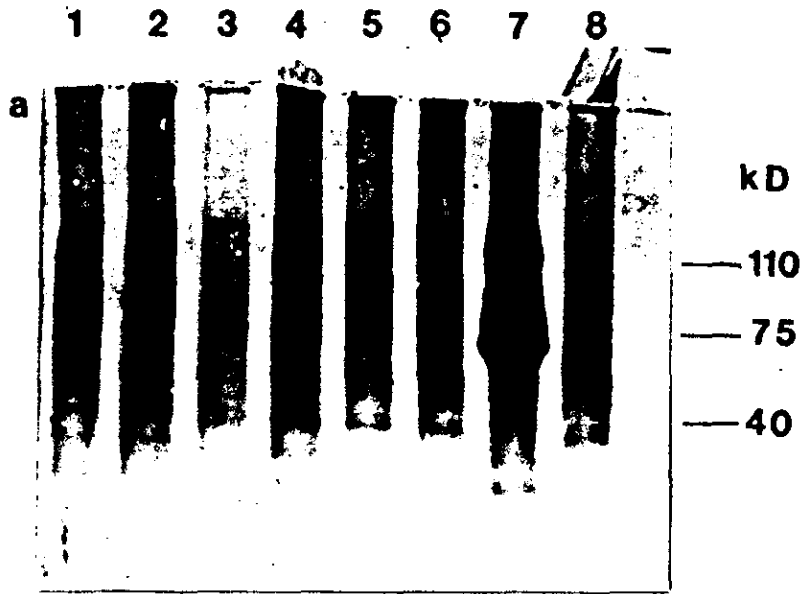
Al considerar la cantidad de proteína liberada al medio por el Matrigel o la gelatina, y la cantidad inicial de proteína en los cultivos de células solas, se observó que existe un aumento real de proteína sólo en los cultivos de Matrigel con células CALU-1, SKLU-1 y MRC-5 ( $3.2 \pm 1.1$ ,  $11.3 \pm 1.4$  y  $2.4 \pm 1.8 \mu\text{g}$  de proteína/  $20 \mu\text{l}$  de muestra respectivamente).

En el patrón electroforético de los cultivos con Matrigel, se observan varias bandas que se encuentran entre 110 kD y 40 kD en todas las muestras que se corrieron y que pueden corresponder la mayoría de ellas, a productos de degradación de este sustrato (Fig 20a) Se detectó en particular una banda de 40 kD que esta presente en el Matrigel solo y en los medios de las células cultivadas con Matrigel pero que no se encuentra en los medios de los cultivos de células solas (Fig 20c).

En la electroforesis correspondiente a los cultivos con gelatina, se puede observar una banda de 110 kD que esta presente en todas las muestras mas no en los cultivos de células solas (Figs 20b y 20c respectivamente). En el patrón

**Figura 20. Patrón electroforético de los medios de cultivo de las células en presencia de diferentes sustratos. Para cada gel se utilizaron 20  $\mu$ l de cada muestra. a. En los cultivos hechos en presencia de Matrigel se observaron bandas ente los 110 kD y los 40 kD de las cuales varias corresponden a productos de degradación del Matrigel. La banda de 75 kD que correspondería a proMMP-2 se encuentra en los medios de las células que se cultivaron solas (c) así como en el Matrigel. b. En los cultivos hechos en presencia de gelatina se observa una banda de 110 kD que se encuentra en todas las muestras incluyendo en las incubaciones de gelatina sola. Esta banda que correspondería a polímeros de MMP-9 no se pudo detectar en los medios de las células solas probablemente por la cantidad tan pequeña de proteína presente en estas muestras (ver texto). La distribución de las muestras para a, b y c es igual a la de la figura 19, sólo que en c no se corrió la muestra correspondiente a WISH.**

MATRIGEL



GELATINA



C. SOLAS

1 2 3 4 5 6

C



kD

—87

—72

**Tabla 6. Actividad gelatinolítica de células neoplásicas pulmonares en presencia de Matrigel y gelatina**

Célula	Actividad gelatinolítica*		
	Matrigel	Gelatina	Sola <sup>#</sup>
CALU-1	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.7
SKMES-1	2.5 ± 0.6	10.8 ± 0.9	1.4 ± 0.5
NCI-H69	8.4 ± 0.3	0	0.4 ± 0.1
A-427	1.8 ± 0.6	4.6 ± 1.7	1.7 ± 0.4
SKLU-1	3.2 ± 0.7	3.0 ± 1.2	1.6 ± 0.1
MRC-5	2.9 ± 0.8	3.2 ± 1.7	1.7 ± 0.1
WISH	0.8 ± 0.2	0	0

\*Los valores se expresan en microgramos de gelatina degradada/ 5 µg de proteína incubada. A los resultados de cultivos con gelatina se les resta la actividad gelatinolítica presente en este sustrato que fue de 0.62 ± 0.2. La actividad gelatinolítica del Matrigel fue de 0.

<sup>#</sup>Los valores de actividad gelatinolítica de las células solas corresponden a experimentos anteriores (tabla 5).

Todos los valores se expresaron como promedio ± desviación estándar. N = 5 para todos los casos.



**Tabla 7. Concentración de proteína presente en el medio de cultivos de células neoplásicas con diferentes sustratos**

Célula	Concentración de proteína*		
	Sola	Matrigel	gelatina
CALU-1	0.8 ± 0.5	23.9 ± 1.1	9.8 ± 0.4
SKMES-1	1.8 ± 0.1	21.2 ± 0.4	10.2 ± 0.2
NCI-H69	4.4 ± 0.1	22.1 ± 2.3	12.9 ± 0.2
A-427	3.7 ± 0.2	23.9 ± 2.6	12.2 ± 0.5
SKLU-1	0.5 ± 0.1	31.6 ± 1.4	9.7 ± 1.4
MRC-5	1.3 ± 0.3	22.3 ± 1.8	9.2 ± 0.8
WISH	15.5 ± 2.6	24.3 ± 2.5	27.4 ± 2.2
Matrigel solo	19.8 ± 3.9		
Gelatina sola	10.5 ± 1.0		

\*Los valores se expresan en microgramos de proteína/ 20 µl de medio.  
 Todos los valores se expresaron como promedio ± desviación estándar.  
 N = 5 para todos los casos.

electroforético de la gelatina se observa tenuemente una banda de 72 kD (Fig 20b, carril 8). Esta banda está presente en todas las muestras con y sin sustrato.

### *Discusion*

Para que la célula neoplásica pueda pasar de un tejido a otro y establecer colonias metastásicas, requiere de invadir los tejidos vecinos. Este proceso de invasión es un proceso activo en el cual es necesaria la proteólisis de los componentes de la ME. Se ha señalado a las MMPs como las principales enzimas que participan en la degradación de los componentes de la ME durante este evento.<sup>103</sup> Estas enzimas se han identificado tanto en las células neoplásicas como en el tejido adyacente existiendo controversia acerca de si la actividad enzimática que se usa durante la invasión proviene de la célula neoplásica, de las células del estroma o de ambas.<sup>61,67,73,104</sup>

La mayoría de los estudios que se han hecho con el fin de identificar cuales son las MMPs que participan en la invasión neoplásica han identificado a la MMP-2 y a la MMP-9 como las enzimas que se encuentran con mayor frecuencia asociadas a al fenómeno de invasión. Estas enzimas se han estudiado más ya que uno de los sustratos que degradan es la colágena tipo IV que es el principal componente de la membrana basal. Sin embargo otras MMPs como la estromelisin-1 (MMP-3), la colagenasa intersticial (MMP-1), la matrilisina (MMP-7) y la colagenasa 3 (MMP-13) se han encontrado presentes en diferentes tipos de cáncer.

En el estudio que aquí se presenta se pudieron identificar en las células la presencia de algunas de estas MMPs. MMP-1 por inmunohistoquímica pudo detectarse ligeramente en las células correspondientes a los carcinomas epidermoides CALU-1 y SKMES-1, y en las células derivadas de carcinoma de células pequeñas NCI-H69. Este hallazgo pudo corroborarse para el caso de los carcinomas epidermoides por medio del Western blot encontrándose una banda de 53 kD que probablemente corresponde a proMMP-1. En el caso de los adenocarcinomas no fue posible la identificación de esta MMP por ninguna de las dos técnicas. La expresión de MMP-1 ha sido documentada por Urbanski y col.<sup>89</sup> quienes encontraron la presencia de transcritos correspondientes a MMP-1 en 3 de los 10 carcinomas que se estudiaron. De estos carcinomas uno era epidermoide, otro adenocarcinoma y el tercero carcinoma de células pequeñas, y aunque los tres eran de características histológicas diferentes, los tres no eran invasivos por lo que este autor concluyó que la MMP-1 estaba asociada al fenotipo maligno mas no al potencial invasivo. Por su parte Müller y col.<sup>61</sup> encontraron también transcritos correspondientes al ARNm de MMP-1 en el 39 % de los carcinomas epidermoides de pulmón que estudiaron sin hacer una correlación entre el estadio de estos cánceres y la presencia de MMP-1. La presencia de transcritos correspondientes a esta MMP en las muestras que se estudiaron en ambos trabajos no significa que exista la presencia de la proteína en los tejidos ni mucho menos nos puede indicar el estado de la actividad enzimática.

La MMP-1 degrada colagena tipo I por lo que en esta tesis se estudió la capacidad que tenían las células neoplásicas de degradar este sustrato. En casi todas las muestras, extractos celulares y medios de cultivo, se observó de manera espontánea (sin necesidad de un activador), actividad colagenolítica intersticial con la excepción de las muestras que correspondían a CALU-1. En estas muestras sólo con el uso de APMA se logró detectar actividad. En los extractos celulares de SKMES-1 y en los medios de cultivo del adenocarcinoma A-427 fue donde mayor actividad se detectó. Los resultados de actividad colagenolítica que se encontraron en SKMES-1 y CALU-1 coincidieron parcialmente con los hallazgos de inmunohistoquímica y de Western blot. Para el resto de las muestras parece no existir una correlación entre la capacidad de degradar colágena tipo I y la presencia de esta enzima. La actividad colagenolítica intersticial en cáncer pulmonar ha sido estudiada por Kobayashi y col.<sup>106</sup> quienes encontraron un aumento de esta actividad enzimática en homogenados de carcinomas epidermoides, y por Zucker y col.<sup>107</sup> quienes detectaron actividad colagenolítica intersticial asociada a la membrana plasmática de carcinoma de células pequeñas. En ambos casos no se pudo establecer una correlación de esta actividad con el grado de metástasis. La actividad colagenolítica intersticial presente en un tejido puede no sólo deberse a MMP-1 ya que existe otra enzima que es capaz de degradar este sustrato que es la MMP-13 o colagenasa tipo 3.<sup>105</sup> Esta enzima ha sido identificada en cáncer de mama, por lo que no es de extrañarse que en carcinomas pulmonares tenga alguna participación.

Otra de la MMPs que se encontraron presentes en este estudio fue la MMP-3 o estromelisin-1. MMP-3 se observó en gran cantidad en las células A-427 y SKLU-1 correspondientes a adenocarcinoma y en menor grado en las otras líneas celulares. Por medio del Western blot pudo corroborarse este dato para el caso de SKLU-1, CALU-1 y NCI-H69 detectándose esta enzima en su forma latente sin que pudiera observarse actividad en los geles con caseína. La expresión de MMP-3 ha sido estudiada por Bolon y col.<sup>108</sup> quienes hallaron ARNm correspondiente a MMP-3 en el 41% de los carcinomas epidermoides que estudiaron. De estos sólo en el 10 % de los casos, los transcriptos se encontraron en las células neoplásicas mientras que el 31 % estaba presente en el estroma. En los adenocarcinomas se encontró en el 4 % de los casos en las células neoplásicas mientras que los carcinomas de células pequeñas no presentaron transcriptos para esta MMP. Estos hallazgos aparentemente no coinciden con los resultados que se obtuvieron con las células y sus extractos, sin embargo en los medios de cultivo de las líneas celulares se pudo identificar la presencia de bandas de alto peso molecular que pueden corresponder a complejos de alto peso molecular de MMP-3 con TIMP-2/proMMP-2. La participación de MMP-3 en este tipo de interacción es de un activador de los complejos TIMP-2/proMMP-2 con la participación o no de otras proteasas como la plasmina.<sup>109</sup> Esta enzima además puede también activar complejos de TIMP-1/proMMP-9 además de promatrilisina, proMMP-2 y proMMP-9 libres.<sup>110-111</sup> El origen celular de MMP-3 en cáncer es ambiguo ya que esta enzima ha sido identificada tanto en las células de

estroma como en las células neoplásicas.<sup>112-113</sup> En el presente trabajo, la presencia de esta enzima en las células de cáncer pulmonar y en el medio de cultivo indica que por lo menos estas líneas celulares son capaces de sintetizarla aunque en estado latente requiriendo para su activación probablemente la presencia de un activador como la plasmina. Una vez activa, MMP-3 puede a su vez activar los complejos de TIMP-2/proMMP-2 de los cuales se hará mención más adelante.

En este trabajo pudo también detectarse la producción y actividad de MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B). MMP-2 pudo identificarse en el medio de las células correspondientes a carcinomas epidermoides por medio de zimogramas de gelatina sin que pudiera detectarse esta enzima ni en el medio de las otras células ni en los extractos celulares. Sin embargo, en los ensayos con gelatina radiactiva, se pudo observar una gran actividad gelatinolítica en todas las muestras de medios y extractos celulares. La mayor actividad gelatinolítica se detectó en los extractos celulares de las células correspondientes a carcinoma de células pequeñas mientras que la menor actividad se observó en el medio de estas células en presencia o no de APMA. Las células SKLU-1 (adenocarcinoma) también mostraron una alta actividad tanto en el medio como en los extractos celulares. Las diferencias en los resultados de actividad gelatinolítica que se encontraron al usar el ensayo radiactivo, por el cual fue posible detectar actividad en todas las muestras que se estudiaron, y los resultados de zimografía, pueden atribuirse a diferencias entre ambas técnicas. Estas diferencias de resultados

puden deberse a la presencia de complejos de alto peso molecular entre las MMPs y otras moléculas como sus inhibidores, que impidieron la detección de actividad gelatinolítica por zimograma.

Los resultados de actividad de gelatinasas concuerdan con los hallazgos de Momiki y col.<sup>114</sup> quienes detectaron bandas de lisis de aproximadamente 68 y 64 kD en el medio condicionado concentrado de líneas de cáncer pulmonar. Zucker y col.<sup>115</sup> también observaron actividad gelatinolítica por zimograma, en el medio de SKMES-1 pero no pudieron detectar actividad en el medio de CALU-1 por medio del mismo ensayo. Ellos observaron también discrepancias entre la cantidad de MMP-2 que detectaron en sus ensayos y los resultados del zimograma. Ambos autores en sus trabajos no evaluaron la actividad gelatinolítica basal de sus células por otras técnicas, ni estudiaron tampoco el contenido ni la actividad de estas MMPs en las células.

Los ensayos de Western blot permitieron detectar a MMP-9 probablemente en su estado latente y polímeros de alto peso molecular de esta enzima en los medios de cultivo de todas las líneas celulares de cáncer, mientras que MMP-2 se observó en los carcinomas epidermoides y en el carcinoma de células pequeñas. Sólo en las células de SKMES-1 se pudo detectar una banda que correspondería a la forma activa de MMP-2. Aunque la presencia de MMP-2 y MMP-9 se pudo corroborar por los ensayos de inmunotransferencia e inmunocitoquímica en todas las células que se estudiaron, las células SKLU-1 mostraron poca reacción de tinción para MMP-2 en ambos ensayos.

En términos generales, estos resultados sugieren la participación de MMP-9 en la degradación de gelatina tanto por el medio como por los extractos celulares de las líneas de cáncer pulmonar, aunque en el caso de los carcinomas epidermoides y del carcinoma de células pequeñas MMP-2 puede también contribuir. En este sentido, Brown y col.<sup>116</sup> mostraron la presencia de proMMP-9 en tejido neoplásico así como en el tejido vecino normal, y la presencia de las formas activas de MMP-2 y MMP-9 en el tejido neoplásico. Estos estudios los realizaron por medio de zimogramas de homogenados de tejido lo cual no les permitió identificar el origen celular de estas enzimas. Es de hacer notar que estos autores demostraron una correlación entre la presencia de la forma activa de MMP-2 y el comportamiento metastásico de los carcinomas epidermoides y de los adenocarcinomas que se estudiaron, relación que no fue posible establecer con la forma activa de MMP-9.

La invasión de los tejidos vecinos ocurre también durante algunos procesos fisiológicos como la implantación del trofoblasto, la proliferación del endometrio y la embriogénesis, en los cuales existe una intensa degradación de la ME por medio de las MMPs.<sup>117-119</sup> En estos procesos la actividad de las MMPs parece estar regulada por sus inhibidores específicos, los TIMPs. Por el contrario, durante la invasión neoplásica el incremento en la destrucción de la ME parece relacionarse con la pérdida en la regulación de la actividad de las MMPs por sus inhibidores. En relación a esto, algunos autores han demostrado una disminución en el potencial de invasión de las células neoplásicas utilizando TIMP-1 y TIMP-



2.<sup>120-121</sup> Aunado a esto, en algunos cánceres se ha logrado establecer una correlación entre la agresividad de la neoplasia y la expresión de TIMPs, sugiriéndose que una disminución de la expresión de TIMP conlleva a un incremento de la actividad de MMPs y por lo tanto del potencial invasivo de una neoplasia.<sup>122</sup> Sin embargo, existe también evidencia de la asociación entre el incremento de la expresión de TIMP y el incremento en la capacidad metastásica de algunos tipos de cáncer, lo cual pone en evidencia la compleja interacción que existe entre las MMPs y sus inhibidores en el espacio extracelular.<sup>123</sup>

En este trabajo se detectó TIMP-2 en los adenocarcinomas y en el carcinoma de células pequeñas por medio de inmunohistoquímica, aunque por Western blot este inhibidor no fue posible detectarlo en forma libre a pesar de que se utilizaron dos anticuerpos diferentes contra esta molécula. En algunas células y medios de cultivo lo que pudo observarse fue polímeros de TIMP-2. Sin embargo, el hallazgo más importante fue la presencia de complejos de alto peso molecular en las células y medio de SKLU-1 y en los medios de las otras líneas celulares que bien pueden corresponder a los complejos proMMP-2/TIMP-2. En este contexto, se ha reportado que la unión de proMMP-2 con TIMP-2 forma un complejo proMMP-2/TIMP-2 el cual requiere para su activación de la interacción con una MMP de membrana, la MT-MMP.<sup>51,58</sup> Esta metaloproteasa de membrana es capaz de activar tanto la proMMP-2 libre como formando complejos con TIMP-2. Este tipo de complejos han sido identificados en el medio de cultivo de células normales y de células neoplásicas.<sup>124</sup>

La presencia probable de los complejos proMMP-2/TIMP-2 en las muestras que se estudiaron pueden explicar por lo menos en parte, el hecho de que en los zimogramas no pudo detectarse la actividad de MMP-2 con excepción de los medios de SKMES-1 donde se observa claramente una banda de lisis. En esta línea celular la presencia de MMP-2 libre se corroboró también por el ensayo de Western blot.

TIMP-1 se detectó en el medio de cultivo de todas las líneas celulares con excepción del medio del carcinoma de células pequeñas. Así mismo, fue posible encontrar bandas de 38 y 48 kD de peso molecular en las células con excepción nuevamente, de NCI-H69. Estas bandas pueden corresponder a polímeros de TIMP-1 ya que también se encuentran en el control.

Zucker y col.<sup>115</sup> pudieron detectar la presencia de TIMPs en el medio de cultivo de algunas líneas celulares de cáncer pulmonar, encontrando una mayor concentración de TIMP-2 en relación a TIMP-1 tanto en su forma libre como formando complejos moleculares.

Una vez que se identificaron cuales eran las MMPs que las líneas celulares de cáncer pulmonar eran capaces de sintetizar, y de establecer los niveles de actividad colagenolítica y gelatinolítica de estas células, se realizó un ensayo de invasión *in vitro*. Este ensayo fue hecho con el propósito de observar si existían diferencias en el comportamiento invasivo entre las distintas células y además si la actividad basal de las MMPs se modificaba. En el presente estudio se encontró que todas las células que se examinaron pueden penetrar el Matrigel. Sin

embargo parece ser que la diferencia esta en las interacciones que se establecen con este sustrato. Mientras las células neoplásicas así como los fibroblastos son capaces de atravesar el Matrigel y llegar al otro lado, la mayoría de las células de epitelio quedan embebidas en el Matrigel logrando pasar sólo un bajo porcentaje. Esto puede deberse por un lado, a que estas células establecen uniones con alguno de los componentes del Matrigel como la laminina, y por otro, que estas células al no ser normalmente invasivas no requieren de degradar o modificar este sustrato y permanecen adheridas a él durante todo el ensayo. Por el contrario, los fibroblastos que normalmente pueden pasar a través de los tejidos en los procesos de reparación, pasan a través del Matrigel siguiendo un quimioattractante que en este caso fue fibronectina que se colocó en el pozo inferior. En cuanto al comportamiento de las células neoplásicas, las células NCI-H69 (carcinoma de células pequeñas) se comportan de manera diferente al resto de las líneas, ya que si bien inician su paso a través del Matrigel de manera similar, al poco tiempo y durante varias horas del ensayo, estas células quedan atrapadas en el Matrigel para después súbitamente pasar hacia el filtro. Estas células en particular tienen un patrón de crecimiento en cultivo diferente a las demás ya que crecen en suspensión formando cúmulos de células. Es posible que al estar agrupadas, las células aumenten su capacidad invasiva modificando su entorno aunque el mecanismo molecular aún no esta claro. Al final del ensayo la capacidad de invasión de las células de carcinoma de células pequeñas es similar al de las otras líneas de células neoplásicas. En los ensayos que se

realizaron para establecer si existían modificaciones en la actividad de MMPs cuando las células interaccionan con el Matrigel, se encontró la aparición de bandas de actividad gelatinolítica correspondientes a proMMP-9, así como la activación de una banda de 110 kd que puede bien corresponder a dímeros de esta MMP. Ninguna de estas bandas se encontró en los medios del Matrigel que se había incubado solo, ni en los medios de cultivo de las células que hasta el momento se habían cultivado en ausencia de este sustrato, por lo que la actividad gelatinolítica que se detectó por esta técnica proviene de la interacción célula-neoplásica-Matrigel. Al medir la actividad gelatinolítica con un sustrato radiactivo, nuevamente se encontraron discrepancias entre ambas técnicas ya que se pudo detectar actividad de gelatinasa en los medios de todas las células. Esta actividad fue en general mayor que la que anteriormente se había encontrado cuando las células se cultivaron solas con excepción de CALU-1 y A-427. Por medio de esta técnica no se observó tampoco actividad de gelatinasa en el medio de Matrigel cuando se incubó solo.

Al cultivar las células en presencia de gelatina aparece MMP-9 en su forma activa así como probablemente dímeros de esta enzima. Al utilizar gelatina radiactiva, se pudo detectar un aumento de la actividad de gelatinasas en todas las células con excepción nuevamente de CALU-1, y de NCI-H69 y WISH.

Al parecer los sustratos como el Matrigel y la gelatina pueden inducir la activación de gelatinasas como MMP-9 cuyo zimógeno originalmente se había detectado en todas las células neoplásicas (Western blot), aunque también como sucede en el

caso de la gelatina, el origen de esta MMP puede ser extracelular (ver adelante). La actividad gelatinolítica de las células WISH a diferencia de las otras líneas sólo es detectable por zimograma donde probablemente el SDS participe en su activación al provocar un cambio conformacional en las MMPs. Cuando se ha medido la actividad del medio de estas células usando gelatina radiactiva la actividad sólo se detecta al usar APMA (datos de experimentos paralelos que no se presentan en esta tesis). Aunque WISH tiene MMP-2 y MMP-9, es muy probable que estas enzimas se mantengan latentes y por lo tanto, estas células permanecen adheridas al Matrigel.

La participación de las interacciones de los componentes de la ME con las células neoplásicas y la actividad de las MMPs durante el proceso de invasión aún no está clara. Algunos autores han encontrado un aumento de la actividad de MMP-2 en presencia de laminina o de péptidos correspondientes a la cadena A de esta molécula.<sup>125-127</sup> Sin embargo, el origen de la MMP-2 podría no ser de la célula neoplásica sino de los mismos componentes de la ME como ha sido señalado por Mackay y col.<sup>128</sup> Estos autores al parecer encontraron a MMP-2 en los preparados de laminina (Ln1) y de Matrigel. A pesar de este hallazgo, en el presente estudio no fue posible detectar actividad gelatinolítica en los medios de cultivo del Matrigel cuando fue incubado solo, ni por zimograma ni por actividad sobre gelatina radiactiva sin que por ello se descarte la presencia de esta enzima en el Matrigel que se utilizó. En el caso de los cultivos con gelatina, aunque por zimograma no se detectó actividad gelatinolítica en la gelatina que se cultivo sola,

en los geles de electroforesis se observó una banda de 110 kD que no aparece en los medios de las células solas y que coincide con las bandas de lisis del zimograma. Es posible que esa banda corresponda a dímeros de MMP-9 que están presentes en la gelatina y cuya activación sucede al interaccionar las células con este sustrato.

Estos resultados junto con otros estudios ponen en evidencia que la célula neoplásica puede utilizar las MMPs que son sintetizadas por ellas, activar a las enzimas que producen las células normales vecinas y/o activar a las enzimas que se encuentran unidas a los componentes de la ME durante el proceso de invasión. Los mecanismos moleculares por los cuales la célula neoplásica activa a las MMPs extracelulares aún no están claros. Una de las principales hipótesis que se tienen al respecto guarda relación con la activación de proMMP-2 y la participación de TIMP-2 en este evento. Al respecto se han podido identificar la formación de complejos moleculares entre TIMP-2, proMMP-2 y MT-MMP, en la membrana plasmática de células neoplásicas.<sup>129</sup> Este mecanismo de activación permite que la célula neoplásica pueda utilizar a la proMMP-2 exógena, además de limitar la proteólisis de la ME al sitio de contacto de la célula con ésta.<sup>130</sup> proMMP-2 no es la única capaz de formar complejos. También se han identificado complejos moleculares similares entre proMMP-9 y TIMP-1 sólo que en este caso el mecanismo de activación estaría mediado por estromelisina.<sup>57</sup> Finalmente, las MMPs particularmente MMP-2 parecen tener otro papel además de la degradación de la ME durante el proceso de invasión. Se ha reportado la

influencia de la MMP-2 en la migración de las células neoplásicas a través de ME mediante mecanismos independientes de la proteólisis de sus componentes.<sup>131</sup>

El mecanismo molecular por el cual MMP-2 puede modificar el comportamiento migratorio de las células está en estudio. Entre los primeros hallazgos se ha encontrado que MMP-2 causa un corte específico en un componente de la ME conocido como Ln-5 o kalinina, en su subunidad  $\gamma 2$  que provoca la migración de células epiteliales que antes no tenían esta capacidad.<sup>132</sup>

En conclusión, en los estudios de invasión *in vitro* que se realizaron en la presente tesis, la penetración de las células a través del Matrigel no sólo sería consecuencia directa de la actividad proteolítica de enzimas como MMP-9 y MMP-2, sino que la activación particularmente de esta última puede influir en transformaciones de la misma ME que favorecerían la migración de las células neoplásicas.

### Conclusiones

- Las células neoplásicas pulmonares son capaces de sintetizar diferentes MMPs y sus inhibidores.
- MMP-1 se detectó en los carcinomas epidermoides y en el carcinoma de células pequeñas como zimógeno
- La actividad colagenolítica intersticial que se observó en el estudio puede provenir en parte de MMP-1

- MMP-3 se encuentra en todas las células en estado latente o formando complejos con TIMP-2/proMMP-2.
- No fue posible detectar actividad de esta MMP (actividad sobre caseína).
- MMP-2 se detectó en todas las células: en forma activa y libre en los carcinomas epidermoides, latente en el carcinoma de células pequeñas y formando complejos como proMMP-2 con TIMP-2 en los adenocarcinomas y carcinomas epidermoides
- MMP-9 se detectó en todas las células como proenzima o formando dímeros
- En todas las muestras se encontró actividad gelatinolítica especialmente en los extractos celulares del carcinoma de células pequeñas la cual puede provenir de la acción de ambas gelatinasas
- TIMP-1 se encontró libre o formando polímeros en todas las células con excepción del carcinoma de células pequeñas.
- La ausencia de TIMP-1 de estas células podría explicar en parte el potencial altamente metastásico que tiene *in vivo* este tipo de cáncer.
- A pesar de las diferencias que existen entre el estado metabólico de MMP-2 y MMP-9 en las líneas de cáncer que se estudiaron, con excepción del carcinoma de células pequeñas, todas las células neoplásicas invaden de manera similar el Matrigel
- Sin embargo no existen diferencias con otras células que normalmente tienen esta capacidad sin ser células neoplásicas.
- Sólo las células invasivas pasan a través del Matrigel a pesar de que las no invasivas posean MMPs



- La interacción de las células invasivas con el Matrigel favorece la activación de algunas MMPs como MMP-2 y MMP-9
- Al ponerse en contacto las células invasivas con la ME se activan la MMPs presentes en éstas o en la ME. Estas enzimas degradan los componentes de la ME, además de favorecer cambios en la adherencia de la célula a la ME permitiendo su migración a través de ésta. Los mecanismos moleculares por los cuales las MMPs intervienen no sólo en la degradación de la ME sino también en el resto del proceso de invasión están actualmente en estudio.

#### **Bibliografía**

1. Szabo E, Mulshine J: Epidemiology, prognostic factors, and prevention of lung cancer. *Current Opinion in Oncology* 5:302-309, 1993.
2. Boring CC, Squire TS, Tong T: Cancer Statistics, 1992. *CA* 42:19-38, 1992.
3. Sethi T: Lung cancer. *BMJ* 314:652-655, 1997.
4. Anuario Estadístico 1996. Secretaría de Salud, Subsecretaria de Coordinación. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación, 1997.
5. Smyth JF: Cancer genetics and cell and molecular biology. *Chest* 109:125S-128S, 1996.
6. Chaieb JA, Spolidoro JV, Caleffi M: Bronquial carcinoma: etiologic factors in occupational exposure. *J Neumol* 8:15-19, 1982.
7. Kabat G: Recent developments in the epidemiology of lung cancer. *Semin Surg Oncol* 9: 73-79, 1993.

8. Cavila DG, Williams DE: The etiology of lung cancer, *Mayo Clin Proc* 68:170-182, 1993.
9. Tomatis L: Out door air pollution and lung cancer. *Ann Oncol* 2:265-267, 1991.
10. Lynch Ht, Kimblerling WJ, Markwicha SE, et al: Genetics and smoking-association cancers: A study of 485 families. *Cancer* 57:1640-1646, 1986.
11. Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, et al: Evidence of Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J JNCI* 82:1272-1279, 1990.
12. Dockery DW, Pope III A, Xu X, et al: An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329: 11753-1759, 1993.
13. Cairns J: Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 235:197-200, 1975.
14. Becker F: Recent concepts of initiation and promotion in carcinogenesis. *AJP* 105:3-9, 1981.
15. Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28, 1976.
16. Vogelstein B, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141, 1993.
17. Hunter T: The proteins of oncogenes. *Sci Am* 251:70-79, 1984.
18. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146, 1991.
19. Cavenee WK, White RL: The genetic basis of cancer. *Sci Am* 272:50-57, 1995.

20. Viallet J, Minna JD: Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:225-232, 1990.
21. Giaccone G: Oncogenes and antioncogenes in lung tumorigenesis. *Chest* 109:130S-134S, 1996.
22. Szabo E, Birrer MJ: Oncogenes, cancer and growth factors. En *Molecular biology of lung disease*. Barnes PJ, Stockley RA eds. Blackwell Scientific Publications, pags 173-191, 1994.
23. Taller A, Chilivers ER, Hannah Sh, Dransfield I, Lawson MF, Haslett Ch, Stethi T: Inhibition of neuropeptide stimulated tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity stimulates apoptosis in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 56:4255-4263, 1996.
24. Reeve JG, Bleehen NM: [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup> Leu<sup>11</sup>] Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1313-1319, 1994.
25. Nicolson GL: Molecular mechanisms of cancer metastasis: tumor and host properties and the role of oncogenes and suppressor genes. *Cur Opin Oncol* 3:75-92, 1991.
26. Liotta LA: Gene products which play a role in cancer invasion and metastasis. *Breast Can Res Treat* 11:113-124, 1988.
27. Muschel RJ, Williams JE, Lowry DR, Liotta LA: Harvey ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am J Pathol* 121:1'8, 1985.

28. Ura H, Bonfil RD, Reich R, Reddel R, Pfeifer A, Harris CC, Klein-Szanto AJP: Expression of type IV collagenase and procollagen genes and its correlation with the tumorigenic, invasive and metastatic abilities of oncogene-transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 49:4615-4621, 1989.
29. Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA, Minna JD: Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1092-1096, 1986, 1986.
30. Sobel ME: Metastasis suppressor genes. *J Natl Cancer Inst* 82:267-276, 1990.
31. Kawakubo Y, Sato Y, Koh T, Kono H, Kameya T: Expression of nm23 protein in pulmonary adenocarcinomas: inverse correlation to tumor progression. *Lung Cancer* 17:102-113, 1997.
32. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS: Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 49:5185-5190, 1989.
33. Myeroff LL, Markowitz SD: Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutations in colon carcinomas of low and high metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 85:147-152, 1993.
34. Radinsky R, Weisberg HZ, Staroselsky AN, Fidler IJ: Expression level of the nm23 gene in clonal populations of metastatic murine and human neoplasms. *Cancer Res* 52:5808-5814, 1992.

35. Kushtai G, Barzilay J, Feldman M et al: The expression of the c-fos oncogene in murine 3llcarcinoma clones is correlated with the expression of MHC genes and thereby inversely correlated with the metastatic phenotype. *Oncogene* 2:119-127, 1988.
36. Dear TN, Ramshaw IA, Kefford RF: Differential expression of a novel gene, WDNM1, in nonmetastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 48:5203-5209, 1988.
37. Dear TN, Ramshaw IA, Kefford RF: Transcriptional down regulation of a rat gene, WSNM2, in metastatic DMBA-8 cells. *Cancer Res* 49:5323-5328, 1989.
38. Lance LA: Cancer cell invasion and metastasis *Sci Am Med* 4:142-149, 1993.
39. Ruoslahti E: How cancer spreads. *Sci Am* 275:42-47, 1996.
40. Bernhein LR, Liotta LA: Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Op Oncol* 6:106-113, 1994.
41. Akiyama SK, Olden K, Yamada KM: Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer and Metas Rev* 14:173-189, 1996.
42. Ruoslahti E, Reed JC: Anchorage dependence, integrins and apoptosis. *Cell* 77:477-78, 1994.
43. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F et al: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not their benign counterparts. *Lab Invest* 49:140-, 1983.

44. Mignatti P, Rifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Rev* 73:161-191, 1993.
45. Hart IR: Mechanisms of tumor cell invasio. En *Cancer Biology Reviews*. Marchaonis JJ, Hana MG (eds), New York, Marcel-Decker, pp 29-58, 1981.
46. Bruijn JA, Hogendoorn PCW, Hoedemaeker PJ, Fleuren GJ: The extracellular matrix in pathology. *J Clin Med* 111:140-149, 1988.
47. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE: Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 131:281-189, 1985.
48. Stracke ML, Liotta LA: Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In vivo* 6:309-316, 1992.
49. Woessner FJ, Jr: The family of matriz metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 732:11-21, 1994
50. Stetler-Stevenson WG: Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 148:1345-1350, 1996.
51. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Selki M: A matrix metalloproteinases expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.
52. Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M: Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMP form a unigque membrane type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270:23021-23030, 1995.

53. Will H, Hinzmann B: cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231:602-608, 1995.
54. Pei D, Weiss S: Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375:244-247, 1995.
55. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM: Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmac Ther* 59:329-341, 1993.
56. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell Docherty A: Regulation of matrix metalloproteinases Activity. *Ann N Y Acad Sci* 732:31-41, 1994.
57. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL: Interactions of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267:4583-4591, 1992.
58. Strongin AY, Collier Im Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: Mechanisms of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 270:5331-5338, 1995.
59. Kishnani NS, Staskus PW, Yang T, Masiarz FR, Hawkes S: Identification and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and detection of three additional metalloproteinase inhibitor activities in-extracellular matrix. *matrix Biol* 14:479-488, 1994.

60. Gray ST, Yun K, Motoori T, Kuys YM: Interstitial collagenase gene expression in colonic neoplasia. *Am J Pathol* 143:663-671, 1993
61. Muller D, Breathnach R, Engelmann A, Millon R, Bronner G, Flesch H, Dumont P, Eber M, Abecassis J: Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. *Int J Cancer* 48:550-556, 1991.
62. Polette M, Clavel C, Muller D, Abecassis J, Binnering I, Birembaut P: Detection of mRNAs encoding collagenase 1 and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization. *Invasion Metastasis* 11:76-83, 1991.
63. Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell: Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metstasis* 11:183-189, 1993.
64. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K: Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 52:1336-1341, 1992.
65. Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Increased expression of the Mr 72,000 type Iv collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 51:439-444, 1991.
66. Boag, AH, Young ID: Immunohistochemical analysis of type IV collagenase expression in prostatic hyperplasia and adenocarcinoma *Mod Pathol* 6:65-68, 1993.
67. Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, Adida C, Loriot M, Bellocq JP, Cambon P, Basset P: Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast



carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1843-1847, 1993.

68. Wolf C, Chenard MP; Durand de Grossouvre P, Bellocq JP, Chambon P, Basset P: Breast-cancer-associate stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* 99:870-872, 1992.

69. McDonnell S, Navre M, Coffey R, Jr, Matrisian LM: Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog* 4:527-533, 1991.

70. Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Senota A, Yoshimoto M, Nakamura H, Imai K, Yachi A: Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 201:657-664, 1994.

71. Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT: Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 117:144-150, 1991.

72. Crawford HC, Matrisian LM: Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 95:234-245, 1994.

73. Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ: Metalloproteinases in tumor progression: The contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis* 95:246-258, 1994.

74. Gray ST, Wilkins RJ, Yun K: Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 141: 301-306, 1992.
75. Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Kono M: Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: Its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer* 55:19-26, 1993.
76. Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C: Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 53:3154-3158, 1993.
77. Nabeshima K, Lane WS, Biswas C: Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Arch Biochem Biophys* 285:90-96, 1994.
78. Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GW: Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 m RNAs in colorectal neoplasia. *Am j Pathol* 141:389-396, 1992.
79. Emonard HP, Reacle AG, Noel AC, Grimaud A, Stetler-Stevensos WG, Foidart JM: Tumor cell surface-associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res* 52:5845-5848, 1992.
80. Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hamby A, Balkwill F: Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion *Cancer Res* 53:5365-5369, 1993.

81. Stearns ME, Wang M: Type IV (Mr 72,000) expression in human prostate: Bening and malignant tissue. *Cancer Res* 53:878-883, 1993.
82. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal , benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 136:585-592, 1990.
83. Kawahara E, Okada Y, Nakanashi I, Iwata K, Kojima S, Kumagai S, Yamamoto E: The expression of invasive behavior of differentiated squamous carcinoma cell line evaluated by an in vitro invasion model. *JPN J Cancer Res* 84:409-418, 1993.
84. Otani N, Tsukamoto T, Saiki I, Yoneda J, Mitaka T, Kumamoto Y: In vitro invasive potential and type IV collagenolytic activity of human renal cell carcinoma cells derived from primary and metastatic lesions. *J Urol* 149:1182-1185, 1993.
85. Garbisa S, Pozzati R, Muschel R, Saffiotti U, Ballin M Goldfarb R, Khoury G, Liotta LA: Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: Incuction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res* 1523-1528, 1987.
86. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH: Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor - induced host response. *Am J Pathol* 149:273-282, 1996.
87. Ballin M Gómez D, Sinha C, Thorgeirsson U: Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase, strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 154:832-838, 1988.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

88. Bernhard E, Muschel R, Hughes R: Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 50:3872-3877, 1990.
89. Urbanski SJ, Edwards DR, Mailand A, Leco KJ, Watson A, Kossakowska AE: Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 66:1188-1194, 1992.
90. Canete-Soler R, Litzky L, Lubensky I, Muschel RJ: Localization of the 92 kD gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization, *Am J Pathol* 144:518-527, 1994.
91. Ginsberg RJ, Kris MG, Armstrong JG: Cancer of the lung. En DeVita, Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, Lippincott, pp673-758, 1993.
92. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
93. Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, Yamamoto S: A rapid assay method of collagenase activity using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim Biophys Acta* 445:753-762, 1976.
94. Miller EJ, Rhodes RK: Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol* 82 (ptaA):33-64, 1982.

95. Lefevre MF, Slegers GA, Claeys AE: Evaluation of a rapid, sensitive and specific assay for the determination of collagenolytic activity in biological samples. *Clin Chim Acta* 92:167-175, 1979.
96. Sunada H, Nagai Y: a rapid microassay method for gelatinolytic activity using tritium-labeled heat-denatured polymeric collagen as a substrate and its application to the detection of enzymes involved in collagen metabolism. *J Biochem* 87:1765-1772, 1980.
97. Laemli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227:680-684, 1970.
98. Vadillo F, González G, Furth E, Hanqin L, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss, III, JF: 92 kD type IV collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 146:148-156, 1995.
99. Watcher MP, Krutzsch HC, Liotta LA, Stetler-Stevenson W: Development of a novel substrate capture immunoassay for the detection of a neutral metalloproteinase capable of degrading basement membrane (type IV) collagen. *J Immunol Methods* 126:239-245, 1990.
100. Corcoran M, Stetler-Stevenson W, Brown PD, Wahl LM: Interleukin inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa Type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 267: 515-519, 1992.

101. Kleiner DE, Unsworth EJ, Kruttsch HC, Stetler-Stevenson WG: Higher-order complex formation between the 72-kilodalton type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Biochemistry* 31:1665-1672, 1992.
102. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, Mc Ewan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47:3239-3245, 1987.
103. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE: Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 7:1434-1441, 1993.
104. Gray ST, Wilkins RJ, Yun K: Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 141:301, 306, 1992.
105. Freije JMP, Diez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269:16766-16773, 1994.
106. Kobayashi T, Maruyama K, Sakakibara H, Murakami M, Yoshimatsu H, Okasaki I, Suzuki H: Collagenase activity in breast and lung cancer. En *Collagen and Mamalian Collagenase*. Tsuchiya M, Pérez-Tamayo R, Okazaki I, Maruyama K. (eds). Excerpta Medica. Amsterdam, 1982. pp 91-104.
107. Zucker S, Wieman JM, Lysik RM, Wilkie D, Ramamurthy NS, Golub LM, Lane B: Enrichment of collagen and gelatin degrading activities in the plasma membranes of human cancer cells. *Cancer Res* 47:1608-1614, 1987.

108. Bolon Isabelle, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla Ch, Brambillia E: Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 150:1619-1629, 1997.
109. Miyazaki K, Umenishi F, Funahashi K, Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M: Activation of TIMP-2/progelatinase A complex by stromelysin. *Bioch Biophys Res Commun* 185:852-859, 1992.
110. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H: Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinases-3 (stromelysin). *Biochemistry* 29:10261-10270, 1990.
111. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJP. Stromelysin is an activator of procollagenase. *Biochem J* 248:265-268, 1987.
112. Matrisian LM, Bowden TG: Stromelysin/Transin and tumor progression. *Cancer Biol* 1:107-115, 1990.
113. Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, Eizen AZ, Marmer BL, Grant GA, Bauer EA, Goldberg GI: Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differentiated expression on normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6725-6729, 1987.
114. Momiki S, Baba M, Caamano J, Iizasa T, Nakajima M, Yamaguchi Y, Klein-Szanto A: In vivo and in vitro invasiveness of human lung carcinoma cell lines. *Invasion metastasis* 11:66-75, 1991
115. Zucker S, Lysik RM, Malik M, Bauer BA, Caamano J, Klein-Szanto AJP: Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung

cancer cell lines and revertant cell lines: Not an invariant correlation with metastasis.

Int J Cancer 52:366-371, 1992.

116. Brown PD, Blowidge RE, Stuart NSA, Gatter KC, Carmichael J: Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst 85:574-578, 1993.

117. Lala PK, Graham CH: Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: The role of proteases and protease inhibitors. Cancer Metastasis Rev 9:369-379, 1990.

118. Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Guidice LC, Gorstein F: Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. J Obstet Gynecol 168:253-260, 1993.

119. Alexander CM, Werb Z: Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. J Cell Biol 118:727-739, 1992.

120. Schults RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF: Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B-16-F10 melanoma cells. Cancer Res 48:5539-5545, 1988.

121. De Cleark YA, Yean TD, Chan D, Shimida H, Langley KE: Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. Cancer Res 51:2151-2157, 1991.



122. Ponton A, Coulombe B, Skup D: Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res* 51:2138-2143, 1991.
123. Testa JE: Loss of the metastatic phenotype by a human epidermoid carcinoma cell line, Hep-3, is accompanied by increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Res* 51:2138-2143, 1992.
124. Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG: Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* 43:163-170, 1993.
125. Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN, Liotta LA: Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J Biol Chem* 261:1883-1889, 1986.
126. Teale DM, Khidair IA, Potter CW, Rees RC: Modulation of type IV collagenase and plasminogen activator in a hamster fibrosarcoma by basement membrane components and lung fibroblasts. *Br J Cancer* 57:475-480, 1989.
127. Stack MS, Gray RD, Pizzo SV: Modulation of plasminogen activation and type IV collagenase activity by a synthetic peptide derived from the laminin A chain. *Biochemistry* 30:2073-2077, 1991.
128. Mackay A, Gómez DE, Nason AM, Thorgeirsson UP: Studies on the effects of laminin, E-8 fragment of laminin and synthetic laminin peptides PA22-2 and YIGSR on matrix metalloproteinase expression. *Lab Invest* 70:800-806, 1994.

129. Stetler-Stevenson WG: Progelatinase A activation during tumor cell invasion  
Invasion Metastasis 14:259-268, 1994-95.
130. Monsky WL, Kelly T, Lin ChY, Yeh Y, Stetler-Stevenson WG, Mueller SC,  
Chen WT: Binding and localization of M, 72,000 matrix metalloproteinase at cell  
surface invadopodia. Cancer Res 53:3159-3164, 1993.
131. Ray JM, Stetler-Stevenson WG: Gelatinase A activity directly modulates  
melanoma cell adhesion and spreading. EMBO J 14:908-917, 1995.
132. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta  
V: Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5.  
Science 277:225-228, 1997.