

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

19
20.

ESTUDIO CORRELATIVO DE LA ACTIVIDAD DE
SERINOPROTEINASAS, COLAGENASA, TIOLPROTEINASAS,
ONCOGEN c-H-ras Y GEN nm23 EN LAS DIFERENTES
ETAPAS CLINICAS DEL CARCINOMA CERVICO UTERINO.

TESIS DE MAESTRIA

QUE PRESENTA LA

Q.B.P. MARIA DOLORES UTRERA BARILLAS

PARA OPTAR POR EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

(AREA BIOQUIMICA)

MEXICO, D. F.

1998.

266188

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE
INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES ONCOLOGICAS DEL
HOSPITAL DE ONCOLOGIA. CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO
XXI. IMSS.

BAJO LA TUTORIA DEL DR.LUIS BENITEZ BRIBIESCA Y
COTUTORIA DE LOS DOCTORES MAURICIO SALCEDO VARGAS Y
PATRICIO GARIGLIO VIDAL.

JURADO

PRESIDENTE: DR. JAIME MAS OLIVA

SECRETARIO: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS

PRIMER VOCAL: DR. LUIS BENITEZ BRIBIESCA

SUPLENTE: DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

SUPLENTE: DRA. MARIA DE LOURDES GUTIERREZ
XICOTENCATL

Indiscutiblemente que la VIDA es una AVENTURA FORMIDABLE y le doy GRACIAS por tres razones principales:

PRIMERA: Haber crecido en una familia en donde el cariño, respeto, apoyo incondicional y amor al trabajo son sus principales valores.

Gracias a mis PADRES: Ing. Abelardo Utrera Vázquez y
Profra. Dolores Barillas de Utrera.

TIO: Ing. Carlos Barillas Libreros.

HERMANOS: Dulce María, Elsa María, Leticia,
Abelardo y Carlos Utrera Barillas.

ABUELOS: Sr Andrés Barillas Díaz y
Sra. Petra Libreros de Barillas.

SEGUNDA: Tener por compañero a una persona que comprende mis inquietudes, me impulsa y comparte conmigo a tres PERSONITAS que son la alegría, la inocencia y el motor que impulsa nuestras vidas.

Gracias a mi ESPOSO: Ing. Othón Mendívil García y a mis
HIJAS: Miriam, Ingrid y Nayeli.

TERCERA: Dar-me la oportunidad de conocer a personas brillantes en el increíble mundo de la CIENCIA.

Al Dr. Luis Benítez Bribiesca por su calidad humana, deseo por motivarme y transmitir su reconocida experiencia.

Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas por su amistad y valiosas enseñanzas.

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal por su paciencia y disposición en asesorarme.

A los Doctores Jaime Berumen, Ma. de Lourdes Gutiérrez X. y Jaime Mas Oliva, por su tiempo y sugerencias para el enriquecimiento de esta tesis.

A todos ellos mi AGRADECIMIENTO eterno.

A todas aquellas personas, amigos y demás familiares que me brindaron su ayuda ya sea de manera técnica, intelectual y/o emocional para culminar este trabajo: ¡GRACIAS!.

Un especial agradecimiento al INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA y UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO por proporcionarme su apoyo para alcanzar este objetivo.

C O N T E N I D O

		Página
	RESUMEN	
I	INTRODUCCION.	1
	a Etapas de la carcinogénesis	1
	b Invasividad y metástasis. Conceptos generales.	4
II	ANTECEDENTES.	6
	a Las proteasas y la matriz extracelular. Receptores.	6
	b Proteasas relacionadas con invasividad:	8
	Catepsina B	10
	Activadores de plasminógeno	14
	Colagenasa	15
	Catepsina D y otras hidrolasas	18
	c Genética de la invasividad y metástasis	19
	Gen ras	20
	Gen nm23	25
	CD 44	29
	d Cáncer cérvico uterino como modelo de invasividad.	30
	e Otros mecanismos relacionados con invasividad y metástasis.	35
	f Pruebas para medir la capacidad metastásica.	37
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
IV	HIPOTESIS	41
V	OBJETIVOS:	
	General	41
	Específicos	42

VI	MATERIAL Y METODOS:	43
	a Población de estudio y criterios de inclusión	43
	b Procesamiento de las muestras	43
	c Técnicas de proteasas	44
	d Técnicas de genética molecular	49
	Inmunohistoquímica	
	Hibridación <i>in situ</i>	
	e Análisis estadístico	54
VII	RESULTADOS	56
VIII	DISCUSION	70
IX	CONCLUSIONES	81
X	CUADROS Y FIGURAS	83
XI	BIBLIOGRAFIA	105

RESUMEN

En la progresión del cáncer varios autores han reportado un incremento de la actividad enzimática de catepsina B, activadores de plasminógeno y colagenasa; estas enzimas son parte de una cascada proteolítica que favorece la invasión de la célula neoplásica. Se ignora si el fenotipo proteolítico aparece paralelamente a la sobreexpresión de genes promotores del proceso neoplásico e invasividad como el gen c-H-ras o a la inhibición de genes supresores de dicho proceso, como el gen nm23.

Se estudiaron biopsias de cérvix con y sin carcinoma epidermoide. En cada muestra se determinó la actividad proteolítica de cada enzima en la fracción soluble de los tejidos por el método fluorescente y la presencia de la proteína y el transcrito de los genes nm23 y c-H-ras, mediante las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, respectivamente. Los resultados de estos estudios se correlacionaron estadísticamente con la historia clínica de las pacientes.

La correlación de la actividad de catepsina B, proteínas NM23 y p21^{H-ras} mostró cuatro fenotipos diferentes que coinciden con la etapa clínica de la neoplasia. El grupo negativo a la proteína NM23 guarda una relación directa con la evolución del cáncer cérvico uterino. Los resultados sugieren que las proteínas NM23 y p21^{H-ras} participan en una vía común. La expresión de la proteína NM23 y el transcrito no guarda relación con el fenotipo invasor y es independiente de la sobrevida de las pacientes. La ausencia del transcrito nm23 en etapas avanzadas probablemente sea un evento tardío en la carcinogénesis del cáncer cérvico uterino. La asociación entre el inicio temprano de vida sexual activa y la ausencia de la proteína NM23 sugiere que existe una relación entre esta última y el virus del Papiloma Humano. Las actividades proteolíticas de colagenasa y activadores de plasminógeno no correlacionaron con la sobrevida de las pacientes.

INTRODUCCION

El término cáncer fue acuñado por Hipócrates (del latín *cancer* y del griego *karkínos*) y significa “cangrejo”, lo llamó así debido a la similitud histológica que guarda un cáncer de mama con la de un cangrejo (1). La aparición de esta neoplasia en un individuo es el resultado de múltiples procesos que llevan a una proliferación celular ilimitada, por evasión de los mecanismos fisiológicos de control de crecimiento, diferenciación y desarrollo normales. El problema del cáncer clínico es la invasividad y las metástasis, que conduce a la destrucción del tejido normal que lo rodea, diseminándose a tejidos y órganos distantes lo que finalmente, ocasiona la muerte al huésped (2).

a ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS.

La transformación de una célula normal a una maligna es un proceso complejo, entendido sólo parcialmente. Se ha propuesto que la carcinogénesis es un fenómeno de múltiples pasos y en forma general se han aceptado al menos tres que son: INICIACION, PROMOCION Y PROGRESION (1). Volgestein propuso que los pasos requeridos para el desarrollo del cáncer con frecuencia involucran la activación de un oncogén (mutación) asociado con la pérdida de varios genes que normalmente son supresores de neoplasias. Su modelo es cáncer de colon y en resumen consiste en

la progresión de la mucosa normal a hiperplasia con una alteración en el gen APC, la siguiente alteración es en el cromosoma 5 evolucionando a adenoma clase I, y al haber una mutación en el gen K-ras se produce un adenoma clase II, que al sufrir deleciones alélicas en el cromosoma 18 se transforma a adenoma clase III; cuando existen deleciones en el cromosoma 17 progresa a carcinoma y finalmente las alteraciones o pérdidas de otros genes conducen a metástasis (3-4).

Revisando las etapas clásicas de la carcinogénesis se tiene que la INICIACION involucra un cambio mutacional que es relativamente rápido e irreversible. Esta transformación obedece a agentes carcinógenos diversos como son sustancias químicas (aflatoxinas, asbesto, etc.), agentes biológicos (virus oncogénicos), radiaciones ionizantes y por otro lado a la susceptibilidad del individuo; esta última se puede manifestar a través de diferencias individuales en el metabolismo y reparación del DNA, inestabilidad genómica o expresión alterada de los proto-oncogenes o de los genes supresores. Cada uno de los carcinógenos tiene diferentes mecanismos de acción; unos actúan directamente sobre el DNA (ejem. hidroxilaminas, metoxiaminas, hidrazinas, formaldehído, agentes alquilantes como dimetilsulfato, etc); en otros, únicamente el producto de su metabolismo daña al ADN (entre ellos: hidrocarburos aromáticos policíclicos en el humo de cigarro, benzopireno, etc.); un tercer grupo actúa sobre los grupos fosfato o los residuos de azúcar del ADN. Todos ellos causando mutaciones directa o indirectamente o al menos disturbios en la distribución de cargas o geometría del ADN que finalmente pueden ocasionar

activación de proto-oncogenes en el genoma de la célula normal (5). PROMOCION: Comprende cambios en el fenotipo de la célula. La promoción resulta en proliferación y/o sobrevida de las células iniciadas, incrementa la probabilidad de daño genético adicional por mutaciones endógenas, o por exposiciones adicionales que dañan al ADN, lo que puede activar proto-oncogenes y genes supresores (2). Su intervalo de tiempo es largo y también es conocido como período de latencia. Se requieren aplicaciones repetidas del promotor; el tiempo entre una y otra aplicación no debe ser prolongado; el fenómeno puede ser reversible. Los agentes químicos promotores de tumor no son mutagénicos y por ello no actúan como transformadores de la célula normal, aunque se ha visto que después de una aplicación repetida pueden causar un número muy bajo de tumores benignos. Entre los promotores más conocidos están el aceite de crotón, el diéster de forbol (TPA:12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato), el teleocidin (aislado de *Streptomyces mediocidicus*), el ácido iodoacético, antralina, ciertos productos del humo de cigarro, esteroides, etc. PROGRESION: se ha aceptado que esta etapa se inicia con la selección de células tumorales que se han adaptado a influencias ambientales. En esta etapa las neoplasias muestran una gran heterogeneidad fenotípica que puede relacionarse con inestabilidad genética. Es irreversible, clínicamente aparente, invade tejidos vecinos y da siembras a distancia. Esta etapa cuando menos puede dividirse en otras dos: invasión y metástasis.

b INVASIVIDAD Y METASTASIS. CONCEPTOS GENERALES.

La invasión es la infiltración de células malignas en el tejido benigno. Para llegar a la metástasis (del latín: meta= más allá, estasis= detención), se requieren diferentes elementos tanto del hospedero como de la célula neoplásica y por ello mecanismos diferentes están implicados aportando cambios discretos hacia el fenotipo metastásico. Entre ellos están: a) desprendimiento de células neoplásicas del tejido primario; b) penetración de dichas células a través del tejido conectivo circundante y de las membranas basales; c) transporte en la circulación sanguínea de dichas células, donde pueden interactuar con componentes celulares como plaquetas y células NK; como consecuencia de estas interacciones la célula neoplásica puede cubrirse de plaquetas para formar microtrombos en la microcirculación, evadiendo respuesta inmune hasta llegar a colonizar o morir; d) Extravasación; e) Alojamiento de estas células en diferentes órganos del huésped; f) manipulación del nuevo microambiente para promover la supervivencia de la célula tumoral, la angiogénesis y el crecimiento de las nuevas clonas metastásicas. Cuatro funciones son importantes: la proliferación, movilidad, acción lítica y diferenciación. Una célula se disemina más fácilmente en áreas que ofrezcan menos resistencia; por ello la célula neoplásica requiere romper barreras naturales tales como membrana basal y matriz extracelular, por acción lítica de sus enzimas. Estudios clínicos han sugerido que los tumores malignos menos diferenciados son más invasivos y que generalmente están asociados a mal pronóstico (5,6).

La capacidad de metastatizar es la propiedad que caracteriza a la neoplasia y que la hace clínicamente peligrosa y muchas veces intratable. En 1979 Nicolson fue uno de los primeros en demostrar que las células tumorales pueden metastatizar selectivamente a un órgano particular; en su trayecto pueden adherirse a otros órganos, pero se desprenden y siguen circulando hasta encontrar un órgano y microambiente apropiados (7).

Contrario a lo que se piensa el proceso de metástasis es altamente ineficaz ya que de todas las células neoplásicas que circulan alrededor del 0.01-0.1% de ellas, llega a metastatizar en modelos experimentales; en el hombre la eficiencia es menor de 10^{-7} (1). A pesar de esta ineficiencia del proceso, el número de células que pasa al torrente sanguíneo es importante y basta con que una célula adquiera ventaja selectiva y evada todas las barreras que el organismo presente para que pueda metastatizar y llevar a la muerte al paciente.

ANTECEDENTES

a LAS PROTEASAS Y LA MATRIZ EXTRACELULAR. RECEPTORES.

La matriz extracelular (MEC) comprende el estroma intersticial (constituído principalmente por colágenas tipo I y III) y la membrana basal (principalmente por colágena tipo IV). Incluye proteínas fibrosas (colágenas), glucoproteínas (laminina, fibronectina, elastina y nidogen) y proteoglicanos (sulfato de heparán, sulfato de condroitín, sulfato de dermatán, sulfato de keratán y ácido hialurónico). Además de ser una barrera física y sostén de las células también participa en la adhesión celular, en la traducción de señales, en diferenciación, proliferación y apoptosis. Es producida principalmente por células epiteliales, endoteliales y fibroblastos. Varía en sus constituyentes moleculares y en la concentración de los mismos, dependiendo del tejido en cuestión; dichos componentes interactúan con los diversos receptores presentes en la superficie celular. Por ello se explica que en el caso de células tumorales algunas pueden penetrar ciertas membranas basales pero otras no, y metastatizar un órgano de manera selectiva.

Los receptores de adhesión en la superficie de la célula se han agrupado en cuatro familias que son: 1) integrinas, 2) cadherinas, 3) miembros de la superfamilia de Ig y 4) selectinas.

INTEGRINAS: Son heterodímeros $\alpha\beta$ asociados no

covalentemente; median la adhesión leucocito-leucocito, leucocito-célula endotelial e interacciones celulares con componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina (mediante el reconocimiento del tripéptido RGD), laminina, colágena y fibrinógeno.

CADHERINAS: Median adhesión celular vía interacción homofílica (Ej: caderina E con caderina E de otra célula adyacente), aunque también se han reportado uniones heterofílicas (Ej: caderina E con caderina N de otra célula adyacente), estas últimas son menos afines. Son dependientes de calcio; el dominio intracelular de cadherinas se une a una molécula intracelular cateninas que posiblemente medie la interacción entre éstas y los microfilamentos del citoesqueleto. Esta interacción es primordial para promover la adhesión celular (8).

MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DE Ig: Participan en una variedad de interacciones heterofílicas y homofílicas vía su dominio polipeptídico.

SELECTINAS: Son moléculas que se unen a carbohidratos de manera calcio dependientes.

Uno de los primeros eventos en la invasión y metástasis es la pérdida de contacto entre las células adyacentes en el tejido canceroso (de origen epitelial). Esta pérdida es esencial para que la célula pueda migrar e involucra cambios en la expresión y función de varios mediadores de comunicación celular (entre los mejores estudiados están caderina E y las integrinas), entre ellos están: la pérdida de asociaciones célula-célula y célula-matriz extracelular que son esenciales para el

desprendimiento de células tumorales de la masa primaria; a su vez las células tumorales aumentan su unión a células endoteliales de los microvasos y a la matriz subendotelial para poder llevar a cabo la intravasación y extravasación. Estas interacciones adhesivas no únicamente sirven a la célula para anclarse al tejido blanco, sino también para disparar o potenciar funciones celulares del hospedero como son la liberación de enzimas proteolíticas que disuelven la matriz extracelular, liberación de factores de crecimiento, etc. (8-10).

b PROTEASAS Y ANTIPROTEASAS RELACIONADAS CON INVASIVIDAD

Uno de los primeros trabajos en los cuales se demostró que en los tumores malignos se incrementa la actividad de proteinasas ácidas y las vierten al medio extracelular fue hecho por Carrel y Ebeling en 1928. Posteriormente Sylveen (1957) demostró la secreción de proteasas neutras por las células neoplásicas con métodos histoquímicos (11), y fue entonces que el mecanismo enzimático adquirió mayor relevancia.

Existen por lo menos tres grupos de proteinasas que desempeñan un papel relevante en la degradación de la matriz extracelular: las colagenasas (metaloproteiniasas), los activadores de plasminógeno (serinoproteiniasas) y la catepsina B (tiolproteiniasa). De éstas, los activadores de plasminógeno y la catepsina B son capaces de activar a las procolagenasas que, aún sin existir a veces en la célula maligna, se encuentran presentes

en las células del tejido conjuntivo y pueden entonces producir colagenasa. Estas tres enzimas conducen en forma directa o indirecta a la lisis específica de la colágena y después a la hidrólisis inespecífica de los fragmentos de la misma, destruyendo así las barreras que se presentan para la invasión de las células neoplásicas (12, 13).

El sistema proteolítico necesario para la invasión celular no es exclusivo de células neoplásicas, ya que existen diversos ejemplos de células normales equipadas para invadir en procesos fisiológicos normales como: fertilización, ovulación, inflamación, desarrollo, etc. Los procesos normales del organismo son controlados por un balance proteasas-antiproteasas, lo que regula el proceso en forma precisa para cada función (14). Entre los inhibidores para catepsina B están la alfa-1-antitripsina (A_1AT) y alfa-2-macroglobulina (A_2MG); para los activadores de plasminógeno existen dos nombrados como inhibidores de activadores de plasminógeno-1 y 2 ($PAI-1$ y $PAI-2$) y para las colagenasas los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas ($TIMP 1$ y 2). En el cáncer, el huésped responde a la síntesis excesiva de proteasas, incrementando la producción de sustancias antiproteolíticas como en un intento por reestablecer el balance proteasa-antiproteasa; pero a pesar de que estos mecanismos existen son inadecuados o insuficientes (15).

Teóricamente con fines terapéuticos los inhibidores de proteasas podrían bloquear la progresión del tumor; se han sintetizado inhibidores de bajo peso molecular con resultados favorables en modelos animales y algunos en neoplasias humanas.

Estudios epidemiológicos sugieren un efecto protector de ciertas semillas como son la soya, el maíz, trigo y frijol, de las cuales se ha aislado un inhibidor de proteasas (16).

CATEPSINA B:

El gen humano de catepsina B se encuentra en el cromosoma 8p22 (17), consta aproximadamente de 28000 bp, organizado en 12 exones y 11 intrones (18). Este gen codifica una enzima (tiolproteínasa) de tipo endopeptidasa. Es sintetizada como una preprocatepsina B constituida por una sola cadena polipeptídica de 30 kDa. Para pasar a su forma activa sufre una proteólisis adquiriendo la conformación de una doble cadena unida por un puente disulfuro (19). Está ampliamente distribuida entre las especies: *Entamoeba histolytica*, rata, conejo, ovinos, bovinos, pollo, aves y tejidos humanos (14, 20). Generalmente es abundante en hígado y bazo. En el humano se ha localizado además en leucocitos y varios cartílagos (14).

Existen evidencias de que catepsina B juega un papel importante en el catabolismo general de las proteínas en el sistema lisosomal (14, 19). Los osteoclastos secretan catepsina B dentro de un compartimento ácido, sellado y externo para lisar material extracelular durante la reorganización del hueso (19, 21); también tiene una importante participación en el procesamiento de antígenos (22) y acelerando el recambio de proteínas en varias condiciones patológicas (19).

Un estudio importante de catepsina B en cáncer, fue el de Poole quien observó que esta enzima es secretada preferente y

activamente por células tumorales malignas y que existe biosíntesis activa, por lo que no se libera simplemente por necrosis tisular (23). Trabajos posteriores apoyan que su presencia revela viabilidad y capacidad invasora en células malignas, tanto de cánceres sólidos como de líneas celulares (24) y no que proviene de células inflamatorias del hospedero (25). En varias neoplasias se han reportado diferentes formas moleculares o isoenzimas de catepsina B comparadas con tejidos normales y se sabe que la isoenzima tumoral es mucho más estable que la catepsina de hígado humano. Esta variedad molecular es catalíticamente similar, pero con diferentes propiedades físicas: no se inactiva a pH arriba de 7 y tiene mayor peso molecular. La localización celular en células neoplásicas no es lisosómica exclusivamente como en tejido normal. Con microscopía de luz confocal en cultivos de cáncer de pulmón se observa que primero aparece la actividad en citoplasma como granos finos, incrementando posteriormente sobre todo en el espacio perinuclear, más tarde aparece en la membrana nuclear y plasmática, en esta última principalmente en el polo basal de la célula adyacente al estroma, lo que explica cómo este mecanismo facilita el desprendimiento y diseminación a otros sitios (26).

Es posible que las distintas localizaciones de esta enzima sean debidas a la formación de isoformas glicosiladas diferencialmente, se desconoce cual es la señal para que se sinteticen las diferentes formas de catepsina B (27). Por otro lado varios autores sugieren que catepsina B en condiciones

fisiológicas es excitada con su péptido señal y posteriormente es endocitada como consecuencia de la interacción de receptores de superficie membranales; en consecuencia la pérdida o modificación de marcadores de reconocimiento originan la acumulación de dichas enzimas en el medio extracelular (12).

Quiming, Gong y cols. proponen que en algunos tumores humanos parte de esta diversidad de formas y localización pueden ser debidas a un splicing alternativo del pre-mRNA de catepsina B (18). Sloane sugiere que las alteraciones en el tráfico de catepsina B ocurre en el punto de transición entre células preneoplásicas y estado neoplásico (28). La estabilidad de la tior proteinasa tumoral favorece su acumulación en sitios extracelulares y aunado con su aumento en producción, la hace compatible con la invasividad (29, 30). Pietras, Szego y Benítez en sueros de pacientes con cáncer cérvico uterino encuentran una elevación importante de la actividad de catepsina B desde la etapa de carcinoma *in situ* y la magnitud del incremento de la actividad proteolítica está en relación directa al grado de invasividad de la neoplasia y a la etapa clínica (13, 29, 31-34). Benítez y cols. describen en suero agregabilidad plaquetaria inducida por catepsina B y una sobreproducción de antiproteasas entre ellas alfa-1-antitripsina y alfa-2-macroglobulina (34, 35). Estos autores reportaron que en cáncer cérvico uterino existe una elevación significativa de alfa-1-antitripsina en el suero, desde la etapa de carcinoma *in situ* y se eleva progresivamente conforme se avanza en la etapa clínica. Sin embargo en el líquido

vaginal observaron elevación de alfa-1-antitripsina hasta las etapas francamente invasoras, como consecuencia de la invasión extensa y del amplio contacto con la circulación. Los mismos autores no encontraron alteración significativa de la alfa-2-macroglobulina en el huésped; probablemente la falta de un incremento compensador de esta globulina sea lo que deje sin acción antagónica al incremento de catepsina B, ya que se sabe que la antiproteasa que modula la acción de la catepsina B es precisamente la alfa-2-macroglobulina (13, 34).

En pacientes con adenocarcinomas de células claras se observan niveles muy altos de catepsina B, que caen a niveles normales después de la extirpación quirúrgica o de la quimioterapia de la neoplasia, volviendo a elevarse hasta tres meses antes de las primeras evidencias clínicas de recurrencia (32, 33). Se ha reportado una variedad de neoplasias en las cuales la actividad y/o la proteína de catepsina B se encuentran elevadas ya sea en citosol, suero o cortes histológicos. Entre ellas están: el cáncer cérvico-uterino (33, 34, 36, 37) cáncer gástrico (38, 39), mama (24, 40-42), pulmón (43), colon (44), vejiga, próstata, glioma (45), tiroides (46), etc.

La cualidad de la catepsina B para degradar sustancias de la matriz extracelular tales como colágena y laminina puede indicar que juega un papel directo en la invasión y uno indirecto en la activación de otras enzimas proteolíticas en la cascada metastásica.

ACTIVADORES DE PLASMINOGENO:

Se han reportado dos formas de activadores de plasminógeno: la tisular (tPA), enzima clave para activar fibrinolisis y la urocinasa (uPA) involucrada en la degradación tisular. Ambas son sintetizadas como propéptidos de cadena única, los cuales deben ser escindidos para formar una proteasa de menor peso molecular y de cadena doble unida por un puente disulfuro, esta es la forma activa de la enzima. El tPA y uPA son proteínas de pesos moleculares de 70 y 53 kDa respectivamente. Son productos de diferentes genes: tPA se localiza en el cromosoma 8, consta de 36,594 bp, 14 exones y 15 intrones (47); en cambio uPA se localiza en el cromosoma 10 con 6.4 Kb organizado en 11 exones (48).

El sustrato natural para los activadores de plasminógeno (PA) es el plasminógeno, dando como producto la plasmina que es la responsable principal de degradar fibrina, pero también puede degradar componentes de la membrana basal como son glicoproteínas y proteoglicanos. Se encuentran ubicuamente distribuidos en tejidos y fluidos corporales, aunque en concentraciones muy bajas, ya que se requiere una cantidad catalítica para generar plasmina (49).

También se han identificado los receptores de superficie celular para ambas formas (uPAR, tPAR) además de sus inhibidores (PAI-1 y PAI-2). El uPAR conduce a un enriquecimiento local de la proteasa, y como consecuencia se ha propuesto como un mecanismo para desviar la acción de inhibidores, aunque hay excepciones. En cambio la unión receptor-tPA es inhibido

lentamente por su inhibidor específico. Los inhibidores forman parte de moléculas como fibronectina y prolactina; estas moléculas por sí solas no actúan como inhibidores, esta asociación con la matriz extracelular ha sido considerada una vía para proteger a la misma contra la degradación proteolítica; por otro lado la matriz extracelular puede servir como un reservorio de inhibidores de activadores de plasminógeno (50, 51).

Los descubrimientos de Ossowski, Reich y cols., demuestran que los activadores de plasminógeno se encuentran en concentraciones muy elevadas en la mayoría de las células tumorales en relación con sus contrapartes normales y la actividad de esta serinoproteasa aumenta en la transformación de fibroplastos por virus oncogénicos o por sustancias químicas promotoras de cáncer, lo que hizo pensar que esta proteinasa participa en la cascada proteolítica en la célula neoplásica (52).

En la actualidad existen un gran número de trabajos tanto *in vivo* como *in vitro* en los que es evidente su relación con la capacidad de invadir; entre las neoplasias están mama (53), carcinoma de colon (54, 55), cáncer de endometrio (56), líneas celulares de cáncer de pulmón (57), cáncer de ovario (58), cáncer de cérvix (59, 60), etc. Sin embargo la producción de activadores de plasminógeno no siempre correlaciona con transformación o potencial metastásico (24, 61, 62).

COLAGENASA:

La membrana basal y el estroma intersticial son ricas en colágenas. Sus formas nativas son únicamente degradadas por

sus colagenasas específicas. Las colagenasas junto con las estromelisininas constituyen el grupo de metaloproteinasas de matriz (MMP). Todas ellas son endopeptidasas dependientes de zinc y calcio con un amplio espectro de actividad proteolítica contra componentes de matriz extracelular. Esta familia incluye: colagenasa intersticial (colagenasa tipo 1 ó MMP-1), colagenasa de neutrófilos (MMP-8), Colagenasa tipo IV de 72 kDA (gelatinasa A ó MMP-2), colagenasa tipo IV de 92 kDA (gelatinasa B ó MMP-9), estromelisinina 1 (MMP-3, transina ó proteoglicanasa), estromelisinina 2 (MMP-10 ó transina 2), estromelisinina 3 (MMP-11), matrilisinina (PUMP-1 ó MMP-7), metaloelastasa del macrófago (HME ó MMP-12), metaloproteinasa de matriz tipo membrana (MT-MMPm ó MMP-14) y colagenasa 3 (MMP-13). Todas ellas comparten un péptido señal, un propéptido que es hidrolizado cuando se activa la proenzima, un dominio de unión al zinc y un dominio parecido a la hemopexina, se piensa que este último dominio es responsable de la unión a la matriz y de la especificidad del sustrato. Se cree que su activación es mediada por otras enzimas y autoproteólisis.

Al igual que las enzimas anteriormente citadas las metaloproteinasas y sus inhibidores participan en procesos normales del organismo como embarazo, parto, dilatación cervical, reabsorción ósea, implantación del blastocisto, desarrollo e involución de la glándula mamaria, etc. Su función es degradar matriz extracelular y son regulados por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Las metaloproteinasas participan en procesos patológicos como son: inflamación,

osteoartritis, cicatrización de heridas e invasión y metástasis, entre otros. Un desequilibrio puede conducir a un proceso fibrótico (inhibidor > enzima) ó a una destrucción excesiva del tejido o invasión (enzima > inhibidor) (63). Está ampliamente documentado la participación de enzimas colagenolíticas en la invasión y metástasis en modelos animales, líneas celulares y cultivos de tejidos neoplásico, ya sea midiendo degradación de fibras de colágena radioactiva (64), con anticuerpos monoclonales, a nivel de RNAm (65) ó con sustratos específicos (66). Algunos estudios en neoplasias humanas son: mama (41, 67), colon (68), melanoma humano (69), pulmón (70), cáncer gástrico (71), etc, en los cuales este control parece estar ausente. Entre los estudios en los cuales no se ha encontrado alguna relación de colagenasa e invasión está un trabajo de Recklies en cultivos celulares de mama (24).

Como ya se comentó el principal constituyente de la matriz extracelular es la colágena tipo IV y en varios estudios destacándose los de Liotta y col. se ha encontrado una relación del potencial metastásico, degradación de colágena tipo IV y secreción de colagenasa tipo IV (6, 64, 72). En el proceso de invasión y metátasis las dos colagenasas tipo IV (72 y 92 kDa) tienen importancia relevante; el gen de ambas colagenasas se encuentran en el cromosoma 16. La colagenasa tipo IV de 72 kDa consta de 32 Kb organizadas en 13 exones; en cambio la de 92 kDa está constituida por 26 Kb también organizada en 13 exones (73). Para la colagenasa IV de 72kDa ó MMP-2 el mejor sustrato es la colágena tipo IV aunque también puede degradar las colágenas tipos V, VII, X, las gelatinas, elastinas y fibronectinas. Hay

controversias en la posibilidad de que MMP-2 degrade la colágena tipo IV nativa (74, 75). Se detecta en células normales como fibroblastos; el aumento en la producción enzimática se ha observado en fibroblastos transformados con el virus SV40, en células epiteliales de los bronquios transformadas por el oncogén H-ras (75) y en varios tipos de células tumorales (64, 65, 76) . La colagenasa tipo IV de 92 kDa ó MMP-9, es similar a MMP-2 en especificidad por el sustrato, pero su estructura posee un segmento adicional y su regulación es diferente. Se expresa en macrófagos, keratinocitos de la epidermis, leucocitos polimorfonucleares, fibroblastos de pulmón transformados con el virus SV40, y también varios tipos celulares neoplásicos (8, 50).

La producción de MMP por las células cancerosas es determinada por la suma de varios factores tales como mecanismos autocrinos y paracrinos, factores de crecimiento y citocinas secretados por las mismas células cancerosas y estromales, mecanismos de activación de proenzimas a través de otras proteasas e inactivación por TIMPs.

CATEPSINA D Y OTRAS HIDROLASAS.

Catepsina D es la proteinasa más abundante del lisosoma. La proteína madura es de 34kDa; aunque es estable a pH neutro, únicamente es activa a pH bajo. Tandon y col. (77) mostraron que niveles altos de esta enzima es un buen marcador de recurrencia temprana y muerte para cáncer de mama con ganglios linfáticos negativos, también compararon su actividad con otros marcadores de pronóstico establecidos, encontrándolo

como uno de los mejores e independiente. Contrariamente a esto existen otros trabajos en los que no se encuentra tal relación (78).

Resultados similares a los encontrados con catepsina B se han reportado para la catepsina L, que es secretada en forma activa y madura en grandes cantidades en líneas celulares de cáncer de colon y en fibroblastos transformados, entre otros (79).

Otro grupo de hidrolasas relacionadas con malignidad son las glicosidasas en condiciones normales son sintetizadas por varios tipos de células como fibroblastos, plaquetas y macrófagos, sin embargo, se han reportado algunas de ellas alteradas como son la β -N-acetilglucosaminidasa y endo- β -D-glucuronidasa o heparanasa; la primera se ha descrito con actividad elevada en líneas celulares de carcinoma de ovario humano y la segunda se expresa en niveles altos por células altamente invasivas como son las células de melanoma B16F1 comparados con variantes menos invasoras o células normales (50).

También existen reportes de otras clases de metaloproteinasas involucradas con el fenotipo invasor de la célula neoplásica, tal es el caso de las estromelisininas (en carcinoma de piel en ratón, carcinoma de pulmón, etc) (80) y colagenasa tipo I (en carcinoma mamario y fibrosarcoma de ratón) (8).

c GENETICA DE LA INVASIVIDAD Y METASTASIS.

El proceso metastásico es controlado en parte genéticamente. La transfección de oncogenes únicos ha permitido

inducir tumores y fenotipos metastásicos en las células recipientes, ejemplos de ellos son: ras, mos, fes, fms, src, myc, fos y neu. Sin embargo los resultados varían dependiendo del tipo celular y con esto una vez más se comprueba la complejidad del fenómeno. Se ha encontrado que el oncogén c-myc está alterado en cáncer mamario y en el carcinoma cérvico-uterino (80-82). En general, la función de los productos proteicos de estos oncogenes se conocen parcialmente, pero se sabe que algunos actúan como enzimas (fosfo-protein-cinasas), otros como factores hormonales (estimulantes del crecimiento), factores de transcripción y otros involucrados en señales de transducción. Se ha sugerido la posibilidad de que algunos genes sean los responsables de conferir a las células su fenotipo proteolítico y que el cambio de célula transformada a célula neoplásica invasora se deba precisamente a la alteración de estos genes, como ocurre con algunas leucemias (83).

GEN ras

En los últimos años se ha estudiado a la familia de genes ras: H-ras, K-ras y N-ras, los cuales se localizan en diferentes cromosomas, tienen una estructura semejante, con un exón 5' no codificante y cuatro exones codificantes. Los intrones de los tres genes varían ampliamente en tamaño y secuencia. Los tamaños de los genes son muy diferentes (K-ras posee más de 35 kb, N-ras aprox. 7kb y H-ras 3kb). Los genes ras codifican para las proteínas p21Ras, las cuales son homólogas en sus primeros 164 aminoácidos, los siguientes 25 residuos son diferentes a

excepción de la cisteína 186; este segmento de 165-185 residuos es conocido como región heterogénea, y al parecer la región carboxilo terminal media la localización subcelular apropiada. Esta proteína es sintetizada como pro-p21 y tiene una vida media de 24 horas aprox., sufre una serie de modificaciones postraduccionales incrementando su hidrofobicidad y como consecuencia su localización en la cara interna de la membrana celular (84). Las proteínas Ras (proteínas G) unen GTP. En forma general la proteína está constituida por: 1) un dominio catalítico (a.a. del 1-164); 2) el sitio de unión al GTP (a.a. del 12-18, 57-63, 116-119 y 144-147); 3) dos regiones switch (Asp 30-Asp 38 y Gly 60-Glu 76); estas dos regiones presentan diferente conformación dependiendo de si están unidas a GDP ó GTP y 4) el sitio efector (Tyr32-Tyr40), responsable en parte de las interacciones con la proteína activante GTPasa (GAP) y con los efectores negativos de Ras como es Raf que compite con GAP. En muchos tipos celulares, la activación de Ras induce proliferación y sus formas mutadas (oncogénicas) confieren inmortalidad y como consecuencia un fenotipo maligno. La proteína Ras mutada altera la estructura normal prolongando el tiempo de vida de la forma activa (mutaciones en los aminoácidos 12, 13, 59, 61 ó 63). Esta mutación se encuentra asociada a muchos cánceres humanos. Ras también es responsable de transmitir la señal proliferativa generada por otros oncogenes como son: src, fms y fes. Ras es activado en respuesta a señales extra ó intracelulares que generan la forma activa (unida a GTP). Generalmente los niveles de Ras-GTP permanecen elevados por lo menos 30 minutos después de que

el ligando específico activa al receptor de superficie celular tirosina cinasa (85). La hidrólisis de GTP por una actividad GTPasa intrínseca de Ras relaja la conformación y termina la señal. En la traducción de señales intervienen varios grupos de proteínas entre las cuales están: proteínas GAPs (entre ellas están p120Ras^{GAP}, neurofibromina, etc) que aumentan la actividad de GTPasa; proteínas GEFs (proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina), las cuales catalizan la liberación de GDP del complejo p21-GDP (ejemplos de ellas son: SOS1 y 2, CDC25,etc); y proteínas adaptadoras, entre ellas están Src, p85, PLC δ , GRB2, SHC, GAP, etc., con sitios de unión SH2. Algunas de estas proteínas que contienen grupos SH2 son enzimas (SHP-2, Src, y otras), mientras que otras son únicamente adaptadoras (GRB2, SHC y NCK) (85).

El mecanismo de traducción de señales de manera general es como sigue: el ligando se une al receptor tirosina cinasa, generalmente se forma una homo ó heterodimerización y /o un cambio conformacional y como resultado hay una autofosforilación de múltiples residuos de tirosina en la porción citoplásmica del receptor. Los ligandos pueden ser: el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la insulina o el factor de crecimiento neuronal (NGF), etc.; cada uno interactúa según sus características propias y como consecuencia transmiten una señal única. La fosforilación de las tirosinas producen un sitio de acoplamiento para GRB2 (u otra proteína adaptadora), facilitando la activación de SOS (proteína que intercambia nucleótidos de guanina); de esta forma

SOS puede activar a Ras. La región efectora de ras-GTP interactúa con el dominio regulador amino terminal de c-raf que es una MAPKK (MAP kinase kinase) y esta última proteína a la cascada de serina-treonina cinasas, llegando finalmente la señal al núcleo (85). Estos mecanismos definen una vía por la cual actúan tirosina cinasas a través de Ras para controlar el crecimiento y diferenciación celular.

Algunos autores proponen, que las diferentes mutaciones en ras pueden activar diferentes caminos bioquímicos y que el fenotipo del estado maligno final depende de la naturaleza de esa mutación. En varios experimentos se ha demostrado que el grado de expresión del oncogén ras correlaciona con la capacidad de la célula de invadir y causar metástasis (86-88). Para algunos autores es en metástasis porque al inocular ratones Nu/Nu con diferentes líneas celulares (que poseían ciertas alteraciones como aneuploidia e inmortalidad) con v-H-ras, oncogén c-H-ras o altos niveles del protooncogén c-H-ras presentaron tumores; v-H-ras y oncogén c-H-ras conducen a metástasis en número variable, pero el proto-oncogén c-H-ras a pesar de producir un número semejante de tumores al oncogén c-H-ras produce muy pocas metástasis (8% aprox.). En su modelo el fenotipo metastásico parece requerir de formas oncogénicas activadas (89). Otros autores describen al oncogén c-H-ras activado de las metástasis y no del tumor primario (90). En otros reportes encuentran mayor concentración en las zonas de invasión. Lo que está ya fundamentado es que el oncogén de una manera aditiva confiere crecimiento potencial sobre las células las cuales ya expresan todos los productos

génicos necesarios para la metástasis. Otra hipótesis es que la proteína p21 mutada induce inestabilidad genética. Esta inestabilidad resulta en la producción de variantes metastásicas las cuales son seleccionadas *in vivo*. Una tercera hipótesis es que la transformación del gen ras induce la expresión, en cascada de diversos productos génicos celulares, que normalmente se expresan en la migración de las células en la embriogénesis o remodelación tisular.

En estudios sobre cáncer cérvico uterino se ha observado que la activación de cualquier miembro de la familia ras es poco común en etapas tempranas I y II (91-93). En cambio en las etapas III y IV, su proteína se encuentra incrementada, así como el gen amplificado (91-94); en este último punto existe controversia (95, 96). Estudios inmunohistoquímicos revelan que la concentración de p21Ras incrementa en forma paralela con la evolución de la displasia hasta carcinoma microinvasor y en cáncer de cérvix su expresión depende del tipo histológico (93, 97). Otros trabajos relacionan su expresión con metástasis a ganglios linfáticos (98), y algunos son controversiales (99).

En carcinomas de cérvix de células escamosas es más frecuente encontrar mutaciones de c-H-ras, en comparación a adenocarcinomas en los cuales se detectan en mayor proporción las mutaciones de c-K-ras, que también participa en la carcinogénesis de varias neoplasias como son colon, páncreas, pulmón, cánceres ginecológicos, etc. (100-102). Por esta razón, dado que en nuestro estudio todos los casos son del tipo histológico epidermoide decidimos estudiar a c-H-ras.

GEN nm23

Debido a que muchos de los procesos celulares involucrados en la metástasis no están esclarecidos a nivel bioquímico, la identificación de genes relacionados a éste son necesarios permitiendo con ello nuevas estrategias para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

Recientemente se han identificado algunos marcadores de metástasis entre ellos están nm23 (103), nma (104), nmb (105), kal 1 (106), etc. De todos ellos el que ha aportado datos más convincentes y a la vez controversiales es el nm23. Este gen fue descrito por P. Steeg en 1988 basados en la inhibición diferencial con sondas mRNA de líneas celulares de melanoma K-1735 de bajo y alto potencial metastásico, la proteína codificada por el gen estuvo ausente o deficiente en líneas celulares altamente metastásicas y presente en células no metastásicas (103). Actualmente se conocen cinco isoformas: nm23-H1 (103), nm23-H2 (con una homología con respecto a H1 de 88%)(107) y los menos conocidos DR-nm23 (con una homología de 67% y 65% con respecto a H-1 y H-2 respectivamente)(108), nm23-H3b (109) y nm23-H4 (con un 56, 55, y 60% de homología con H1, H2 y DR-NM23, respectivamente) (110) .

nm23H-1 y nm23H-2 se localizan en el cromosoma 17q22 (111), su transcrito es de 0.8-1.0 Kb; y su proteína tiene un peso molecular de 17 Kd (112). El primer estudio realizado en humanos fue en cáncer de mama y causó un gran impacto porque se observó que a los 10 años después de tratamiento el 65% de las

pacientes que tenían altos niveles de proteína nm23 vivían, en cambio en el mismo lapso todos los pacientes con niveles bajos de nm23 murieron (6).

Se han descrito varias funciones asociadas a nm23 como son :

1) NUCLEOSIDO DIFOSFATO CINASA (NDPK); por su alta homología con los genes *awd* de *D. melanogaster* (113) , *Gip17* de *D. discoideum* (114), etc, se propuso que tuviera esta función y que su expresión reducida causaría defectos en la traducción de señales mediada por proteínas G, y en todas las funciones biológicas en las cuales se requieren nucleósidos trifosfatos como son síntesis de ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos, elongación de proteínas, etc (113-116). Al estudiar las NDPK de eritrocitos humanos se confirmó que la secuencia de cadena polipeptídica A de esta enzima es idéntica a la proteína NM23-H1 y la cadena B a la proteína NM23-H2 (117). Estudios posteriores demuestran que en la His 118 se forma el intermediario fosforilado posiblemente responsable de esta actividad, pero no tiene alguna relación con su probable función antimetastásica (118).

2) FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN. Postel demostró que la proteína Puf (99% homóloga a NM23-H2) se une al DNA, participando directamente en la activación transcripcional del gen *c-myc* (119-121). Otros hallazgos que apoyan esta función son: su localización nuclear y la presencia de un zipper de leucinas (122).

3) INVOLUCRADA EN DIFERENCIACION. Yamashiro y col. observaron que nm23 regula negativamente la diferenciación de monocito a macrófago; además reportan que en eritroleucemia después de la adición de hemina, transitoriamente se elevaron los niveles de mRNA y proteína, reduciéndose posteriormente; por lo que propusieron que nm23 mantiene a las células en un estado indiferenciado, siendo su reducción un evento temprano e indispensable para que la célula entre a diferenciación (123). Por el contrario otros encontraron en el ratón que al iniciarse la organogénesis del sistema nervioso y el corazón, los cuales son los primeros tejidos en diferenciarse, aumentaron los niveles de NM23 y posteriormente en hígado, riñón, intestino y piel ocurrió lo mismo. El pulmón, uno de los órganos tardíos en diferenciarse permaneció inmunonegativo a NM23; y finalmente la glándula mamaria, mostró bajos niveles, incrementándose en la rata embarazada y durante la lactancia (124). Es claro que no existe acuerdo unánime del papel que desempeña esta proteína en la diferenciación.

4) PROLIFERACION. Hailat y col. observaron que p19/nm23 se eleva cuando la célula entra a la fase S. Parece ser que la expresión de nm23 es importante para la progresión del ciclo celular y su reducción para que las células entren a diferenciación (125).

5) TRADUCCION DE SEÑALES. En experimentos de migración de líneas celulares de melanoma transfectadas con nm23 en presencia de quimioattractantes que actúan a través de diferentes receptores (PDGF e IGF-1), ven inhibida la movilidad con respecto a sus controles, presentándose un bloqueo a nivel de traducción de

señales, no sobre la movilidad en sí (126). En algunas líneas celulares hematopoyéticas, en líneas celulares de cáncer de estómago, páncreas, neuroblastoma y melanoma localizaron a nm23 en la superficie y sugieren que nm23 tenga un papel en la comunicación intracelular (127).

6) SUPRESION DE MOVILIDAD. Steeg y colaboradores observaron al transfectar líneas celulares de cáncer de mama con nm23-H1 silvestre que existe una inhibición de movilidad y no así al ser transfectadas por mutantes. Demuestran su función de fosfotransferasa (128).

Las neoplasias humanas en donde se ha encontrado que la expresión de nm23 es un factor pronóstico favorable son las siguientes: mama (129-133), Ca gástrico (134, 135), Ca hepatocelular (136), en Ca de laringe (137), Cáncer de pulmón (138), etc. En líneas celulares: melanoma (103, 139, 140); fibroblastos de embrión de rata (141). En cambio en neuroblastoma (125, 142), sarcoma de Ewing (143), Ca de vejiga (144), leucemia monocítica aguda (145, 146), linfomas humanos (147), etc, no hay correlación con el fenotipo metastásico. Existen otras neoplasias con resultados controversiales como son Ca de colon (140, 148-152), CaCu (148, 153-155), Ca de ovario (156-158), melanoma humano (159-162), próstata (163, 164), etc

En otros estudios sobre nm23 destacan diversas alteraciones:

1) Se han reportado deleciones alélicas en las siguientes neoplasias: mama, pulmón, cáncer renal (165), en ca de colon (149,

165, 166) y melanomas (139, 140), demostrando que este gen posee uno de los mecanismos de regulación alterado, frecuentemente reportado en los genes supresores involucrados en la carcinogénesis.

2) Existen varios sitios de fosforilación para nm23 : a) serina 44, esta fosforilación es inhibida por cAMP in vitro y forskolín in vivo, lo que sugiere que esta vía de fosforilación es regulada por señales de traducción; b) prolina 96; c) serina 120, es la serina más conservada, es ácido estable y se encuentra mutada en neuroblastomas de alto grado; d) histidina 118, en este sitio se forma un intermediario fosforilado posiblemente el responsable de su actividad proteína cinasa (167).

3) Se caracterizó parcialmente su promotor. No tiene caja TATA y posee secuencias para factores de transcripción como son AP-1, CTF/NF1, ACAAAG y Ets. Por medio de geles de retardamiento, se observó que CTF/NF1 puede tener un papel en la regulación de su expresión (168).

CD44:

CD44 es una molécula de adhesión que se expresa en la superficie de una variedad de tipos celulares como son células endoteliales, fibroblastos, linajes hematopoyéticos, etc., su ligando reconocido más ampliamente es el ácido hialurónico, pero también se une a fibronectina, colágena, citocinas Eta-1 (osteoponina), etc. Es codificada en el cromosoma 11. Interviene en diversos procesos dependientes de adhesión, por ejemplo

cuando se une al ácido hialurónico induce agregación celular, en cambio cuando su ligando es Eta-1 induce quimiotaxis (169), el más conocido es que actúa como receptor (“homing”) de los linfocitos; bajo condiciones especiales, ciertos tipos de células producen isoformas de peso molecular alto; se han reportado al menos 12 variantes como resultado de un “splicing” alternativo, de por lo menos 10 exones contiguos dentro del mismo gen; se sugiere que la célula neoplásica utiliza una o algunas de estas isoformas en la transformación maligna como son carcinomas de: mama, colon, gástrico, ovario, cérvix, etc. (160); también existen trabajos que indican que cambios en la expresión de isoformas no se asocian únicamente con transformación maligna, sino también pueden estar relacionados con cambios en las propiedades que ocurren en el desarrollo o activación funcional de células normales, tal es el caso de la hematopoyesis normal (170).

En CaCu se han reportado la presencia de las isoformas v5, v6, v7-8, en un alto porcentaje, pero pacientes que expresan la isoforma v6 tienen menor supervivencia; los estudios incluyen etapas I, II y III (171, 172).

d CANCER CERVICO-UTERINO COMO MODELO DE INVASIVIDAD Y METASTASIS.

En México el cáncer cérvico-uterino ocupa el primer lugar como causa de muerte entre las neoplasias ginecológicas (aproximadamente el 30%) (173). Entre los datos epidemiológicos involucrados en su patogénesis se encuentran: inicio de vida

sexual activa a temprana edad, múltiples parejas sexuales, pareja no circuncidada, multiparidad, enfermedades sexuales transmisibles, presencia de HPV de alto riesgo, estado inmune del hospedero, uso de anticonceptivos orales, consumo de cigarro, etc. (174) El cáncer cérvico uterino es precedido probablemente por una lesión precancerosa en la cual existen cambios morfológicos continuos que pueden progresar a cáncer o sufrir regresión, estas lesiones precancerosas se han denominado displasias moderada, media o severa (sistema antiguo); otra clasificación es NIC (neoplasia intracervical) grados I, II y III y una tercera clasificación las denomina como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y de alto grado (HSIL). La progresión a carcinoma invasor (etapas clínicas I, II, III y IV) puede desarrollarse desde pocos meses hasta 20 años (175, 176).

En 1976, H. zur Hausen propuso que ciertos tipos de papilomavirus humanos (HPV: human papillomavirus) que infectan el tracto genital y se transmiten sexualmente, podrían tener una participación importante en los procesos de carcinogénesis del cérvix (177), desde entonces se han acumulado evidencias de la participación de este virus en esta neoplasia. Actualmente se considera un factor importante en la oncogénesis cervical, aunque existe un porcentaje alto de mujeres infectadas por HPV durante su etapa reproductiva y no desarrollan cáncer. Se han descrito más de 70 tipos diferentes de HPV, los cuales se han clasificado como de bajo (tipos 6 y 11), intermedio (31,33 y 35) y alto riesgo (tipos 16 y 18). El genoma de los diferentes tipos de HPV están organizados de manera similar: una región control (LCR), la cual se

encarga de regularlos procesos de replicación y transcripción virales; la región temprana que contiene a los genes E1-E7, los cuales codifican para las proteínas que regulan replicación (E1), transcripción (E2) y las oncoproteínas que participan en la transformación celular (E6, E7 y posiblemente E5); y una región tardía (L1 y L2) que codifica para las proteína de cápside (178). Existe una asociación entre ciertos tipos de HPV y el cáncer cervical en particular los tipos 16 y 18. En las displasias los genomas de estos HPVs se encuentran en forma libre, en cambio se ha propuesto la integración de los mismos como un mecanismo de activación para la progresión de lesiones avanzadas preinvasoras a cáncer cervical. El comportamiento biológico es diferente para ambos tipos de HPV. Se ha sugerido que los tumores malignos HPV 18 positivos generalmente se integran al genoma celular entre los genes E1/E2, en cambio los HPV 16 positivos se integran de un 30-70% y la ruptura entre E1/E2 es de un 36% aprox. de los casos, por lo que en este último caso la integración no es un requisito para la carcinogénesis (179-181). El virus HPV codifica para dos oncoproteínas E6 y E7, y se ha demostrado que participan en la carcinogénesis de esta neoplasia formando complejos con las proteínas celulares p53 y Rb, importantes en el control de ciclo celular. Se han hecho estudios en líneas celulares neoplásicas y tejidos con cáncer los cuales son HPV positivos y se ha observado que E7 forma un complejo con pRb induciendo su degradación vía proteasoma y E6 forma un complejo con p53, degradándola. Por lo tanto las funciones supresoras de Rb y p53 se encuentran inhibidas en esta neoplasia (182, 183).

Además de las interacciones específicas de p53 y Rb con HPV, estas proteínas también pueden estar mutadas con una vida media prolongada que origina se acumulen en el citoplasma; además p53 mutada puede formar complejos con la proteína p53 silvestre inactivándola.

La incidencia de cada tipo de HPV varía en las diferentes poblaciones. En México la prevalencia de HPV 16 por PCR es de 47.3-49.6% en cáncer invasor, en cambio la prevalencia de HPV 18 es de 11.6-12.1%. En diferentes partes del mundo se ha estudiado la prevalencia de secuencias de HPV en mujeres clínicamente normales y los resultados varían mucho. En México se reporta el 31.4% en mujeres sanas y de forma global en pacientes con cáncer de cérvix se considera la prevalencia de secuencias de HPV en un 81-85% (184). El papilomavirus es probable que manifieste sus propiedades proliferativas y oncogénicas en colaboración con oncogenes como son c-myc (amplificación y/o rearreglo, sobreexpresión) (82, 91) y H-ras (amplificación, sobreexpresión) (91, 101), ya que por sí solo en líneas celulares conduce a inmortalización, más no a transformación maligna.

Nuovo estudió la posible participación de HPV en la invasión con experimentos sobre membranas de matrigel y encontró que las oncoproteínas E6 y E7 no tienen correlación con el comportamiento invasivo de las células neoplásicas o la expresión de metaloproteinasas o sus inhibidores, esto es que aunque E6 y E7 juegan un papel muy importante en la transformación e inmortalización celular no se requiere para desarrollar el fenotipo invasivo (185).

El papel de HPV en el fenómeno de metástasis no es claro, existen varios trabajos en los cuales encuentran las secuencias oncogénicas tanto en el tumor primario como en ganglios linfáticos, pero los mismos autores se cuestionan si 1) la presencia de estas proteínas es una ventaja selectiva para conducir a metástasis, 2) el virus se integra establemente al genoma ó 3) secuencias virales libres o asociadas a células son drenadas por la linfa (186-188). Jong Sup Park encontró que los ganglios linfáticos histológicamente negativos, pero HPV 16 positivos pueden ser micrometástasis, y lo comprobó parcialmente, ya que la paciente tuvo recurrencia a corto plazo (188). Apoyando sus resultados está el trabajo de Sapy, quien detectó HPV 18 y sugiere que las pacientes en etapa clínica temprana con ganglios linfáticos histológicamente negativos y presencia de HPV de alto riesgo deben tratarse como pacientes en etapa avanzada (189). Garzetti y col. encontraron una relación significativa entre carcinomas HPV positivos y metástasis a ganglios linfáticos (190).

Las proteínas E6 y E7, actualmente se consideran como puntos clave para el desarrollo de nuevas estrategias para diagnóstico y terapéuticas. Usando una variedad de métodos para caracterizar la respuesta inmune específica para HPV, se ha demostrado que circulan en la sangre de las pacientes infectadas con HPV anticuerpos clase IgG contra E6 y E7. Fisher y col. encontraron que la positividad del anticuerpo HPV 16 correlaciona con la etapa del cáncer cervical, y que encontrando técnicas más

sensibles para su detección, en un futuro podrían utilizarse para monitorear el tratamiento de esta neoplasia (191-193).

e OTROS MECANISMOS RELACIONADOS CON INVASIVIDAD Y METASTASIS

Otros mecanismos que contribuyen a la expresión del fenotipo invasor y metastásico son alteraciones en el crecimiento, diferenciación, movilidad, en la comunicación celular, deformabilidad, adhesividad, inmunogenicidad, metabólicas, genotípicas y angiogénesis. Estas alteraciones no siempre están presentes en toda célula transformada y ninguna puede considerarse en forma aislada como marcador. Las células malignas escapan de los controles que regulan el crecimiento por lo que se hacen inmortales y como consecuencia se observan inmaduras y poco diferenciadas, fenómenos que se observan también desde el punto de vista metabólico ya que en ciertos tipos de neoplasias se sintetizan proteínas que son necesarias para el feto y el embrión como son: la alfa feto proteína, el antígeno carcinoembrionario, la fracción beta de la gonadotrofina coriónica, la beta-2-microglobulina, isoenzimas de la fosfatasa alcalina y de la deshidrogenasa láctica; entre otras proteínas están las hormonas que son características en ciertos tipos de neoplasias como son el cáncer de mama y de la próstata. Estas células en cultivo expresan otra característica importante que es la pérdida de la inhibición por contacto. El proceso adhesivo puede ser por interacciones célula-célula y célula-substrato. La

interacción célula-célula puede ser a su vez homotípica y heterotípica. La disminución de adhesividad homotípica puede promover el desprendimiento del tumor primario, mientras la disminución de adhesividad heterotípica contribuye al escape de las células neoplásicas a las células de defensa del hospedero (195). La invasión también requiere locomoción activa de las células tumorales, trabajos de Liotta y col. demuestran que las células de melanoma humano secretan “factores de movilidad autocrinos” *in vitro* y que pueden disparar la migración de células de la masa tumoral (196). Otros factores están involucrados en este proceso como son respuesta a otros factores quimiotácticos en el medio (algunos de estos materiales son productos de degradación de proteínas de matriz) y el anclaje de las células a moléculas de la matriz extracelular.

Un mecanismo utilizado por la célula neoplásica para protegerse de anticuerpos, macrófagos, células asesinas (NK), etc. es cubrirse de plaquetas por medio de la agregabilidad plaquetaria inducida por algunas enzimas proteolíticas como catepsina B, entre otras causas; además de servirle como un medio mecánico para su sobrevivencia le proporciona factores de crecimiento y con esto una ventaja selectiva para la célula neoplásica (35, 197, 198).

Para que los tumores puedan desarrollarse requieren el aporte de nutrientes, los cuales adquieren a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso denominado angiogénesis. La angiogénesis es un concepto muy antiguo y fue retomado por Folkman quien describió que un tumor no puede

crecer más allá de 2 mm de diámetro si carece de vasos sanguíneos que lo nutra (199). La inducción de este proceso es mediado por varias moléculas angiogénicas liberadas tanto por células neoplásicas como por células del hospedero. Los conocimientos sobre la angiogénesis se están aplicando para inhibirla, siendo una de las terapias actuales más llamativas contra el cáncer (200). En el cérvix, la angiogénesis alterada es ya aparente en la displasia moderada, sugiriendo ser un evento muy temprano de la carcinogénesis (201).

f) PRUEBAS PARA MEDIR LA CAPACIDAD INVASIVA Y METASTASICA.

Debido a que el fenómeno de invasión y metástasis es sumamente complejo, se han ideado varias pruebas que, si bien se desarrollan bajo condiciones lo más cercanas a la realidad, finalmente sólo se aproximan a la situación *in vivo*, pero interpretándolas con cautela, han aportado gran información a este campo. Los modelos son *in vivo* e *in vitro*. Los primeros tienen la gran ventaja de la disposición de una gran variedad de animales de laboratorio, y los segundos han proporcionado bases de relevancia clínica.

MODELOS *in vivo*.

TRANSPLANTE DE LINEAS CELULARES NEOPLASICAS.

Inducir tumores a animales de experimentación tiene la ventaja de poder tomar las biopsias necesarias y manejar con facilidad a los animales; las células que se trabajan se pueden propagar *in vitro*. Una desventaja es el cambio que sufren las células como

consecuencia de varios cultivos, entre ellos inmunogenicidad y el surgimiento de clonas metastásicas.

Si la introducción de las células neoplásicas es directamente por vía sanguínea o linfática, se omiten los pasos naturales de la formación de metástasis, a éstas se les llama “metástasis artificiales”; en cambio cuando la inoculación es vía subcutánea, se permite el desarrollo de la metástasis lo más cercano a la realidad y en este caso se llaman “metástasis espontáneas”.

ESTUDIOS CON RATONES DESNUDOS: Se emplean para entender el comportamiento de las células neoplásicas y la respuesta de las células efectoras del hospedero en su intento por destruir el tumor, excluyendo la respuesta que depende de linfocitos T.

INTRODUCCION DE UNA CAMARA EN LA OREJA DEL CONEJO: Se emplea para estudiar movilidad de células tumorales.

ESTUDIOS EN EMBRION DE POLLO: Las células tumorales se inoculan en la membrana alantoidea (CAM) a través de un orificio que se hace en el cascarón. En esencia es una prueba de tumorigenicidad, siendo útil para observar en qué órganos colonizan las células neoplásicas o para estudiar actividad angiogénica.

MODELOS *in vitro*

Muchos de ellos se han enfocado a estudiar principalmente la invasión. Su mayor ventaja es la simplicidad aconsejándose correr en forma paralela estudios *in vivo*.

MODELOS DE DOBLE DIMENSION: En un cultivo de tejido

normal se coloca a una distancia de 1 mm otro cultivo de células tumorales. Las células migran unas con otras estableciendo contacto, las malignas invaden a las normales en mayor proporción. Este sistema ayuda a estudiar principalmente la locomoción e inhibición por contacto.

INVASION DE MONOCAPAS CELULARES: Monocapas de células endoteliales o epiteliales se hacen crecer sobre varios materiales como son: **FILTROS:** el ejemplo más típico para esta prueba es la cámara de Boyden, que consiste de dos compartimentos separados por un filtro poroso (tipo Millipore o nuclepore), el filtro puede variar en cuanto a capacidades de absorción y adsorción, su elección dependerá del tipo celular y del objetivo del estudio. Se han hecho modificaciones a esta cámara como son: colocar sobre el filtro material de tejido conjuntivo como colágena y sobre ella células epiteliales o endoteliales.

OTRAS VARIANTES: AGREGADOS TISULARES: Fragmentos de tejidos embrionarios se incuban con agregados de células tumorales. Son de ayuda para estudiar patrones de invasión. **MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRION DE POLLO:** Esta membrana se extiende sobre una red metálica, previamente cubierta con una capa de agar, colocada en una caja Petri. Se siembran las células sobre ella y a diferentes intervalos de tiempo se analizan histológicamente. **VASOS SANGUINEOS:** Usan porciones de vasos sanguíneos y le introducen un cilindro con poros (<50 micras), de esta manera cosechan las células en un medio que baña el interior del cilindro (202).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las investigaciones señaladas anteriormente parecen confirmar que la elevación de la actividad proteolítica es característica de la transformación maligna y guarda una relación directa con la progresión neoplásica. Se ignora si el fenotipo proteolítico durante esta transformación maligna pudiera tener alguna relación con las alteraciones en la expresión del proto-oncogén c-H-ras y/o el gen nm23.

Se desconoce el papel del gen nm23 en el proceso de invasión y metástasis, por ello es de interés encontrar la relación de este gen y de H-ras con algún parámetro clínico (etapa clínica, edad, tipo histológico, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, respuesta de los pacientes a la radioterapia y sobrevida a 30 meses post radiación).

Este proyecto puede dar información sobre algunos eventos moleculares en el proceso de invasión y representa el primer intento en su género respecto a la correlación de dos genes uno promotor de metástasis y el otro aparentemente "inhibidor" del mismo fenómeno con las proteasas involucrados en la invasión en el carcinoma cérvico uterino.

HIPOTESIS

En la fase de invasividad y metástasis se sintetizan y secretan proteinasas neutras y se altera la expresión de los genes nm23 y c-H-ras. Estas alteraciones podrán ser características y con ello predictivas del comportamiento biológico del cáncer cérvico uterino.

La expresión de alguno de los dos genes es posible tenga alguna relación con parámetros clínicos como son los factores de riesgo para las pacientes con cáncer cérvico uterino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la correlación entre el fenotipo proteolítico (actividad proteolítica de catepsina B, activadores de plasminógeno y colagenasa) y las alteraciones en la expresión de los genes nm23 y c-H-ras en el cáncer cérvico uterino en diferentes etapas de su evolución clínica; así como su relación con la historia clínica de las pacientes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS :

1.- Cuantificar la actividad de catepsina B (tiol-proteinasa), activadores de plasminógeno (serinoproteasas) y colagenasa (metaloproteinasa) en la fracción soluble de tejidos de pacientes con carcinoma cérvico-uterino y correlacionarla con la etapa clínica de la enfermedad.

2.- Valorar la expresión de las proteínas p21^{H-ras} y NM23. Analizar su relación con la historia clínica de las pacientes (etapa clínica, edad, tipo histológico, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales y sobrevida de las pacientes a 30 meses de seguimiento post radiación).

3.- Valorar la expresión de los transcritos nm23 y c-H-ras. Analizar su relación con la historia clínica de las pacientes (etapa clínica, edad, tipo histológico, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales y sobrevida de las pacientes a 30 meses de seguimiento post radiación).

4.- Correlacionar la actividad proteolítica con la expresión de nm23 y c-H-ras a nivel de proteína y transcrito.

MATERIAL Y METODOS

a POBLACION DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSION

Se obtuvieron veinticinco biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide; etapas I (4 casos), II (7 casos), III (6 casos) y IV (8 casos) de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (203); las muestras fueron proporcionadas por el Hospital de Ginecología y Obstetricia #4 del IMSS. Además se usaron 11 muestras con condiloma proporcionadas por la Clínica de Displasias del Hospital General de México de la SSA (este segundo grupo únicamente para la cuantificación de proteasas), y como grupo control 8 tejidos cervicales sin neoplasia de mujeres sometidas a histerectomía con diagnóstico de miomatosis, proporcionadas por el Hospital de México. Las edades de las pacientes con CaCu fluctuaron entre 26 y 73 años ($X= 50$ años), de las personas con cérvix normal entre 35 y 53 años ($X= 44$ años) y con condiloma entre 22 y 50 años ($X= 36$ años) (Cuadro 1; pág. 83).

b PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Todos los tejidos se dividieron en tres partes: una para incluir en parafina y dos para congelar a -70°C . La primera se fijó inmediatamente en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 a 4°C de 1 a 3 horas. Posteriormente se sumergieron en sacarosa al 15% en PBS toda la noche a 4°C (204). Se deshidrataron en los diferentes grados de alcoholes, se

sumergieron en xileno e incluyeron en parafina. Los cortes fueron de 4-5 μ m, montados en portaobjetos tratados con poly-L-lisina (204). Uno de los cortes de cada muestra se tiñó con hematoxilina-eosina para el diagnóstico histopatológico. Los demás se destinaron para estudios inmunohistoquímicos y para hibridación *in situ*.

OBTENCION DEL SOBRENADANTE:

Una de las fracciones congeladas de cada tejido se homogenizó a 4°C en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7; se usó un homogenizador de tejidos TEKMAR. Se centrifugaron a 105 000 g durante 60 minutos. Se separó la fracción soluble. Se dividió en dos partes: una se congeló a -70°C, una para determinar actividad de catepsina B, la otra se congeló separadamente y se usó para determinar actividad de activadores de plasminógeno. La pastilla se guardó también a -70°C para estudios posteriores de DNA. La segunda fracción de tejido congelada se procesó de igual forma, pero, sustituyendo el amortiguador por agua destilada y este sobrenadante se usó para la determinación de la actividad de colagenasa.

c TECNICAS DE PROTEASAS.

La actividad proteolítica de cada enzima fue determinada por la técnica introducida por Smith en la que se usan oligopéptidos sintéticos específicos para cada proteasa y su escisión enzimática libera una molécula fluorescente (dependiendo de cómo esté marcado el sustrato puede ser metilcumarina o 4-metoxi-2-naftilamina), que se cuantifica en un

espectrofluorómetro (205, 206). Las metodologías que se siguieron fueron las siguientes: para catepsina B como la describe Szego (207); para activadores de plasminógeno como la determina Zimmerman y col. (208) y para colagenasa como la adapta Kohichi K. (66).

La clasificación de las proteinasas está basada en la naturaleza del grupo catalítico y la elección del sustrato, por lo que el uso de inhibidores es de gran importancia en el reconocimiento de las enzimas proteolíticas (209, 210).

Los inhibidores que se emplearon fueron EP-64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido (4-amino) butano], para catepsina B; leupepetina para activadores de plasminógeno y EDTA para colagenasa.

A la actividad proteolítica total de cada muestra y para cada enzima, se le restó el % de no inhibición (actividad inespecífica); con la diferencia se efectuaron los cálculos necesarios y se reportó en pmoles de sustrato hidrolizado/mg de proteína/minuto. La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

CATEPSINA B:

El sustrato N-CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4-metoxi-2naftilamida, se ha reportado como el sustrato más sensible y específico para catepsina B (211). Como esta enzima requiere la activación de grupos sulfhidrilo, para su determinación se emplea el ditiotreitól.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: sustrato 340 nM, fuente enzimática 30 μ g de proteína de la fracción soluble de los tejidos (dependiendo de la actividad enzimática se hicieron las diluciones pertinentes) y ditioneol 20mM, todo esto en amortiguador de citrato de sodio 20mM-fosfato de sodio 20mM pH6.5 en un volumen final de 2ml. Se incubó a 37°C y se cuantificó la actividad enzimática a través de la fluorescencia emitida del producto liberado 4-metoxi-2naftilamina que se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo L-S3 a 410 nm de emisión y 292 nm de excitación; se registraron 3 lecturas a los 2, 6 y 10 minutos. El % de fluorescencia se interpoló en una curva estándar de diferentes concentraciones de 4-metoxi-2naftilamina. Para determinar el % de inhibición se preincubó la fracción soluble 5 minutos a 37°C con el inhibidor E-64 20 μ M, para formar el complejo enzima-inhibidor. Después se adicionó el sustrato bajo las condiciones anteriores. Se efectuaron los cálculos necesarios.

Para comprobar la especificidad de catepsina B, se hidrolizaron los tres sustratos diferentes con catepsina B de bazo bovino. En la Figura 1 se muestran las cinéticas de dicha enzima con cada uno de los tres sustratos (CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4MONA, CBZ-Gly-Gly-Arg-MCA y Succ-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA), demostrándose una clara especificidad del sustrato CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4-metoxi-2-naftilamida para esta enzima, a diferencia de los otros dos.

ACTIVADORES DE PLASMINOGENO:

El sustrato empleado fue N-CBZ-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: sustrato $0.1\mu\text{M}$, fuente enzimática 0.3 mg de proteína de la fracción soluble de los tejidos (dependiendo de la actividad enzimática se hicieron las diluciones pertinentes), todo esto en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH7.5 en un volumen final de 2ml. Se incubó a 37°C y se cuantificó la actividad enzimática a través de la fluorescencia emitida del producto liberado metilcumarina que se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo L-S3 a 383 nm de excitación y 445 nm de emisión; se registraron tres lecturas a los 2, 6 y 10 minutos. Los porcentajes de fluorescencia se interpolaron en una curva estándar hecha con diferentes concentraciones de MCA (metilcumarina). Para determinar el % de inhibición se preincubó la fracción soluble 5 minutos a 37°C con el inhibidor leupeptina 40nM, para formar el complejo enzima-inhibidor. Después se adicionó el sustrato bajo las condiciones anteriores. Se efectuaron los cálculos necesarios.

COLAGENASA:

Se empleó el sustrato Succ-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro 7-amido-4-metilcumarina. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: sustrato 125 nM, fuente enzimática 0.3 mg de proteína de la fracción soluble de los tejidos (dependiendo de la actividad enzimática se hicieron las diluciones pertinentes), todo esto en amortiguador Tris-malato 0.2 M pH 8.0 con CaCl_2 20mM en un volumen final de 2ml. Se incubó a 37°C y se cuantificó la

actividad enzimática a través de la fluorescencia emitida del producto liberado metil cumarina que se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo L-S3 a 380 nm de excitación y 460 nm de emisión; se registraron 3 lecturas a los 2, 6 y 10 minutos. Los porcentajes de fluorescencia se interpolaron en una curva estándar hecha con diferentes concentraciones de MCA (metil cumarina). Para determinar el % de inhibición se preincubó la fracción soluble 30 minutos a 37°C con el inhibidor EDTA 20 μ M, para formar el complejo enzima-inhibidor, al mismo tiempo se corrió una muestra sin inhibidor para comprobar que la enzima no se inactiva bajo estas condiciones. Después se adicionó el sustrato bajo las condiciones anteriores. Se efectuaron los cálculos necesarios.

CONTROL DE LOS ESPECTROS DE EMISION Y EXCITACION DEL PRODUCTO LIBERADO METILCUMARINA (MCA). Las enzimas estudiadas escinden los sustratos sintéticos, liberando un compuesto fluorescente, ya sea metil cumarina ó 4-metoxi-2naftilamina (4MONA), según sea la marca del sustrato. Como tales compuestos tienen un espectro de emisión y excitación característico, como control de nuestras mediciones registramos dichos espectros. En la Figura 2 se muestran los espectros de emisión y excitación del producto liberado MCA al ser escindido el sustrato Succinil-Glicina-Prolina-Leucina-Glicina-Prolina-Metilcumarina por las siguientes muestras: colagenasa de *Clostridium histolyticum* tipo IV₁ fracción soluble de tejido neoplásico y suero de una paciente con cáncer cérvico uterino. Se

observan los dos picos característicos de dicho compuesto (MCA), tanto en forma pura como en las muestras probadas, sin interferencia de otra sustancia. La diferencia en alturas de cada pico nos indica que la concentración de enzima varía en cada una de las muestras. Los espectros de emisión y excitación de 4MONA no se muestran.

d TECNICAS DE GENETICA MOLECULAR

INMUNOHISTOQUIMICA

Para las determinaciones inmunohistoquímicas se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: 1) nm23 (Ab-1) monoclonal, detecta la proteína nm23-H1. 2) p21^{H-ras} (Ab-1) monoclonal, dirigido contra el epitopo que comprende los aminoácidos 54-188 de la proteína p21^{H-ras}. 3) trp E (Ab-1) monoclonal, reacciona contra la proteína antranilato sintetasa de *E. coli*. 4) alfa tubulina monoclonal, dirigido contra alfa tubulina humana. Todos ellos hechos en ratón de la casa comercial Oncogene Science.

En general se siguió la siguiente técnica (212): se desparafinaron los tejidos en xileno, dos cambios de diez minutos cada uno. Posteriormente se hidrataron sumergiendo los tejidos en soluciones descendentes de concentraciones de etanol, éstas fueron: 100%, 95%, 70% y 30%, dos cambios en cada una de ellas durante 2 minutos cada uno. Luego se incubaron diez minutos en

PBS 1X (phosphate-buffered saline). Para eliminar la peroxidasa endógena se trataron los tejidos con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos (a temperatura del laboratorio). A continuación se lavaron con PBS 1X. En el caso de H-ras, después de este paso fue necesario hacer un pretratamiento, se sumergieron las laminillas 30 minutos en una solución al 0.1% de Tritón en Tris-HCl 0.05M pH 7.0. Posteriormente para suprimir la unión no específica de IgG, las laminillas se trataron 30 minutos a temperatura del laboratorio con suero bloqueador al 10% (suero de cerdo no inmune) en cámara húmeda. Se procedió a eliminar el exceso de suero bloqueador y se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario diluido 1:20 en PBS durante 24 horas a 4°C., en cámara húmeda. Después de este tiempo se lavaron en PBS 1X y se trabajaron de la siguiente manera: se empleó un anticuerpo secundario (contra ratón hecho en conejo) como puente, posteriormente se hicieron reaccionar con el complejo peroxidasa antiperoxidasa, y se reveló con una solución de 3,3'-Diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) (se mezclaron 5 mg de DAB en 10 ml de Tris-HCl 0.05M pH 7.0 con 3 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%). Se monitoreó la reacción bajo el microscopio, y una vez establecido el tiempo de revelado para cada anticuerpo, se trabajaron todas las laminillas con el mismo tiempo. Se contrastaron las muestras con hematoxilina de Harris. Finalmente se deshidrataron en los diferentes grados de etanol, se clarificaron en xilol y se montaron en resina sintética. Los controles fueron los siguientes: NEGATIVO: En cortes normal y neoplásico se siguió el mismo tratamiento usando como primer

anticuerpo uno contra la proteína antranilato sintetasa de E. coli (Trp E). Para validar el sistema de revelado peroxidasa antiperoxidasa se usó otro anticuerpo contra alfa tubulina humana. Como control POSITIVO para NM23 se usó un corte de mama normal y para H-ras un corte de piel anexado en el kit.

EVALUACION:

La cuantificación de los niveles de proteína en las inmunohistoquímicas se efectuó en un analizador de imágenes (PC-IMAGE COLOUR SPRYNT/WINDOWS); se realizó por la técnica de RGB (Red, Green, Blue); en este caso se detectó el color café que corresponde al producto de la reacción de inmunoperoxidasa (213). Este método depende del umbral (threshold), esto es, detecta la tinción de peroxidasa en un punto dado (pixel) de acuerdo a valores establecidos que van del 0 al 255 para cada uno de los componentes del gris, éstos son el rojo, verde y azul. Así, el negro está formado por un valor de rojo=0, verde=0 y azul=0; el blanco por rojo=255, verde=255 y azul=255; siendo sus grados intermedios las combinaciones de los valores de estos colores. El equipo detecta las diferentes intensidades de café como intensidades de gris. Nuestra escala fue la siguiente: señal café intensa =3 (threshold: rojo=130-165, verde 95-126, azul 70-122); señal café intermedia =2 (threshold: rojo = 150-200, verde 127-160, azul = 123-160) y una señal café baja =1 (threshold: rojo=188-202, verde 158-179, azul 162-190) (Figura 3); obtuvimos el área de citoplasma valorada restando al área total, el área de los núcleos (threshold: rojo= 0-155, verde= 0-255,

azul= 0-255) Estos valores absolutos (3, 2 ó 1) los multiplicamos por el porcentaje del área de citoplasma que expresan esa intensidad. Ejemplo (caso 18 ras): el 5% del citoplasma tiene una intensidad de 3, esto nos dá un valor de 15; el 36% del citoplasma una intensidad de 2, dando un valor de 72 y el 9% una de 1, con un valor de 8; por lo tanto esta muestra tendrá un valor total de 96 (15 + 72 + 9). El porcentaje de citoplasma restante fue negativo a la proteína.

HIBRIDACION *in situ*

PRIMER DIA: Los cortes en parafina se desparafinaron e hidrataron. Se trataron con tripsina 1.25µg/ml medio minuto a 37 °C., después en PBS 1X (phosphate-buffered saline) 10 minutos. Posteriormente otros diez minutos en glicina al 4% en PBS 1X (se preparó el mismo día). Se lavaron en PBS 1X. Se deshidrataron en diferentes concentraciones de etanol y dejaron secar al aire 20 minutos a temperatura ambiente. Se preparó el "cocktail" de hibridación con formamida al 50%, EDTA 5 mM, cloruro de sodio 0.6M, dextrán sulfato 10%, Tris 10 mM pH 7.0, DNA de esperma de salmón 0.2mg/ml, ficoll 0.02%, BSA 1 mg/ml, poli-vinil-pirrolidona 0.02% y ditiotreititol 0.5 mM y 0.2 ng/ml de sonda-³⁵S (marcada por nick translation). Se desnaturalizó la sonda calentando a 90°C tres minutos e inmediatamente se pasó a hielo. Una vez secos y deshidratados los cortes, se colocó la muestra en una estufa a 65°C durante tres minutos. Se colocaron los portaobjetos sobre la mesa y se cubrió el tejido con la sonda.

Sobre la muestra y sonda se colocó un parafilm o cubreobjetos en una área aproximada de 1cm^2 . En una cámara húmeda se incubaron durante 12 horas a 40°C . SEGUNDO DIA: Se lavaron dos veces con agua bidestilada las preparaciones, 10 minutos cada una. El agua se depositó en un bote de plástico y manejó como desecho radioactivo. Se hicieron dos lavados con formamida al 50% en SSC 2X (standard saline citrate) a 50°C , cada uno de 45 minutos. Se incubaron en una solución de RNAsa 25 mg/ml (antes de usarla se hirvió 15 minutos) a 37°C durante una hora. Se lavaron en SSC con la siguiente secuencia: SSC 2X a 50°C durante una hora, SSC 2X a temperatura ambiente 15 minutos en agitación, SSC 1X a temperatura ambiente 15 minutos en agitación, SSC 0.1X a temperatura ambiente 15 minutos. Finalmente se lavaron en PBS, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se dejaron secar 20 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a la autorradiografía. En cuarto oscuro, se sumergieron tres veces las laminillas en emulsión fotográfica (Autoradiographic emulsion LM-1, Amersham) que debe estar al 50% en agua destilada estéril y entre $37\text{-}40^\circ\text{C}$. Se dejó escurrir el exceso de emulsión fotográfica y se colocaron las laminillas en forma vertical en una caja con CaCl_2 bien tapada, y esta última a su vez en una caja negra, protegida de la luz. Se dejaron exponiendo cuatro días a 4°C . SEPTIMO DIA: En cuarto oscuro se procedió como sigue: se sacaron las laminillas y sumergieron dos minutos en revelador D-19 de Kodak, ácido acético al 2% durante dos minutos, fijador rápido Kodak durante dos minutos y se lavaron en PBS. Fuera del cuarto

oscuro se contrastaron con Hematoxilina-Eosina. Se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol, aclararon con xilol y montaron con resina.

Se emplearon sondas de cDNA de nm23 (900 bp) y de H-ras (1.1Kb). Como controles positivo y negativo se usaron las sondas con antisentido (3'→5') y sentido (5'→3') (obtenidas por transcripción in vitro empleando las polimerasas SP6 y T7, respectivamente) (214). Otro control POSITIVO fue el uso del cDNA del RNA ribosomal 18s. Y como último control se co-localizaron el transcrito y la proteína.

EVALUACION:

Como señal positiva se consideró el depósito de plata sobre el citoplasma de las células y se evaluó como positivo o negativo, comparándolo con el control negativo

e ANALISIS ESTADISTICO.

De los valores obtenidos de las actividades catepsina B, colagenasa y activadores de plasminógeno en una escala cuantitativa de razón se realizaron medidas de tendencia central a través de la mediana y desviación cuartílica (Md, Q25-Q75) porque no tuvieron una distribución de tipo Gaussiana, las diferencias se contrastaron por medio del análisis de varianza de una clasificación por rangos o prueba de Kruscal-Wallis. Cuando encontramos diferencias globales en el análisis de varianza, se contrató por pares de etapas a través de la U de Mann-Whitney.

Para determinar la correlación entre inmunoreactividad y parámetros clínicos, se empleó la prueba de χ^2 y prueba exacta de Fisher. El método de Kaplan y Meier se usó para estimar la distribución de sobrevida, y la diferencia significativa fue analizada por "Log Rank Test". Cualquier valor se consideró significativo con un valor de $p \leq 0.05$;

RESULTADOS

1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

a) DETERMINACION DE CATEPSINA B EN TEJIDOS NEOPLASICOS Y CONTROLES

La Figura 4 muestra que los tejidos con cáncer comparada con los grupos control y con condiloma tienen una actividad proteolítica mucho mayor (de 5 a 12 veces más actividad), tanto del grupo de la etapa I (Md = 14200) como de los grupos de las etapas II (Md = 18650), III (Md = 24450) y IV (Md = 17900), teniendo todos ellos significancia estadística ($p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney). Los tejidos del grupo control (Mediana Md = 1500) tuvieron una actividad de catepsina B semejante a los tejidos del grupo con condiloma (Md = 2800), sin diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). En los tejidos neoplásicos, se observa una tendencia a detectar mayor actividad de catepsina B entre más avanzada sea la etapa clínica del paciente, con excepción del grupo en etapa 4; sin embargo no se encontró diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney).

b) DETERMINACION DE COLAGENASA EN TEJIDOS NEOPLASICOS Y CONTROLES

La actividad de la colagenasa (Figura 5) como en catepsina B, se encuentra más elevada en los tejidos neoplásicos

(de 2 a 9 veces más) tanto en etapa clínica I (Md = 839) como en II (Md = 2130), III (Md = 1017) y IV (Md = 1130) comparada con los grupos control (Md = 303) y condiloma (Md = 316); sin embargo entre los tejidos neoplásicos y el grupo control se encontraron diferencias significativas a partir del grupo de neoplasias en etapa II ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). Los resultados anteriores fueron semejantes al comparar los grupos de cáncer con condilomas. La actividad del grupo control y de condilomas fue similar.

c) DETERMINACION DE ACTIVADORES DE PLASMINOGENO EN TEJIDOS NEOPLASICOS Y CONTROLES.

Los resultados (Figura 6) muestran que el grupo control (Md = 638) tuvo mayor actividad (de 3.6 a 5 veces más) que los grupos de las etapas clínicas I (Md = 169), II (Md = 171), III (Md = 95) y IV (Md = 111); incluyendo el grupo con condilomas (Md = 167), siendo todas ellas estadísticamente significativas ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). La actividad de los tejidos de las diferentes etapas clínicas no mostraron alguna variación ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney).

f) ACTIVIDAD DE LAS TRES ENZIMAS ESTUDIADAS

En la Figura 7 se reúnen las actividades de las tres enzimas; por este método (de Smith, usando oligopéptidos sintéticos) se detecta mayor actividad de catepsina B que de colagenasa y de activadores de plasminógeno.

2. EXPRESION DE LAS PROTEINAS NM23 Y p21^{H-ras} EN TEJIDOS INVASORES DEL CERVIX

Cortes histológicos de cada una de las muestras fueron utilizados para determinar la expresión de los genes nm23 y H-ras. En la Figura 8 se muestran los controles empleados.

Al aplicar la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-NM23 revelada por el método peroxidasa-antiperoxidasa, observamos que la señal es citoplásmica para ambos tejidos: cérvix normal y cérvix invasor; en los tejidos control (Figura 9A), la marca es evidente en los estratos medio y superior; de ellos, el 100% fueron positivos para la proteína NM23; en los tejidos invasores la señal se observa en células aisladas (Figura 9B) o en grupos de células (Figura 9C). En el 60% de los tejidos neoplásicos no detectamos proteína NM23, como se muestra en un tejido invasor en la Figura 9D. Y sólo el 40% de las muestras de tejido neoplásico fueron inmunoreactivas para NM23 ($p < 0.05$; Prueba exacta de Fisher). Se realizó una semicuantificación del nivel de proteína (Figura 3), asignando valores arbitrarios de acuerdo a un análisis de imágenes (ver metodología); los resultados se muestran en el cuadro 3 (pág.98.).

Deseando conocer la posible relación entre las muestras que expresan o no la proteína NM23 y la sobrevida de las pacientes, se estimó la distribución de sobrevida por medio de curvas Kaplan y Meier para ambos grupos NM23(+) (10 casos) y NM23(-) (15 casos); la Figura 10A muestra claramente que la sobrevida de las pacientes es independiente de la presencia de la

proteína NM23 ($p > 0.05$; Long Rank Test). El siguiente análisis fue únicamente para el grupo NM23(+) para establecer la posibilidad de que el nivel de la proteína NM23 discriminara a pacientes de buen pronóstico con los de mal pronóstico; se hicieron pruebas de sensibilidad diagnóstica mediante curvas ROC (Receiver/response operating characteristic; Figura 11). Estas curvas se utilizan para evaluar pruebas diagnósticas, en este caso, se calculó la proporción de pacientes que fallecieron por abajo del punto de corte de proteína NM23 (Ej. < 40) entre el total de pacientes fallecidos (esta proporción es la sensibilidad), el siguiente cálculo fue la proporción de pacientes vivos arriba ó en el punto de corte (≥ 40) entre el total de pacientes vivos (especificidad); los puntos a graficar tienen por coordenadas: en el eje de las abscisas 1-especificidad (falsos positivos) y en el de las ordenadas la sensibilidad (positivos verdaderos). El punto de corte adecuado es el que tiene mayor sensibilidad y que detecta menor proporción de falsos positivos. La gráfica de la Figura 11, indica que el punto de corte (cutoff) adecuado es de 40; esto es, los pacientes con un valor inferior a 40 tienen mal pronóstico y viceversa. También indica una sensibilidad muy baja del 60% con una proporción elevada de falsos positivos 45%. De acuerdo a estos resultados la semicuantificación de la proteína NM23 no es útil como factor pronóstico independiente de sobrevida.

No se encontraron asociaciones entre la proteína NM23 y etapa clínica, grado de diferenciación (de los carcinomas epidermoides pobremente diferenciados, el 54% son positivos a la

proteína y de los carcinomas epidermoides medianamente diferenciados el 28% son positivos), edad, número de gestas y número de parejas ($p > 0.05$; prueba de χ^2). Únicamente el IVSA parece no ser al azar pues solamente el 8% (1/13) de las pacientes que iniciaron su vida sexual antes de los 20 años y un alto porcentaje, el 75% (6/8), de las pacientes que la iniciaron después de los 20 años expresan la proteína NM23 ($p < 0.05$; Prueba exacta de Fisher) (Cuadro 2; pág. 95).

Para el caso de la proteína p21^{H-ras}, ésta se expresó en el 100% de los casos y controles, siendo la señal más intensa en el 40% de los tejidos neoplásicos. La señal fue citoplásmica, con grado variable de intensidad y porcentaje de células (Figura 12). El anticuerpo utilizado detecta proteína H-ras silvestre y mutada. Como grupo total no se encontró relación entre el nivel de la expresión de la proteína y la evolución clínica de la neoplasia ($p > 0.05$; prueba de Kruskal-Wallis, datos no mostrados). La sobrevida de los pacientes con CaCu se analizó de la siguiente manera: se formaron dos grupos uno fue de aquellas pacientes con niveles de proteína p21^{H-ras} semejantes al grupo control (entre 2 y 39 unidades) y el otro con niveles mayores que el grupo control (> de 39 unidades). En la Figura 10C se muestran las curvas de sobrevida de ambos grupos, como se observa el comportamiento de ambas curvas es similar ($p > 0.05$; Long Rank Test).

3. DETECCION POR HIBRIDACION *in situ* DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES nm23 y H-ras EN TEJIDOS NEOPLASICOS DEL CERVIX.

Para investigar a qué nivel se altera la expresión de estos genes, se exploraron los transcritos de dichos genes, el interés estuvo enfocado principalmente a los casos que no expresaron la proteína NM23.

La imagen de algunos tejidos neoplásicos y su control se muestra en la Figura 13, una señal positiva significa que hubo apareamiento de bases del transcrito con la sonda y al revelar la marca radiactiva de la sonda, observamos los depósitos de plata como granos negros; en cambio cuando no hay apareamiento, como sucede al emplear la sonda sentido o el tejido procesado sin sonda, no se observarán los granos negros.

Encontramos señal positiva para el transcrito H-ras, en ambos grupos control y neoplásico. La expresión de la proteína p21^{H-ras} coincide en todos los casos con la presencia de transcrito (Cuadro 3; pág. 98), pero de una manera cualitativa no siempre coincidió la cantidad de transcrito con la cantidad de proteína.

Para el transcrito nm23 (Cuadro 3) encontramos que el 100% de los controles y el 72% de los tejidos neoplásicos fueron positivos. Si consideramos dos grupos: los que expresan la proteína NM23 y los que no expresan la proteína, para el primero de ellos tenemos que en el 100% de los casos se detecta el transcrito; en cambio en el grupo que no expresa la proteína en

algunos tumores se expresa el transcrito (8/15), principalmente en las etapas clínicas tempranas I y II ($p < 0.05$; prueba exacta de Fisher). Al analizar las curva de sobrevida (Kaplan y Meier) de los dos grupos: el que expresa el transcrito y el que no lo expresa (Figura 10B), observamos que las curvas tienden a comportarse de manera diferente entre ellas, esto es, las pacientes del grupo que no expresaron el transcrito (etapas clínicas tardías) tienen una menor sobrevida a 30 meses post radiación y lo contrario las pacientes que expresaron el transcrito (etapas clínicas tempranas) tienen mayor sobrevida a 30 meses post radiación. Sin embargo a 30 meses de seguimiento estadísticamente no hay significancia ($p > 0.05$; Long Rank Test).

4. ANALISIS CORRELATIVO DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y EXPRESION DE LAS PROTEINAS Y TRANSCRITOS nm23 y H-ras.

a) CORRELACIONES DE LA PROTEINA NM23 CON LAS PROTEASAS ESTUDIADAS.

De acuerdo a nuestro objetivo procedimos a la búsqueda de alguna relación entre estas enzimas y la expresión de las proteínas y transcritos de nm23 y H-ras

No se encontró una correlación directa entre la expresión de la proteína NM23 y la actividad proteolítica de catepsina B (Figura 14), sin embargo, se observan tres grupos bien definidos: 1) Proteína NM23 positiva y actividad de catepsina B moderada, 2) proteína NM23 positiva y actividad de catepsina B muy elevada y 3) proteína NM23 negativa y un rango amplio de

valores de actividad de catepsina B. En la gráfica se excluye al paciente #4 por quedar fuera de las coordenadas de todos los demás casos (la lectura de catepsina B fue de 168100 y cero de NM23).

El grupo 3 se acomodó en orden descendente de actividad de catepsina B, haciendo dos cortes arbitrarios de acuerdo a etapas clínicas tempranas (I y II, que incluye el subgrupo 3b) y a etapas clínicas tardías (III y IV, que incluye los subgrupos 3a y 3c), de esta forma se analizaron los grupos. El cuadro 4 (pág. 100) resume las variables de interés para estos grupos. En el grupo 1, predominan etapas avanzadas (III y IV), la actividad de catepsina B (moderada) es mayor que en el grupo control ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney); hay mayor expresión de proteína p21^{H-ras} con respecto al control ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney) y a 30 meses de seguimiento la mayoría de los pacientes fallecieron. El grupo 2 incluye etapas clínicas I, II y III con actividad de catepsina B (muy elevada), significativamente mayor que el grupo control ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney) y que el grupo 1 ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney); proteína p21^{H-ras} semejante a los controles ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney) y con respecto al grupo 1 menor nivel de expresión ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney); a 30 meses de seguimiento el 80% de las pacientes están vivas. Al subgrupo 3a corresponden pacientes sin proteína NM23, con niveles muy elevados de actividad de catepsina B, p21^{H-ras} con un amplio rango de valores, etapa clínica avanzada (a excepción de un caso), y el seguimiento a

30 meses desfavorable; el subgrupo 3b sin proteína NM23, actividad de catepsina B elevada (menos que el subgrupo 3a), p21^{H-ras} con un amplio rango de valores, etapas clínicas tempranas y todos los pacientes vivos a 30 meses de seguimiento; el último subgrupo 3c cuyo comportamiento es muy parecido al subgrupo 3a con excepción de la actividad de catepsina B que es baja. Es probable que la actividad baja de catepsina B en este subgrupo sea debida a la presencia de tejido necrótico, todos los demás parámetros son similares al subgrupo 3a.

En resumen la correlación de proteínas NM23, p21^{H-ras} y catepsina B definen 4 fenotipos importantes:

- a) presencia de proteína NM23, actividad moderada de catepsina B, expresión mayor que el grupo control de p21Ras;
- b) presencia de proteína NM23, actividad muy elevada de catepsina B, expresión igual al grupo control de p21Ras;
- c) proteína NM23 negativa, actividad de catepsina B muy elevada, un amplio rango de valores de p21Ras y
- d) proteína NM23 negativa, actividad elevada de catepsina B, un amplio rango de valores para p21Ras.

Analizando la actividad de catepsina B como dos grupos diferentes (Figura 15): el grupo negativo a la proteína NM23 y el grupo positivo a la misma proteína, encontramos que para el primer caso, la actividad de esta enzima guarda una relación directa con la progresión de la neoplasia (coeficiente de regresión $r = 0.66$; $p < 0.05$), aunque estadísticamente no son grupos

diferentes por el escaso número de casos ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). En cambio el grupo positivo a la proteína NM23 no muestra tal relación.

Para el caso de la correlación proteína NM23 y colagenasa (Figura 16), se observa una tendencia hacia una relación inversa, es decir, a mayor actividad de colagenasa menor expresión de proteína NM23 y viceversa, a pesar de ello no hay significancia estadística (coeficiente de regresión lineal = -0.41 ; $p > 0.05$).

Analizando a la última enzima, activadores de plasminógeno, con respecto a la proteína NM23, no encontramos correlación entre ambas (datos no mostrados).

b) CORRELACIONES DE LA PROTEINA $p21^{H-ras}$ CON LAS PROTEASAS ESTUDIADAS.

Ahora mostramos el análisis de $p21^{H-ras}$ y las proteasas.

En la Figura 17A se muestra el comportamiento de $p21^{H-ras}$ frente a catepsina B; en las muestras control no encontramos correlación; en cambio en las muestras de CaCu (Figura 17B), se observa una tendencia hacia una relación inversa, pero no hay significancia estadística (coeficiente de regresión lineal $r = -0.47$; $p > 0.05$).

El siguiente análisis efectuado fue el comportamiento de la proteína $p21^{H-ras}$ con la actividad de colagenasa; en el grupo

control (Figura 18A) no encontramos relación entre esta proteasa y la expresión de p21^{H-ras}, mientras que en los tejidos con cáncer (Figura 18B) existe una tendencia a disminuir la proteína p21^{H-ras} en relación inversa a la enzima, como en el caso de catepsina B, no hubo diferencia significativa (coeficiente de regresión $r = -0.23$; $p > 0.05$).

Estudiando a activadores de plasminógeno, no encontramos relación alguna con p21^{H-ras} (datos no mostrados).

c) CORRELACION DE LA PROTEINAS NM23 Y p21^{H-ras}.

Finalmente, correlacionamos la expresión de NM23 y p21^{H-ras} ya que ambas proteínas están involucradas en la evolución de las neoplasia (Figura 19). Como grupo total no podemos decir que existe alguna relación (coeficiente de regresión $r = 0.09$; $p = 0.05$), pero es muy notable en la gráfica que el 60% de las muestras guardan una relación directa (coeficiente de regresión lineal $r = 0.94$; $p < 0.05$) De estas muestras, la mitad corresponde al grupo 1 (NM23+, actividad de catepsina B moderada, p21^{H-ras} con expresión mayor que el grupo control) y el otro 50% al grupo 2 (NM23+, actividad de catepsina B muy elevada, p21^{H-ras} igual que el grupo control), de acuerdo a los grupos establecidos en la Figura 14. Llama la atención que en la gráfica, los primeros tres puntos corresponden a tejidos de pacientes vivas a 30 meses del grupo 2 y los siguientes tres puntos a tejidos de pacientes fallecidos del grupo 1.

d) ANALISIS EN RELACION AL ESTADIO CLINICO.

Está documentado desde hace muchos años que la progresión del carcinoma cérvico uterino depende del estado clínico de la enfermedad, y como consecuencia la sobrevida de la paciente. A 30 meses de seguimiento resalta en el Cuadro 4 que las pacientes en etapas clínicas I y II aún viven y las etapas tardías ya fallecieron ($p < 0.05$; prueba exacta de Fisher).

En el análisis de proteínas NM23 y p21^{H-ras}, por etapa clínica no encontramos alguna tendencia o relación ($p > 0.05$; prueba de Kruscal-Wallis). Por grupos es como hemos encontrado asociaciones y son las que hemos ya mencionado.

e) CORRELACIONES DE LOS TRANSCRITOS Y LAS PROTEASAS.

No encontramos correlación alguna entre el transcrito de nm23 y la actividad proteolítica. Debido a que el transcrito de H-ras fue positivo en todas las muestras estudiadas y únicamente hicimos el análisis como positivo o negativo, no procedió buscar correlaciones.

DISCUSION

Esta es la primera vez que se intenta correlacionar las actividades de catepsina B, colagenasa y activadores de plasminógeno con la expresión de dos genes, uno promotor de metástasis (H-ras) y el otro aparentemente "inhibidor" del mismo fenómeno (nm23). El cáncer del cuello uterino es un buen modelo que permite estudiar la invasión en las diferentes etapas clínicas. Por tanto, enseguida relacionaremos nuestros resultados con los de otros investigadores y las aportaciones del presente trabajo.

En general, nuestros resultados señalan que existen aumento en la actividad proteolítica de la fracción soluble de tejidos neoplásicos, corroborando las observaciones hechas por otros grupos, en la misma neoplasia tanto en suero como en líquido vaginal y fracción soluble (13, 33, 34, 215, 216). Así mismo se observa una tendencia directa y lineal entre la actividad de catepsina B de la fracción soluble de tejidos neoplásicos y la etapa clínica, excepto la etapa IV en la cual encontramos mayor actividad que los controles, pero no mayor que la etapa clínica III. El no haber encontrado significancia estadística entre los grupos de las diferentes etapas clínicas de acuerdo a la clasificación de FIGO (entre el grupo de pacientes de cada etapa clínica y el grupo control sí hubo significancia estadística) puede ser debida al reducido número de casos. Las razones por las cuales la etapa IV no tiene la actividad de catepsina B más alta pueden ser las siguientes: quizá en etapas tempranas la presencia de catepsina B

sea indispensable para su fenotipo invasor, tal como el caso de cáncer de colon en el cual Murane y col. reportan que pacientes en etapas A y B la actividad de catepsina B en la fracción soluble de tejido y su transcrito se encuentran 1.35 y 3.46 veces más elevados, respectivamente, que las etapas C y D (217). La siguiente razón es que cada caso representa un comportamiento biológico diferente de acuerdo a la expresión de sus genes (con más detalle se explicará posteriormente). Como se ha reportado, la catepsina B también actúa sobre proenzimas para activarlas, pudiera ser que, debido a esto, gran parte de la enzima en etapas avanzadas esté consumida. Una última explicación probable, es que en esta etapa las neoplasias son de gran volumen con zonas extensas de tejido necrótico.

Con respecto a colagenasa, nuestros resultados coinciden con los de otros autores en cuanto a la producción elevada de colagenasa en tejido neoplásico con respecto a los tejidos sanos, pero no encontramos un incremento paralelo con la evolución clínica. Posiblemente esta proteasa no se relaciona directamente con la evolución clínica de la neoplasia o este sustrato no es muy sensible. Irimura en otro tipo de neoplasia (cáncer de colon), reporta actividad colagenolítica tipo IV elevada sin correlación con la evolución clínica de la enfermedad (218) . Existen pocos estudios de esta enzima en cáncer cérvico uterino y en ninguno utilizan esta metodología. Los métodos más utilizados son radioactivos y degradación de fibras de colágena. Es posible que por ello diferimos con el trabajo de Daneri y col. quienes analizaron extractos de tejidos de cérvix normal, lesiones

intraepiteliales de bajo y alto grado y tejido neoplásico y encontraron un incremento en la actividad proteolítica de tipo metaloproteinasas de acuerdo a la historia natural del cáncer cervical (219). Nuovo y col. reportaron la relación MMP:TIMP (metaloproteinasa: inhibidores de metaloproteinasa) y encontraron que los pacientes de mal pronóstico tuvieron una relación 3.4-5.4, en cambio los pacientes de buen pronóstico estuvieron alrededor de 1; sugiriendo que la relación entre metaloproteasas y sus inhibidores es un factor esencial en la agresividad de esta neoplasia (185).

Los resultados obtenidos para la actividad de activadores de plasminógenos fue sorprendente, aunque la literatura muestra controversias importantes sobre la participación de esta proteasa en el cáncer (220). Encontramos mayor actividad de esta proteasa en tejido normal que en el tejido invasor; esto lo explicamos de tres formas:

1) puede ser que en este tipo de neoplasia, la célula se cubra de una capa de fibrina para evadir respuesta inmune y de tal forma no requiere de la actividad fibrinolítica (sugerencia de Gunji y Dvorak), siendo este mecanismo una forma de selección de células neoplásicas para la formación de metástasis y por consiguiente la no producción de activadores de plasminógeno (221, 222).

2) Aunque la actividad proteolítica se requiere para la invasión, se ha demostrado *in vitro* que su exceso evita el ensamble coordinado de células endoteliales en los vasos capilares de neoformación, por ello la proteólisis debe ser

finamente coordinada (223).

3) Los activadores de plasminógeno pueden convertir formas latentes de otras enzimas a su forma activa (por ejemplo colagenasa), es por lo que el "pool" intrínseco de activadores de plasminógeno pudiera estar depletado por activar proteinasas latentes. Este punto es una sugerencia de Vasishta, quien estudiando cáncer gástrico encontró niveles de activadores de plasminógeno superiores en tejido normal que en tejido neoplásico (38).

Otra investigación que concuerda con la nuestra es el estudio reportados por Yuen, quien en carcinoma de células escamosas de cérvix, no encuentra actividad fibrinolítica, en cambio en leiomioma (tumor benigno), encuentra una actividad acentuada (224).

Por otro lado nuestros resultados están en desacuerdo con los reportados por los siguientes autores: Laarsson (por inmunohistoquímica) encuentra que en CaCu hubo mayor expresión de uPA que en las displasias, con una distribución heterogénea, haciéndose más intensa en los macrófagos (está bien comprobado que los macrófagos son productores en cultivo de uPA) (60). Koelbl y Kirchheimer detectaron uPA en plasma de pacientes con CaCu y encontraron mayor proporción de esta enzima en las neoplasias en etapas avanzadas (III y IV) que en etapas tempranas (I y II) y ambas que el grupo control (225, 226). Kobayasi en CaCu etapa II, encontró una mayor concentración y actividad en la neoplasia comparada con el grupo control (227). Saito no encuentra diferencias de los niveles de urocinasa en el plasma de

pacientes con CaCu y mujeres sanas, en cambio en homogenados de tejidos los niveles de la enzima fueron mayores en pacientes con cáncer cervical que en pacientes sanos (228). Los diferentes resultados para la misma neoplasia en estudio pueden obedecer a las diferentes metodologías empleadas, ya sea con extractos o suspensiones celulares, métodos histoquímicos, evaluación de actividad fibrinolítica, detección del antígeno ó el uso de diferentes sustratos sintéticos. También es posible que exista un factor genético o poblacional étnico.

En nuestro trabajo, cuantificando la actividad enzimática por el método fluorométrico con sustratos específicos detectamos mayor actividad de catepsina B que las otras dos enzimas estudiadas. Otros autores coinciden con nosotros en que este método es muy sensible para detectar actividad de catepsina B en las neoplasias estudiadas (13, 33, 211, 215, 216). Recklies y col. encuentran que catepsina B en cáncer de mama es mejor marcador, ya que no encuentran diferencia significativa en la elevación de AP y colagenasa (24).

La participación de las proteasas en el fenotipo invasor está ampliamente estudiado, quedando constatado en el presente trabajo y otros del mismo grupo. Como toda expresión enzimática debe estar regulada genéticamente en este trabajo se buscó la posible correlación de estas enzimas con actividad de genes involucrados en el fenómeno de invasión y metástasis entre ellos los genes H-ras y nm23.

En nuestro estudio inmunohistoquímico de p21^{H-ras}

encontramos la señal positiva en el 100% de los tejidos con cáncer y cérvix normal, pero únicamente el 40% de los casos en todas las etapas clínicas tuvieron mayor expresión que los controles, sin correlación con estadio clínico ni con sobrevida; el anticuerpo que utilizamos va dirigido contra el epitopo comprendido entre los aminoácidos 54 y 188, por lo que detectamos proteína p21^{H-ras} mutada y silvestre. Lee no encuentra diferencia significativa entre las etapas clínicas y la expresión de H-ras, por lo que no lo considera útil como factor pronóstico independiente, concordando con nuestros resultados (229). Hayashi reporta un 12% de casos positivos usando un anticuerpo PAN ras (detecta los tres miembros oncogénicos de la familia ras), este porcentaje de casos positivos sí correlacionó con metástasis a ganglios linfáticos (230). Sagae reporta un 52% de sobreexpresión, también usó un anticuerpo PAN ras y sugiere a p21Ras como un marcador pronóstico, pero su correlación fue dependiente del tipo histológico y encuentra que mayor número de tejidos tipo keratinizante (K) y de células grandes no keratinizante (LNK) en etapa III sobreexpresan la proteína p21Ras con un pronóstico desfavorable en comparación a los tejidos negativos para p21Ras. En cambio tejidos con tipo histológico de células pequeñas (S) el mayor porcentaje de sobreexpresión es para la etapa I, sugiriendo que en este tipo histológico la proteína p21Ras puede no estar asociada con la etapa tardía de la progresión del tumor y metástasis (97). A nivel de transcrito de una forma semicuantitativa no encontramos sobreexpresión por

hibridación *in situ*, coincidiendo con los hallazgos de Iwasaka por Northern blot (96), pero en desacuerdo con Shirasawa en líneas celulares de carcinoma cervical (231).

El papel del gen nm23 en cáncer cérvico uterino hasta el momento es controversial, en nuestro trabajo encontramos que el 40% de los tejidos con cáncer cervical fueron inmunoreactivos a la proteína. El análisis de sobrevida mediante curvas de Kaplan y Meier nos indica que la presencia o no de la proteína es independiente de la sobrevida de los pacientes. Estos resultados apoyan el trabajo de Mandai para el mismo tipo histológico que nosotros estudiamos (carcinoma epidermoide), él encuentra un 36% de los tejidos inmunoreactivos a la proteína y también sin correlación con sobrevida; no así en adenocarcinoma en donde sí hay correlación con el pronóstico (156).

A nivel de transcrito observamos una tendencia hacia la disminución en relación inversa a la etapa clínica, a pesar de que el análisis de sobrevida no nos dá significancia estadística, este comportamiento deberá estudiarse en un lapso más prolongado como son los estudios de Liotta que hace un corte a los 10 años (6) y con un tamaño de muestra mayor. Lo que probablemente sucede es que la ausencia del transcrito en etapas clínicas tardías sea parte de la evolución de la neoplasia, pero únicamente en un grupo de esta neoplasia (el que no expresa la proteína NM23). En estos últimos casos y en los que hay transcrito como se observa en etapas I y II, pero no existe la proteína, pudiera existir una desregulación a nivel transcripcional. Mandai en cáncer de ovario encuentra una relación parecida a la de

nosotros en etapas I y II hay un incremento del transcrito, una disminución en etapa III semejante a los tumores benignos y en la IV ya existe una disminución significativa (156). Otro artículo en CaCu es el de Marone y col.; ellos valoraron proteína Ras por Western Blot, transcrito nm23 por Northern Blot y no encontraron relación de la expresión de proteína Ras con la etapa clínica, ni con metástasis a ganglios, coincidiendo con nuestros resultados inmunohistoquímicos; también encontraron que pacientes con niveles altos del transcrito nm23 muestran una baja incidencia de metástasis a ganglios linfáticos. O sea, tanto para ellos como para nosotros el transcrito da información de la evolución de la neoplasia, pero a diferencia de ellos la expresión de p21^{H-ras} en nuestros resultados es parte importante de la relación con la proteína nm23 como comentaremos a continuación (155). En nuestro análisis por Grupos, encontramos en la misma neoplasia y el mismo tipo histológico una variedad de comportamientos de acuerdo a la actividad de catepsina B, presencia de p21^{H-ras} y de NM23. El primero de ellos que llamó nuestra atención fue el Grupo 1; en este caso p21^{H-ras} está incrementada con respecto al normal y no existe una actividad muy elevada de catepsina B, correspondiendo en su mayoría a etapas avanzadas; además este grupo es positivo a la proteína NM23. La explicación puede ser que p21^{H-ras} en estos casos pudiera actuar como inhibidor de catepsina B, como sugieren los trabajos publicados por Hiwasa, quien reporta una homología del 61% con los inhibidores de proteasas de cisteína como son cistatinas y quininógenos (232, 233). Para el

gen ras, esta región es altamente conservada y existen trabajos que apoyan que es la región indispensable para la actividad transformante (234). Además, Hiwasa (235) demuestra que H-ras puede formar un complejo altamente afín con catepsina B. Probablemente en este 20% de muestras que corresponden al Grupo 1, existe el mecanismo de regulación negativo de p21^{H-ras} sobre catepsina B, propuesto por Hiwasa y en el resto pueden estar involucrados otros mecanismos. Otro trabajo que apoya lo anterior es el de Lah y col. quienes transfectaron líneas celulares de cáncer de mama humano con H-ras y encontraron niveles menores de catepsina B intracelularmente con respecto a las células parentales; sin embargo en el medio externo encontraron lo contrario (236); de acuerdo a lo anterior, p21^{H-ras} podría estar inhibiendo la actividad de catepsina B y la catepsina B que pudiera ser excretada tendría una vida media más larga como lo sugieren otros autores. El Grupo 1 es inmunoreactivo a la proteína NM23, guardando una relación directa con p21^{H-ras} (Figura 17), sugiriendo una vía de actividad común para ambas proteínas; Liotta y col. propusieron que NM23, como nucleósido difosfato cinasa pudiera mediar la activación de proteínas G vía la transferencia de un fosfato de alta energía (GTP) a un receptor, incluyendo p21^{H-ras} que se activa intercambiando GDP por GTP. También sugieren que nm23/NDPK puede funcionar como un oncogén o como un gen supresor, dependiendo si está normal, alterado, ó en qué señal de traducción esté involucrado (115), existen varios trabajos más que apoyan este punto (112, 126, 128, 237). En este caso (Grupo

1), NM23 estaría actuando como oncogén en una etapa tardía de la neoplasia. Este Grupo 1, coincide en parte con el hallazgo de Lacombe quien procesó un sólo caso de carcinoma epidermoide y su resultado fue una gran actividad de esta enzima e inmunorreacción contra NDPK A/nm23-H1; además la paciente tenía metástasis a ganglios linfáticos, sugiriendo una etapa avanzada de cáncer cervical (148). En otro Grupo (Grupo 2), p21^{H-ras} se expresa en niveles semejantes a los controles por lo que no inhibiría a catepsina B que puede actuar libremente degradando matriz extracelular directa o indirectamente, en estadíos tempranos de la neoplasia. Los tejidos son inmunoreactivos a NM23 y también NM23 se expresa en relación directa con p21^{H-ras} pero ambas en niveles bajos (Grupo 2), sugiriendo una etapa anterior al Grupo 1 y como se observa las etapas clínicas son I, II y III. En cambio cuando no existe proteína NM23, no encontramos alguna asociación con los niveles de la proteína ras; quizá sean otros genes, además de la expresión defectuosa de NM23, los involucrados en el fenotipo de este grupo de pacientes (Grupo 3). En este gran grupo NM23 negativo catepsina B sí guarda una relación directa con la evolución clínica, coincidiendo con lo reportado en la literatura, entre mayor es la actividad de catepsina B, la etapa clínica es avanzada y viceversa. Quizá la actividad de catepsina B en este grupo no está bajo el control de los mismos mecanismos que el grupo NM23 positivo.

Esto trae consigo que la hipótesis propuesta por Steeg sea diferente en tejido cervical y que la ausencia del transcrito

nm23 en etapas avanzadas sea parte de la progresión de la neoplasia (etapas III y IV).

Se ha tratado de correlacionar al gen H-ras con la actividad de proteasas; por ejemplo Sloana sugiere que la capacidad de ras oncogénico para incrementar la actividad de catepsina B puede ser secundaria a otras alteraciones genéticas en la célula (238); esto apoya en parte nuestros resultados, ya que una de estas alteraciones genéticas podría ser la expresión alterada de NM23.

En cuanto a colagenasa, enzima estrechamente involucrada con invasividad (6, 64, 72), su actividad tiende a guardar una relación inversa con la proteína NM23; probablemente NM23 también esté involucrado en dicho fenómeno. Apoyando estos resultados está el trabajo Charpin y col quienes encontraron una relación inversa entre catepsina D, tenacina y angiogénesis con nm23, sugirieron que nm23 puede interaccionar sobre células neoplásicas y estroma tumoral bloqueando la síntesis de proteasas y angiogénesis (133). Jiang y col. demuestran que el ácido linolénico gamma (GLA) incrementa la expresión de nm23 probablemente asociada a una reducción en la invasividad de estas células *in vitro* (239). En cambio Holm en carcinoma medular de la glándula tiroides, no encontró relación entre la expresión de nm23 y cambios en la actividad de catepsina D (240). Y Jang en células tumorales murinas sometidas a hipoxia en un medio con pH bajo y escasés de glucosa (condiciones que ya han sido reportadas inducen a las células tumorales a metastatizar), no encontró asociación entre la expresión del gen nm23, catepsina B y

colagenasas I y IX (241).

De acuerdo a nuestros resultados, activadores de plasminógeno no guardan relación con la expresión de alguno de los dos genes estudiados y tampoco con alguno de los parámetros clínicos. Coincidimos con los resultados de Songun y col. en cáncer gástrico, quienes no encontraron relación entre esta proteasa y NM23 (242). Queda abierta la pregunta de por qué los tejidos sin cáncer tienen mayor actividad de activadores de plasminógeno que los tejidos neoplásicos.

Revisando la historia clínica de las pacientes encontramos que aquellas que iniciaron su vida sexual antes de los 20 años, la mayoría (92%) no son inmunorreactivas a la proteína NM23 y quienes la iniciaron después o a los 20 años (75%) son inmunoreactivas positivas a la proteína. No tenemos una explicación al respecto, pudiera ser que estas personas al iniciar su vida sexual a edad temprana tienen un riesgo mayor a infecciones como es al virus del Papiloma Humano y de alguna manera indirecta se inhiba la traducción de la proteína NM23.

Nuestros resultados contradicen la hipótesis con respecto al posible papel del gen nm23 como supresor de progresión (de invasión y metástasis) en esta neoplasia. Posiblemente tenga una función importante como NDPK y/o como una proteína intermediaria en la traducción de señales y dependiendo de la señal recibida será activado uno de sus varios sitios de fosforilación ó ella fosforile a otras proteínas y como consecuencia será la respuesta celular.

Este trabajo explica en parte por qué tanta

controversia en los artículos publicados inclusive en el mismo modelo de estudio. Los datos concuerdan con la idea que la progresión maligna es la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y la valoración de estos tres parámetros catepsina B, NM23 y p21^{H-ras} son parte de la evolución clínica de esta neoplasia, ya que sus etapas clínicas y pronóstico desde hace años están bien definidas. Quizá en otras neoplasias la determinación de estas tres variables ayuden a establecer el pronóstico.

CONCLUSIONES

1. La actividad de catepsina B es mayor en tejidos neoplásicos comparada con tejidos sin cáncer. Los resultados sugieren una relación directa con la progresión del cáncer cérvico uterino únicamente en el grupo negativo a la proteína NM23.
2. La actividad de colagenasa es mayor en tejidos neoplásicos que en tejidos sin cáncer, aunque no guarda una relación directa con la evolución clínica del CaCu.
3. La actividad de activadores de plasminógeno por este método, no nos deja claro su participación en el proceso de invasión. No encontramos relación de esta enzima con las variables estudiadas.
4. No existe relación entre los parámetros clínicos en estudio (etapa clínica, edad, tipo histológico, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales y sobrevida a 30 meses de seguimiento post radiación) y la expresión de la proteína p21^{H-ras}.
5. La sobrevida de las pacientes a 30 meses de seguimiento post radiación es independiente de la expresión de la proteína NM23. Esta proteína no está relacionada con etapa clínica, edad, tipo histológico y número de parejas sexuales.
6. La asociación entre el inicio temprano de vida sexual activa y

la ausencia de la proteína NM23 sugiere que existe una relación entre esta última y el virus del Papiloma Humano. Sería interesante investigar si alguno de los genes virales regulan negativamente la expresión de la proteína NM23.

7. La ausencia del transcrito nm23 en algunos casos, probablemente sea un evento tardío en la carcinogénesis del cáncer cérvico uterino.

8. En el 60% de los casos NM23 positivos existe una relación lineal entre las proteínas NM23 y p21^{H-ras}, lo que sugiere participan en una vía común.

9. Es probable que la proteína NM23 tenga alguna interacción indirecta con la actividad de catepsina B.

10. En las neoplasias en las cuales la evolución de la misma no esté bien definida, pudiera ser de utilidad pronóstica la valoración de las proteínas NM23, p21^{H-ras} y catepsina B.

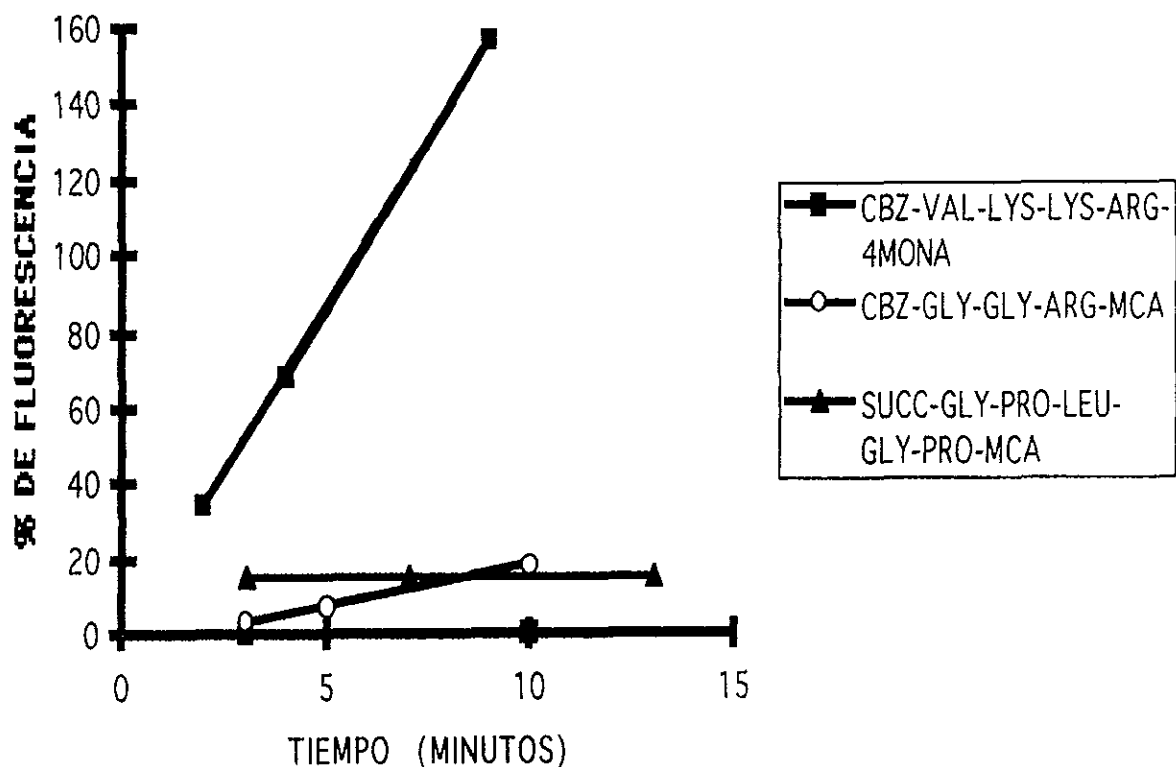
CUADRO 1. Etapa clínica y diagnóstico histopatológico de las muestras de tejido cervical.

	I	II	III	IV	CONDILOMA	CONTROL	TOTAL
n	4	7	6	8	11	10	46
HISTOLOGIA:							
CEMD	2	4	4	4			14
CEPD	2	3	2	4			11
CONDILOMA					11		11
TEJIDO NORMAL EXOCERVIX.						10	10

RANGO DE EDAD	49-65	36-70	38-71	26-73	22-50	35-53
(AÑOS)						
MEDIA	57	53	54.5	49.5	36	44

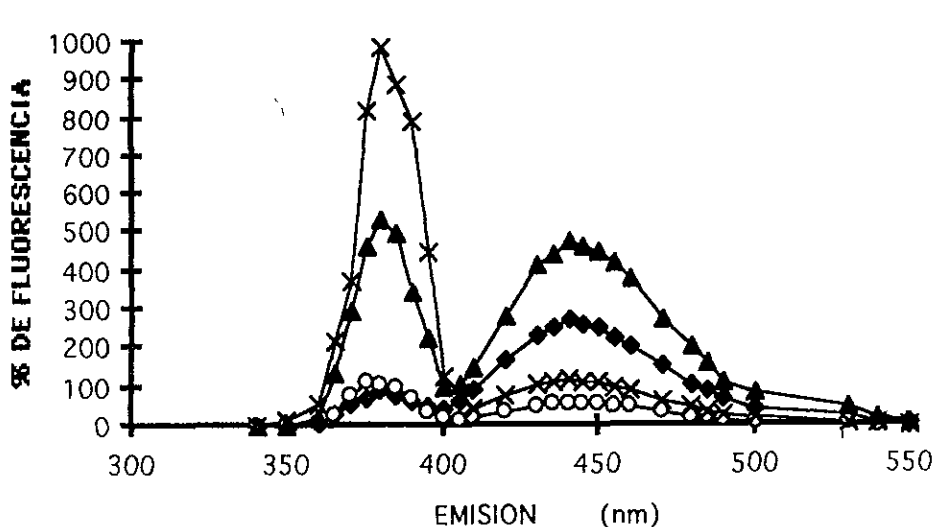
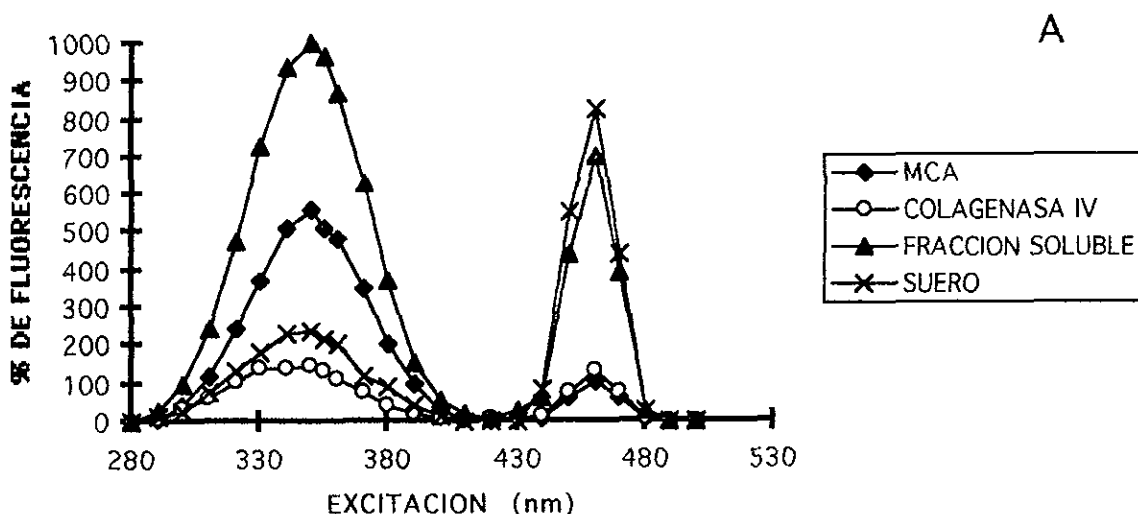
n: número de pacientes ó número de controles según corresponda; CEMD: Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado; CEPD: Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado.

FIGURA 1. Especificidad en la determinación de catepsina B.



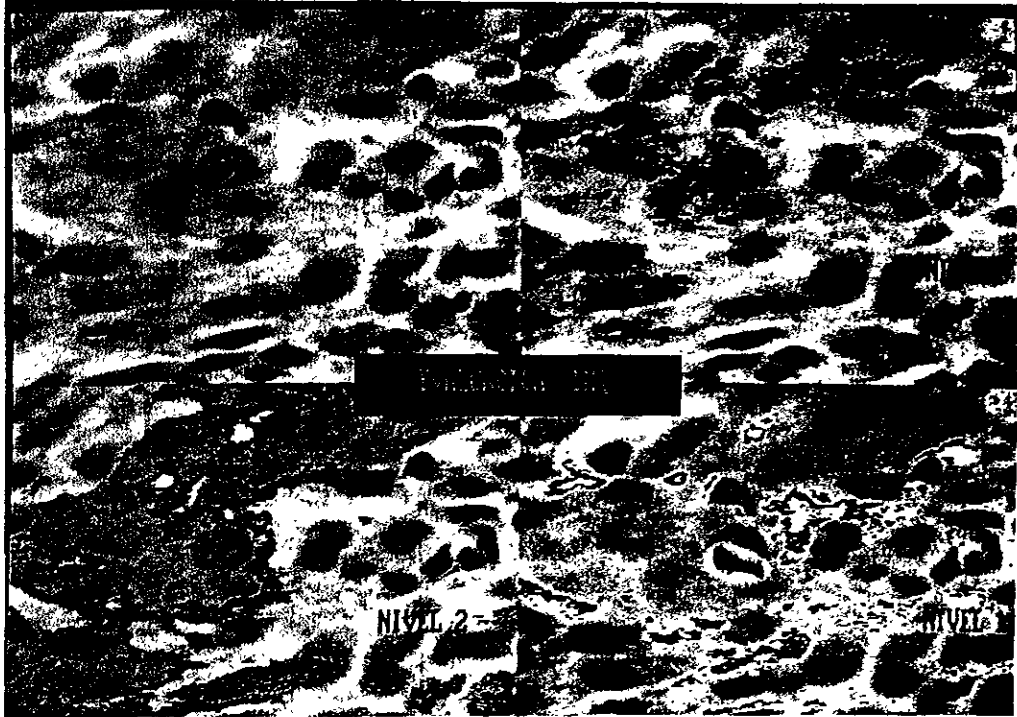
Se escindió con catepsina B de bazo bovino, la molécula marcadora (MCA ó 4MONA) de los tres sustratos trabajados en las determinaciones enzimáticas. Destaca la especificidad de catepsina B para el sustrato CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4MONA.

FIGURA 2. Control de los espectros de excitación y emisión del producto liberado metilcumarina (MCA) en la determinación de las actividades de colagenasa y activadores de plasminógeno.



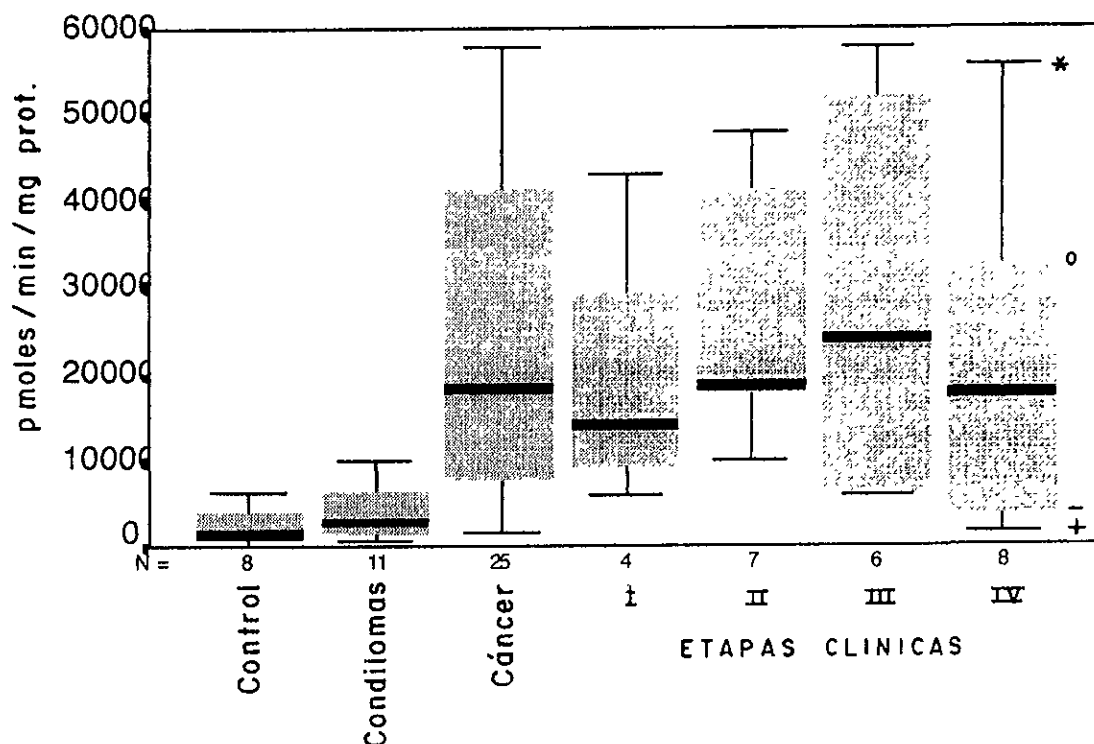
Espectros de excitación (A) y emisión (B) del producto metilcumarina, liberado al poner las diferentes fuentes de colagenasa (colagenasa tipo IV de *Clostridium histolyticum*, fracción soluble de tejido de cérvix invasor y suero de una paciente con carcinoma cérvico uterino) con el sustrato SUCC-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA.

FIGURA 3. Evaluación inmunohistoquímica de las proteínas NM23 y p21^{H-ras} por medio de Análisis de Imágenes.



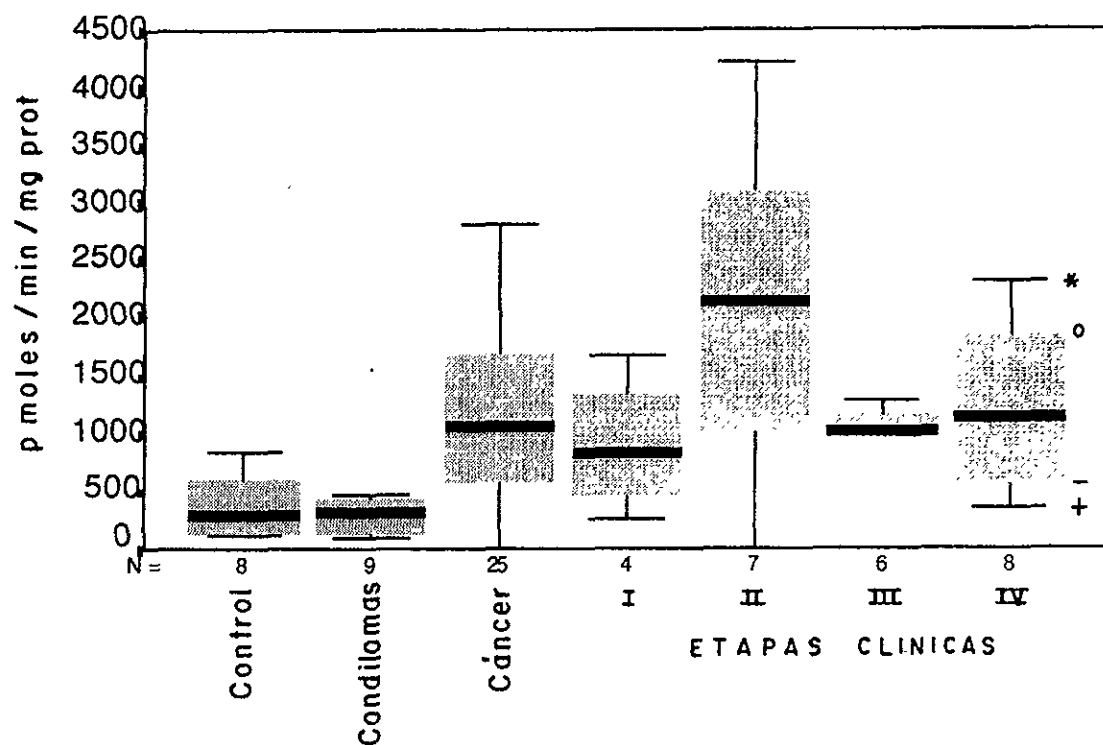
La tinción café es señal positiva en la detección de cualquiera de las proteínas en estudio por la técnica inmunohistoquímica revelada con peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Se detectaron tres niveles de acuerdo a la intensidad de la reacción: nivel 3 (señal intensa), nivel 2 (señal media) y nivel 1 (señal débil). La técnica seleccionada fue la de RGB (reed, green, blue) para el análisis de imágenes. En A) el corte histológico sin área seleccionada; en B), C) y D) el área seleccionada corresponde al nivel indicado en cada cuadrante (400X). Los resultados para cada una de las proteínas mencionadas se muestran en las figuras 9 y 12. Ver material y métodos.

FIGURA 4. Actividad de catepsina B en tejido cervical.



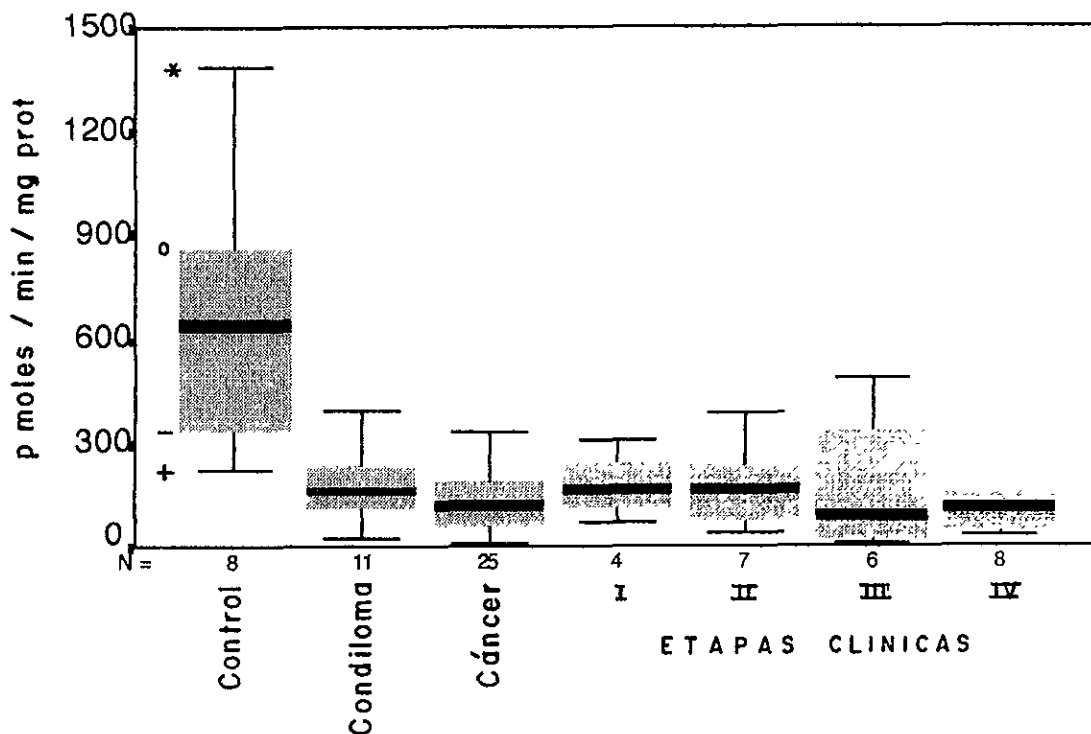
La fracción soluble de cada uno de los tejidos de cérvix fueron procesados por duplicado con el sustrato CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4MONA. La mediana para cada uno de los grupos fue la siguiente: grupo control = 1500; grupo con condiloma = 2800; grupo en etapa I = 14 200; grupo en etapa II = 18 650; grupo en etapa III = 24 450; grupo en etapa IV = 17 900. Se indica el valor más alto (*) y el más bajo (+), además de los percentiles 75 (°) y 25 (-).

FIGURA 5. Actividad de colagenasa en tejido cervical.



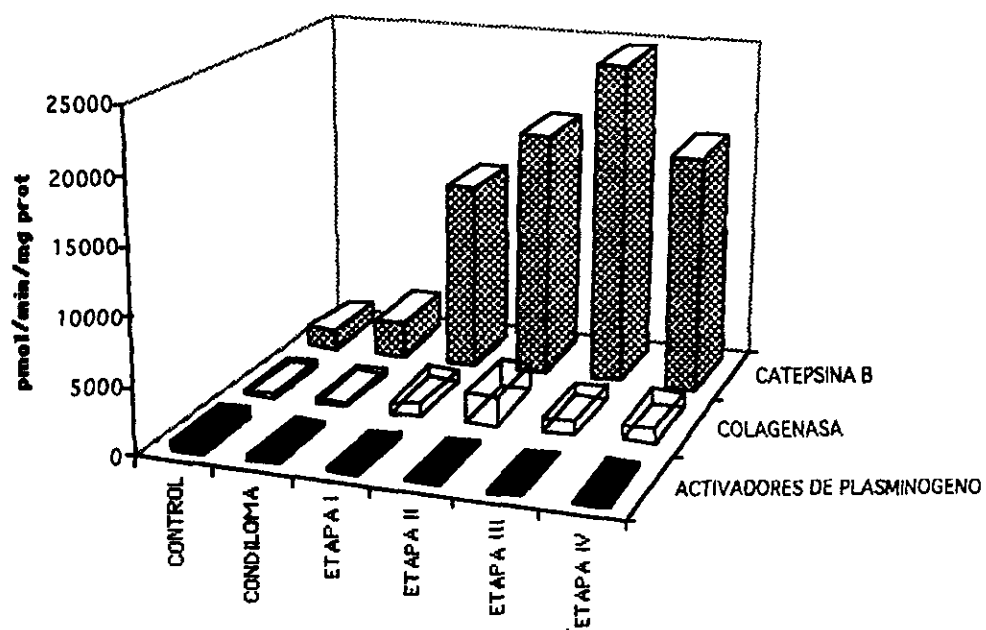
La fracción soluble de cada uno de los tejidos de cérvix fueron procesados por duplicado con el sustrato Succ-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA. La mediana para cada uno de los grupos fue la siguiente: grupo control = 303; grupo con condiloma = 316; grupo en etapa I = 839; grupo en etapa II = 2130; grupo en etapa III = 1017; grupo en etapa IV = 1130. Se indica el valor más alto (*) y el más bajo (+), además de los percentiles 75 (°) y 25 (-).

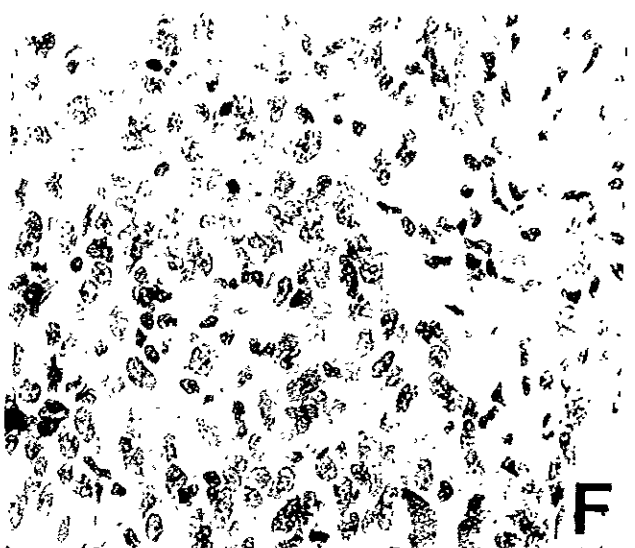
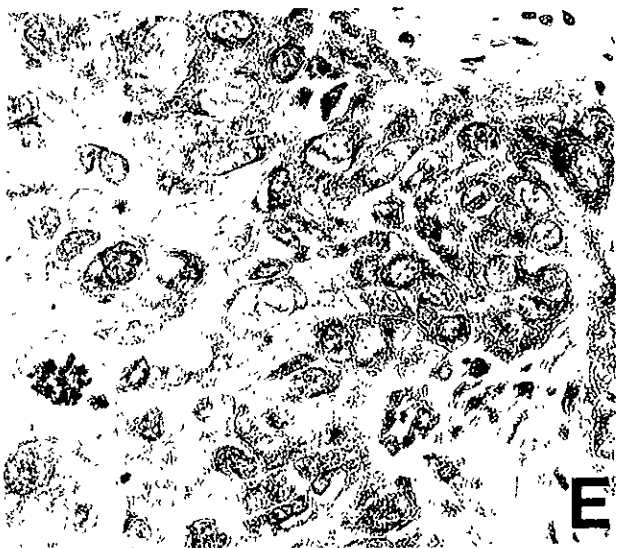
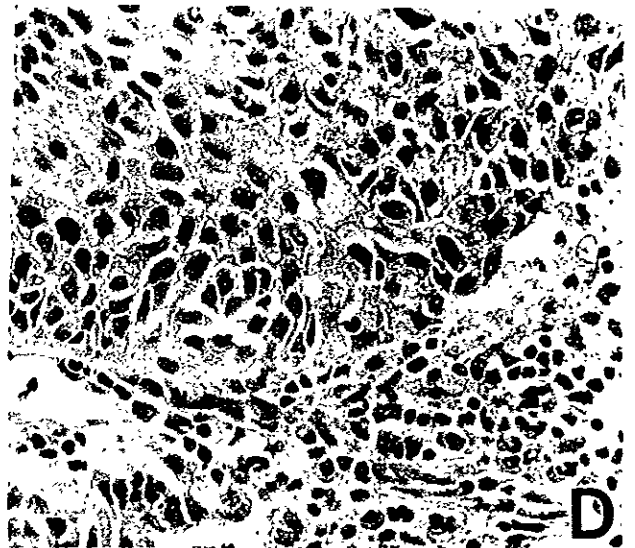
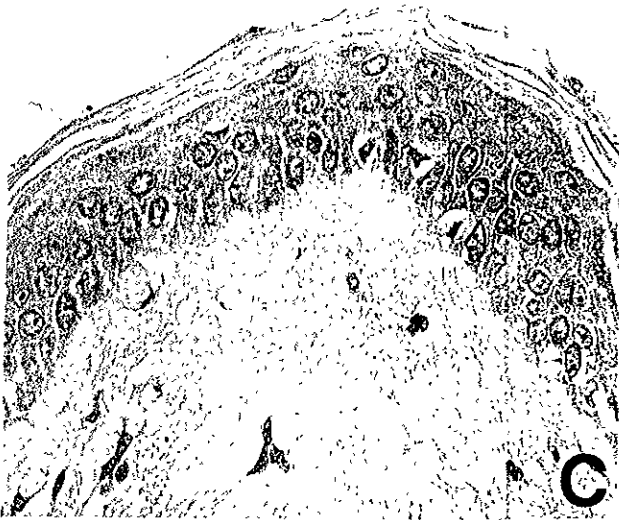
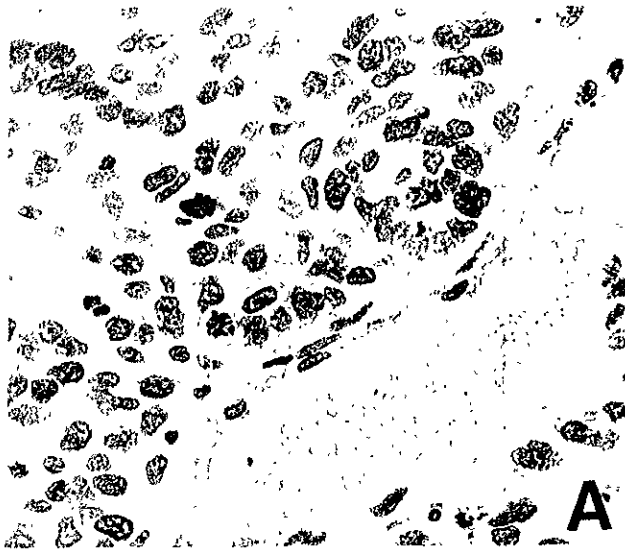
FIGURA 6. Actividad de activadores de plasminógeno.

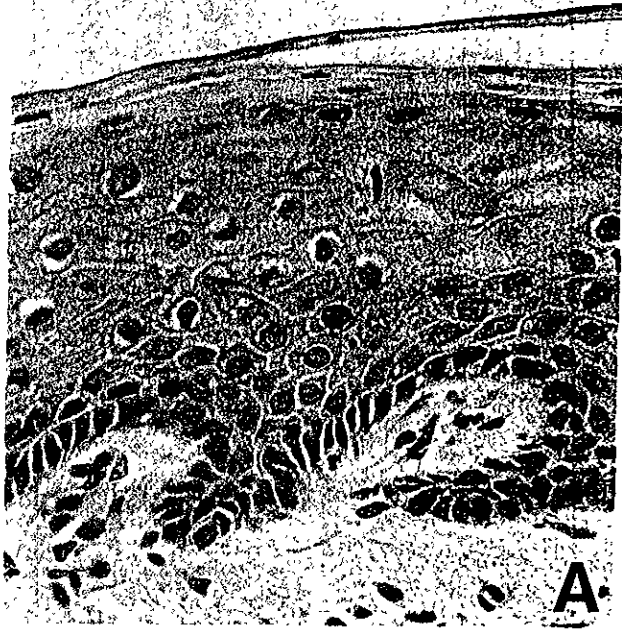


La fracción soluble de cada uno de los tejidos de cérvix fueron procesados por duplicado con el sustrato CBZ-Gly-Gly-Arg-MCA. La mediana para cada grupo fue la siguiente: grupo control = 638; grupo con condiloma = 167; grupo en etapa I 169; grupo en etapa II; 171; grupo en etapa III = 95; grupo en etapa IV = 111. Se indican el valor más alto (*), el más bajo (†), el percentil 75 (°) y el percentil 25 (-).

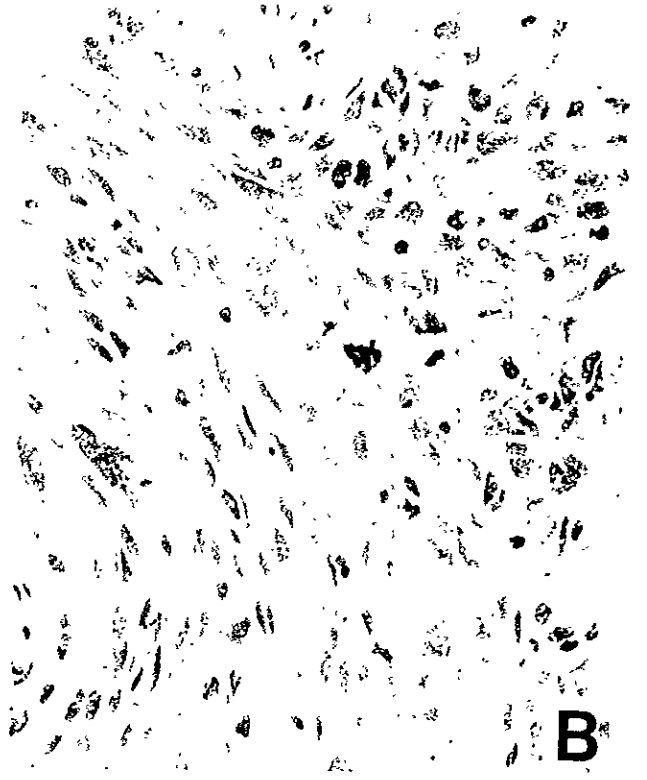
FIGURA 7. Actividad proteolítica de las tres enzimas estudiadas en tejido cervical.



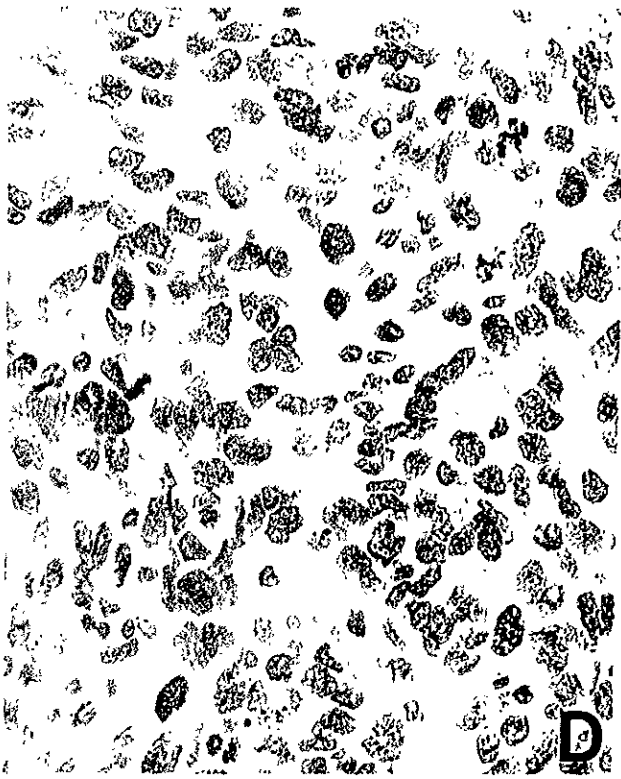




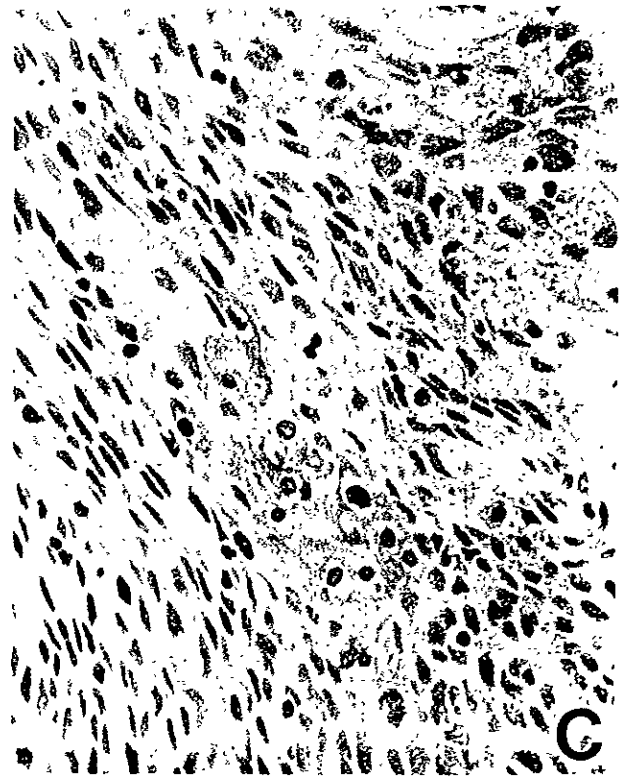
A



B

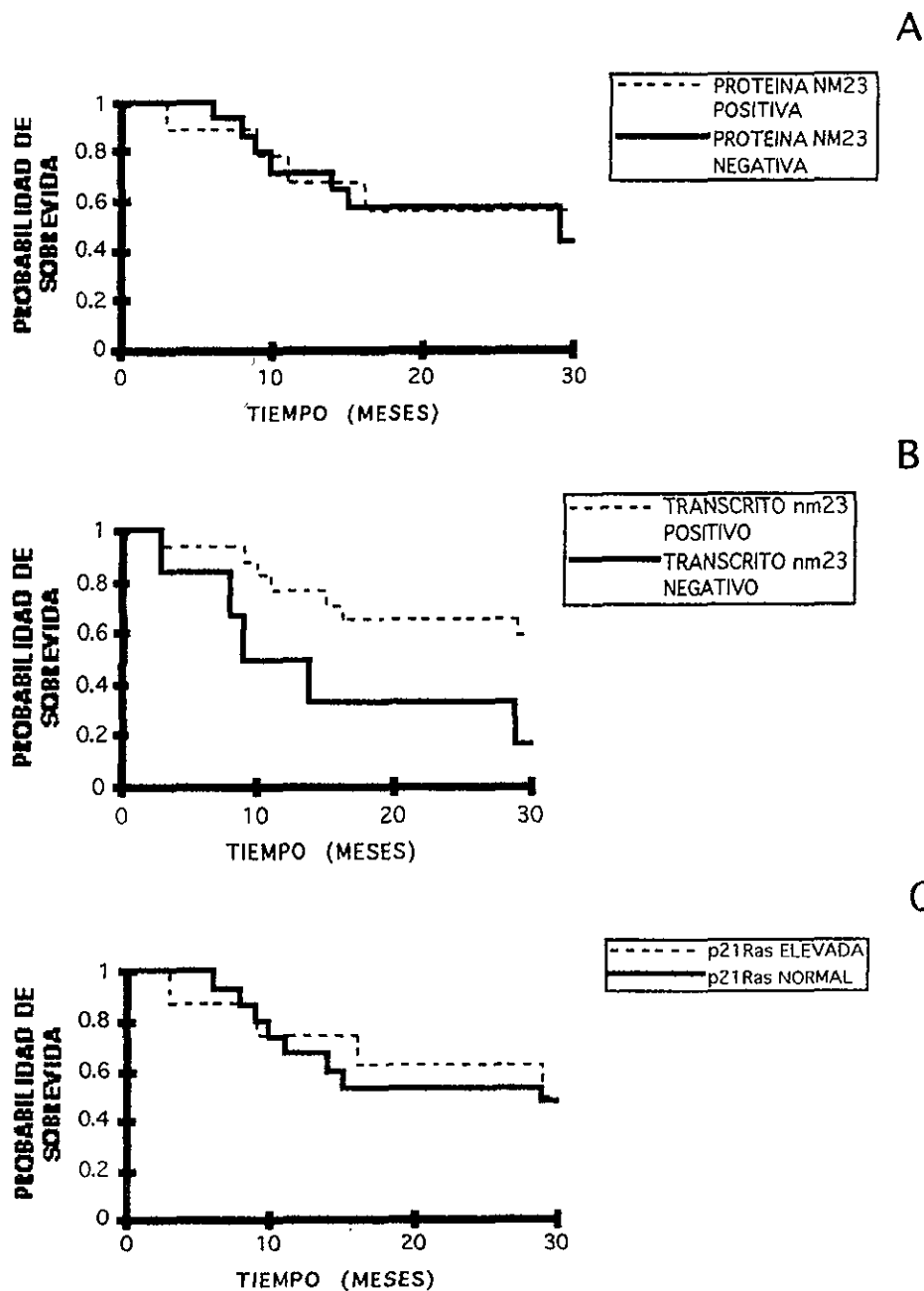


D



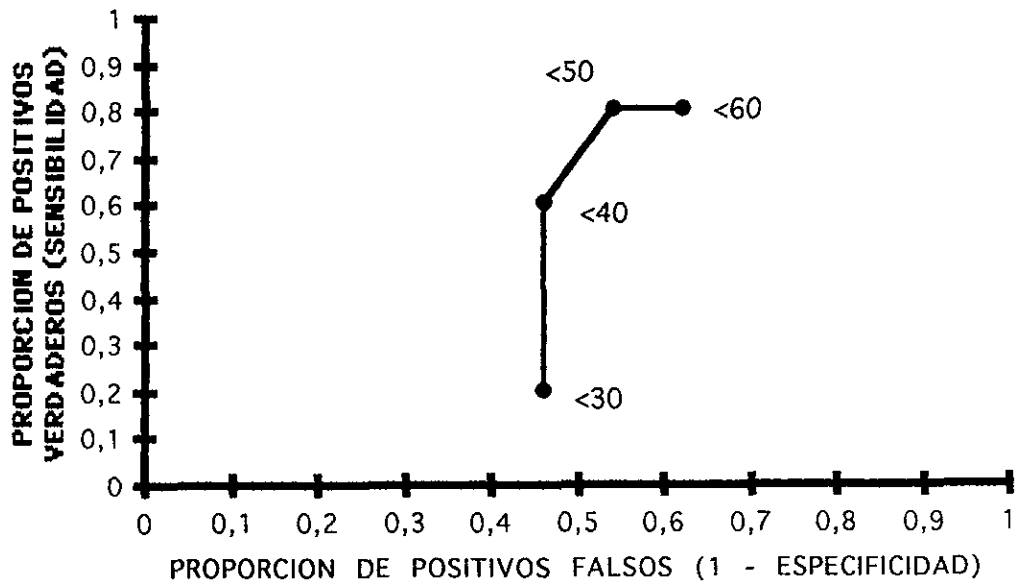
C

FIGURA 10. Curvas de sobrevida de los pacientes con cáncer cérvico uterino.



A) Sobrevida de las pacientes con cáncer cérvico uterino y la presencia de la proteína NM23 ($p = 0.6688$; "Log Rank Test"); B) sobrevida de las pacientes y la expresión del transcrito nm23 ($p = 0.0689$; "Log Rank Test"); C) sobrevida de las pacientes con cáncer cérvico uterino y la presencia de la proteína p²¹H-ras ($p = 0.8247$; "Log Rank Test"). Se consideró a p21Ras elevada >40 unidades y a p21Ras normal <40 unidades.

FIGURA 11. Pruebas de sensibilidad diagnóstica. Curvas ROC*.



Se analizó al grupo de pacientes NM23(+) mediante esta prueba estadística para establecer un corte (cutoff) del nivel de proteína y evaluar si por abajo de este corte el paciente tiene mal pronóstico. La gráfica muestra que este parámetro, de forma independiente no es útil, ya que, es poco sensible y la proporción de positivos falsos es alta. Los cortes probados fueron: <30, <40, <50 y <60, los valores dados en la semicuantificación de NM23 son arbitrarios, obtenidos mediante análisis de imágenes (ver metodología).

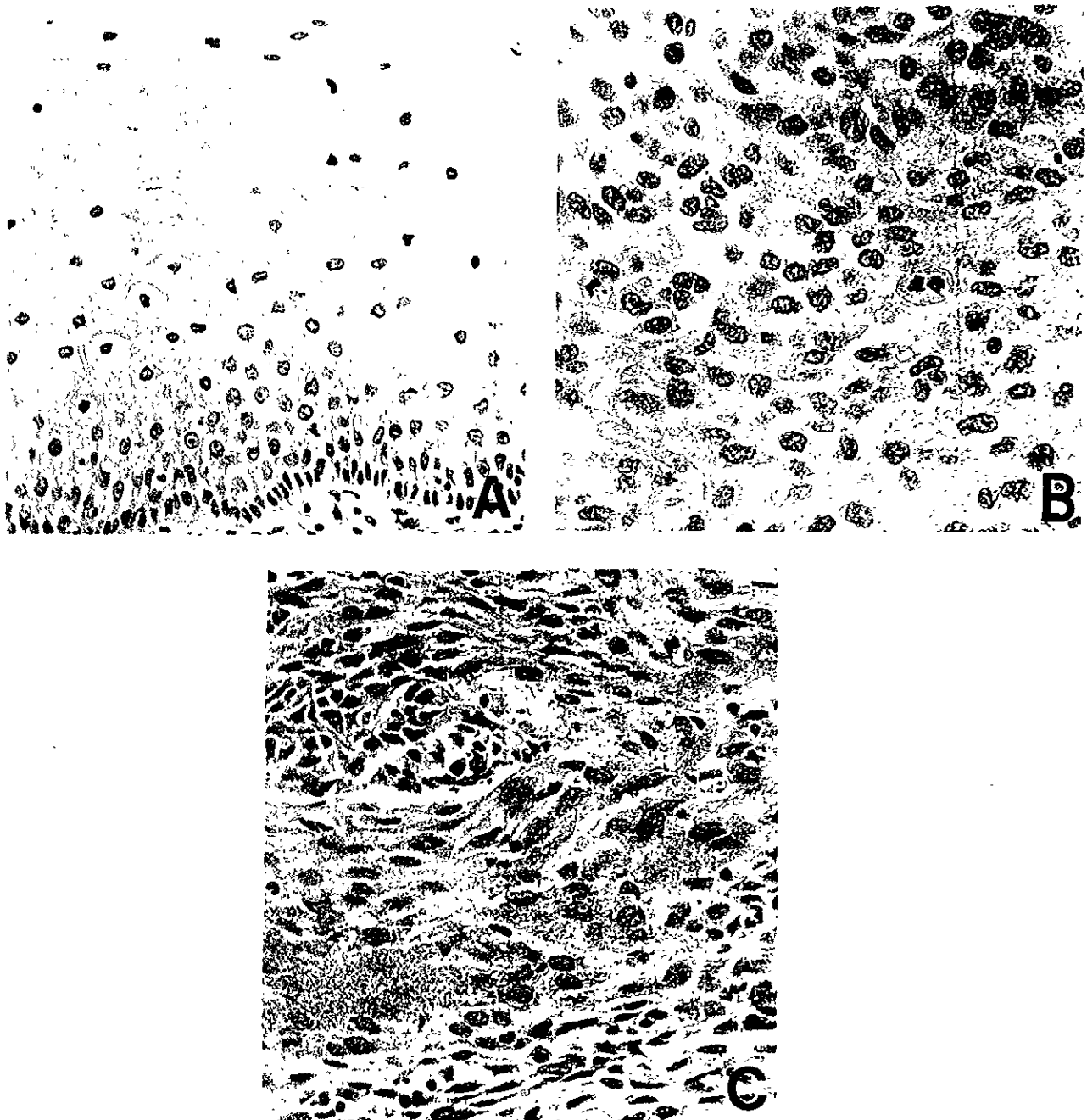
*Las curvas ROC se utilizan para evaluar pruebas diagnósticas, en ellas se grafica la proporción de positivos verdaderos (sensibilidad) contra la proporción de positivos falsos (1-especificidad) en cada corte posible para una prueba diagnóstica.

CUADRO 2. Expresión de la proteína NM23 y su relación con la edad a la cual las pacientes con cáncer cérvico uterino iniciaron su vida sexual.

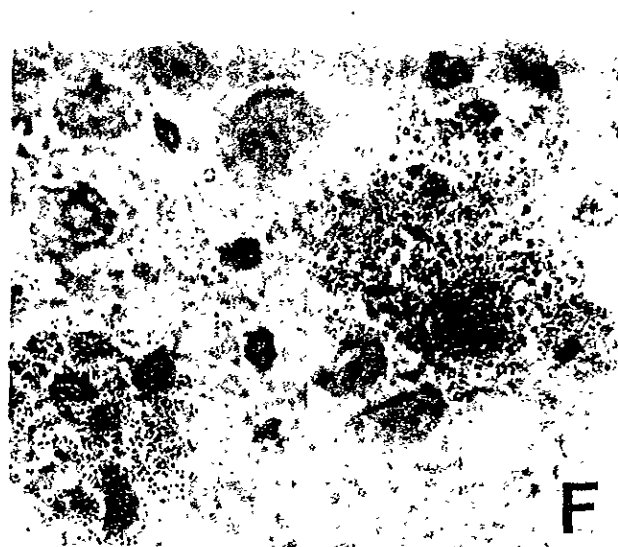
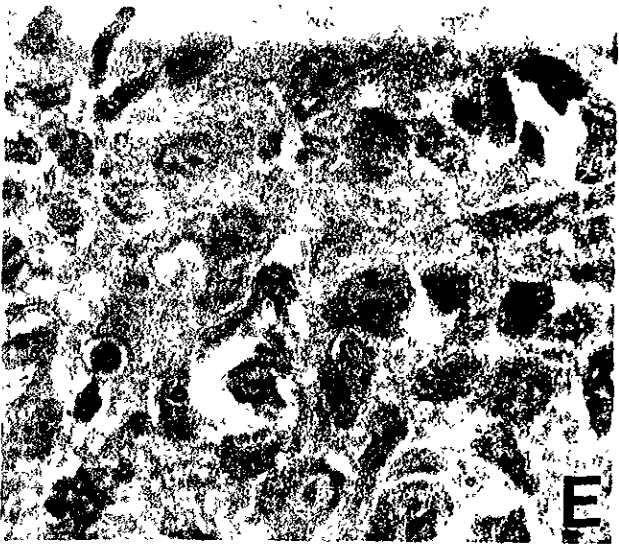
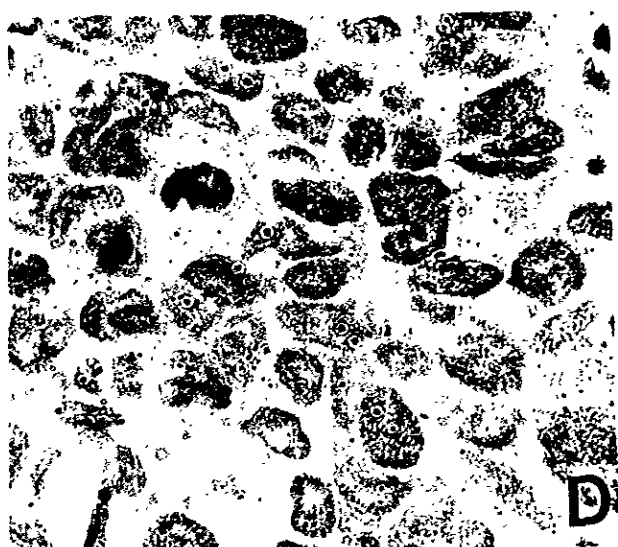
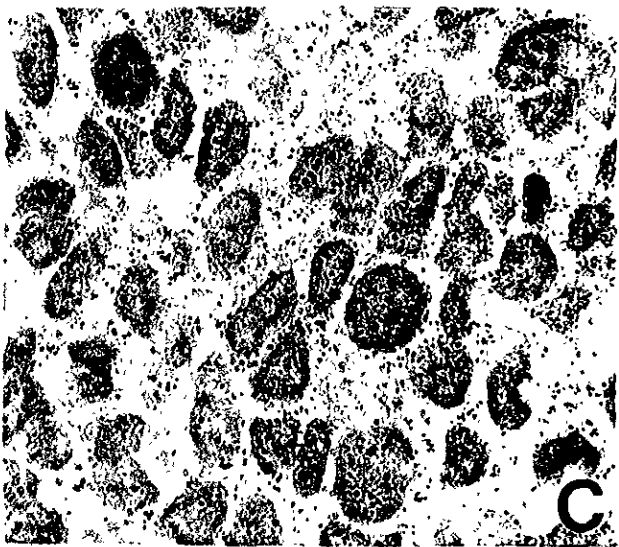
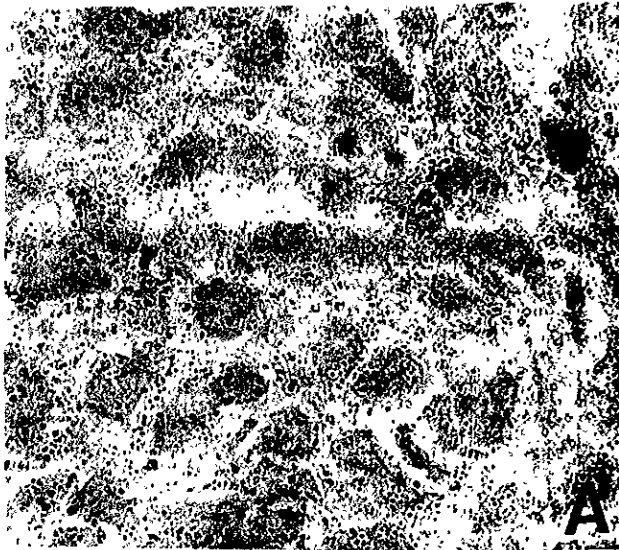
CASOS (+) PARA LA PROTEINA NM23.		CASOS (-) PARA LA PROTEINA NM23.	
No. de control	IVSA	No. de control	IVSA
26	S/D	27	S/D
31	28	36	17
2	20	29	15
15	24	3	15
12	25	4	14
14	23	9	15
18	16	20	14
21	22	17	16
30	15	24	18
34	S/D	10	15
		25	18
		19	14
		23	20
		33	S/D
		35	14

IVSA: Inicio de vida sexual activa; S/D: sin datos.

FIGURA 12. Detección de la proteína p21^{H-ras} en tejido cervical.



A) Tejido de cérvix normal, la señal es débil y citoplásmica, B) Tejido invasor positivo con señal débil citoplásmica, C) Tejido invasor positivo con una mayor expresión de la proteína que los tejidos control. Todas las fotografías fueron tomadas a 400X.



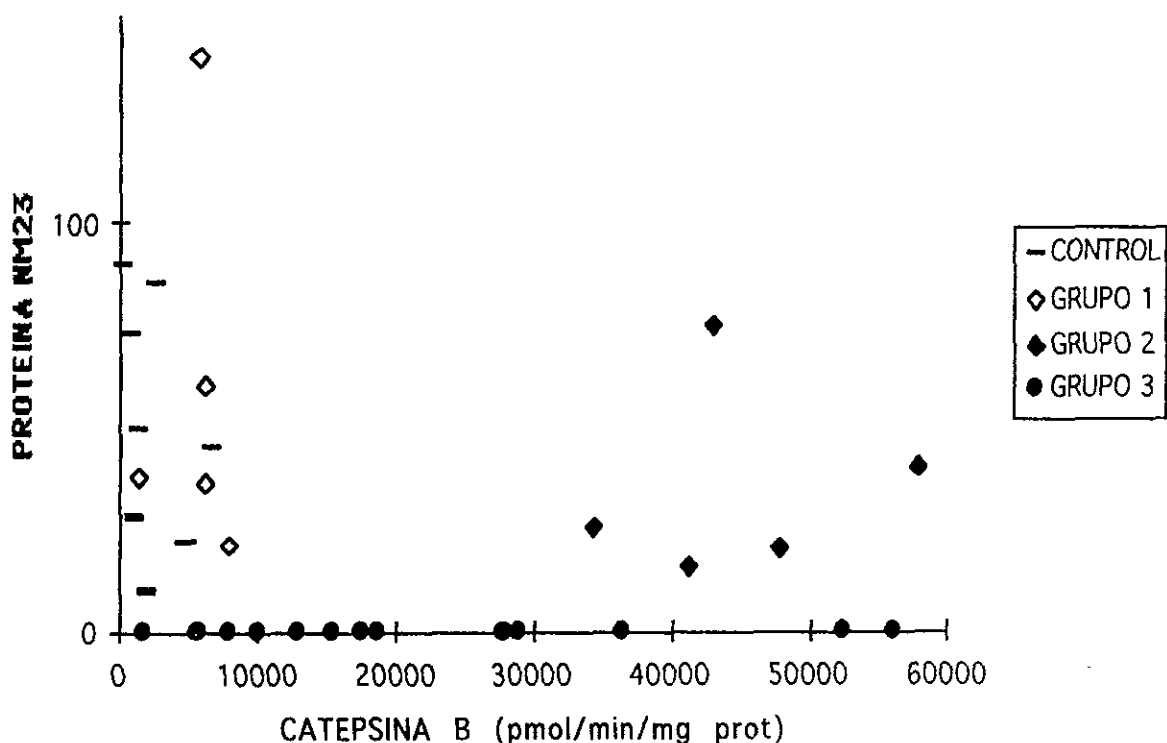
CUADRO 3. Correlación de la expresión de las proteínas NM23 y p21H-ras con el transcrito correspondiente, en tejido invasor del cérvix.

Tejido	Transcrito de nm23	Proteína NM23	Etapas clínica	Transcrito de H-ras	Proteína p21 H-ras
26	+	75	I	+	17
31	+	140	I	+	46
2	+	20	II	+	34
15	+	26	II	+	44
12	+	16	III	+	27
14	+	60	III	+	66
18	+	21	III	+	95
21	+	40	III	+	8
30	+	36	IV	+	49
34	+	38	IV	+	60
27	+	-	I	+	77
36	+	-	I	S/D	114
3	+	-	II	+	32
4	+	-	II	+	22
9	+	-	II	+	27
20	+	-	II	+	11
29	-	-	II	+	83
17	-	-	III	+	7
24	-	-	III	+	20
25	-	-	IV	+	6
10	+	-	IV	+	65
19	+	-	IV	+	39
23	-	-	IV	+	24
33	-	-	IV	+	19
35	-	-	IV	+	37

Los valores para ambas proteínas son expresados en números arbitrarios, obtenidos mediante análisis de imágenes (ver metodología).

S/D: sin determinar.

FIGURA 14. Correlación de la proteína NM23 y actividad de catepsina B.

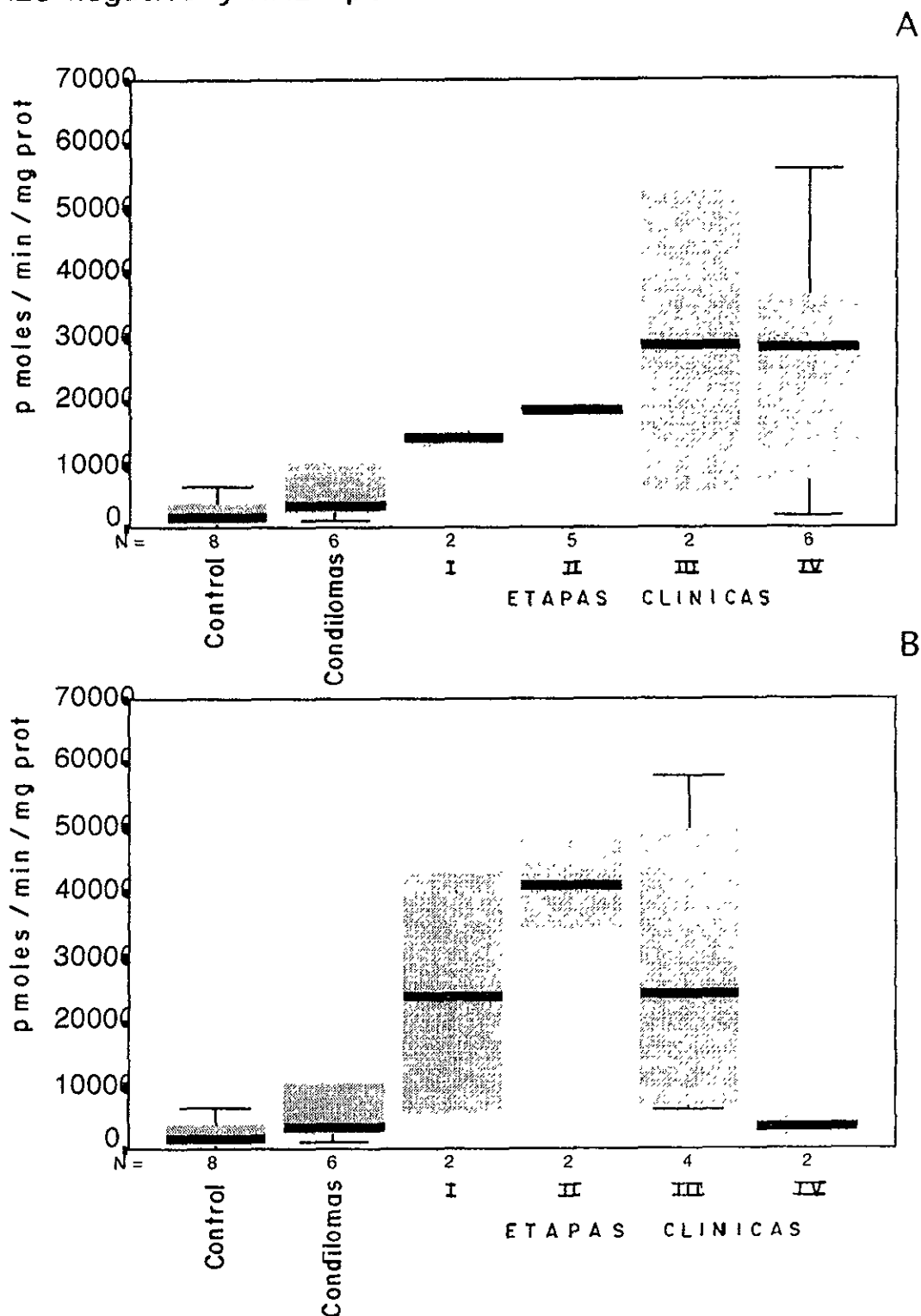


Obsérvense los tres grupos formados; Grupo 1: NM23(+), actividad de catepsina B moderada; Grupo 2: NM23(+), actividad de catepsina B muy elevada y Grupo 3: NM23(-), que incluye un rango amplio de valores de actividad para catepsina B. La proteína NM23 se expresa en valores arbitrarios (Cuadro 3) definidos en metodología. Los valores de la actividad de catepsina B se muestran en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Análisis de los grupos de pacientes con cáncer cérvico uterino: el que expresa la proteína NM23 y el que no la expresa. Los grupos 1, 2 y 3 son los establecidos en la Figura 14.

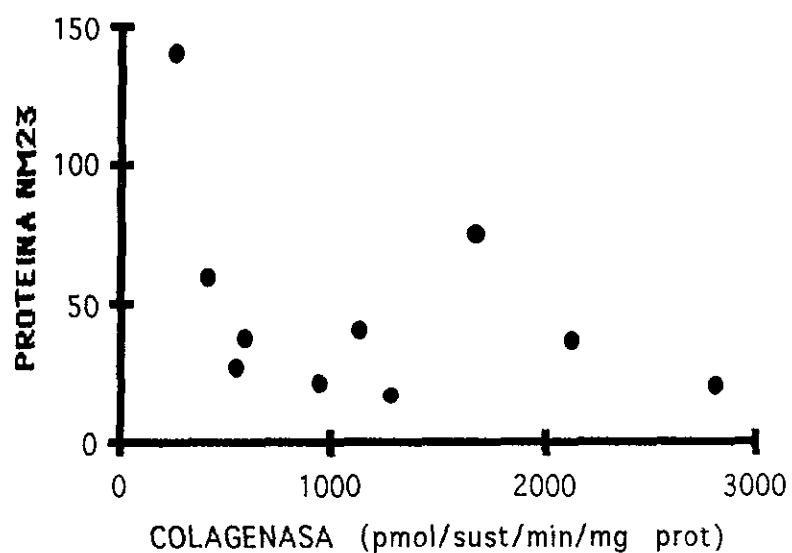
		GRUPO 1				GRUPO 2	GRUPO 3a	GRUPO 3b	GRUPO 3c
TEJIDO	ETAPA CLINICA	CATEP B	p21 H-ras	EDO. ACTUAL					
NM23(+)	31	I	5700	46	VIVA	GRUPO 1 NM23 POSITIVO CATEP B ACTIVIDAD MODERADA p21 H-ras MAYOR EXPRESION QUE EL GRUPO CONTROL EDO. ACTUAL LA MAYORIA MUERTAS	GRUPO 2 NM23 POSITIVO CATEP B ACTIVIDAD MUY ELEVADA p21 H-ras EXPRESION IGUAL AL GRUPO CONTROL EDO. ACTUAL LA MAYORIA VIVAS	GRUPO 3a NM23 NEGATIVO CATEP B ACTIVIDAD MUY ELEVADA p21 H-ras AMPLIO RANGO DE VALORES EDO. ACTUAL TODAS MUERTAS	GRUPO 3b NM23 NEGATIVO CATEP B ACTIVIDAD ELEVADA p21 H-ras AMPLIO RANGO DE VALORES EDO. ACTUAL TODAS VIVAS
	14	III	6000	66	MUERTA				
	18	III	7800	95	MUERTA				
	30	IV	6000	49	MUERTA				
	34	IV	1470	60	MUERTA				
	GRUPO 2					GRUPO 3c SEMJEANTE AL GRUPO 3a, LA BAJA ACTIVIDAD DE CATEPSINA B, ES PROBABLE SEA DEBIDA A NECROSIS, VER DISCUSION.			
	26	I	43000	17	VIVA				
	2	II	47900	34	VIVA				
	15	II	34300	44	VIVA				
	12	III	41100	27	VIVA				
	21	III	57900	8	MUERTA				
	GRUPO 3a					GRUPO 3b			
4	II B	168100	22	MUERTA					
25	IV A	56000	6	MUERTA					
24	III B	52300	20	MUERTA					
10	IV A	36400	65	MUERTA					
33	IV	28900	19	MUERTA					
35	IV A	27900	37	MUERTA					
NM23(-)	GRUPO 3b					GRUPO 3c			
	3	II B	18700	32	VIVA				
	9	II B	18600	27	VIVA				
	20	II B	17400	11	VIVA				
	27	II B	15400	77	VIVA				
	36	II B	13000	114	VIVA				
	29	II A	10000	83	VIVA				
	23	IV A	7900	24	MUERTA				
	17	III A	5700	7	MUERTA				
19	IV A	1700	39	MUERTA					
GRUPO CONTROL					GRUPO CONTROL				
1520	CONTROL	2600	12						
1531	CONTROL	5500	21						
1656	CONTROL	1000	33						
1756	CONTROL	1700	39						
1873	CONTROL	4800	2						
1892	CONTROL	1300	11						
1906	CONTROL	150	14						
1909	CONTROL	800	2						
NM23(+)									

FIGURA 15. Actividad de catepsina B en los grupos NM23 negativo y NM23 positivo.



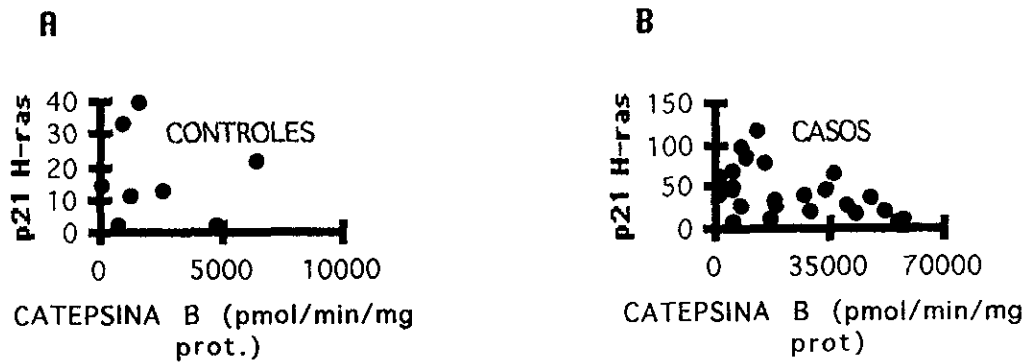
A) El grupo que no expresa proteína NM23 guarda una relación directa con la progresión de la neoplasia (coeficiente de regresión $r = 0.66$; $p < 0.05$); B) En el grupo que expresa la proteína NM23 no existe tal relación.

FIGURA 16. Correlación de la proteína NM23 y colagenasa.



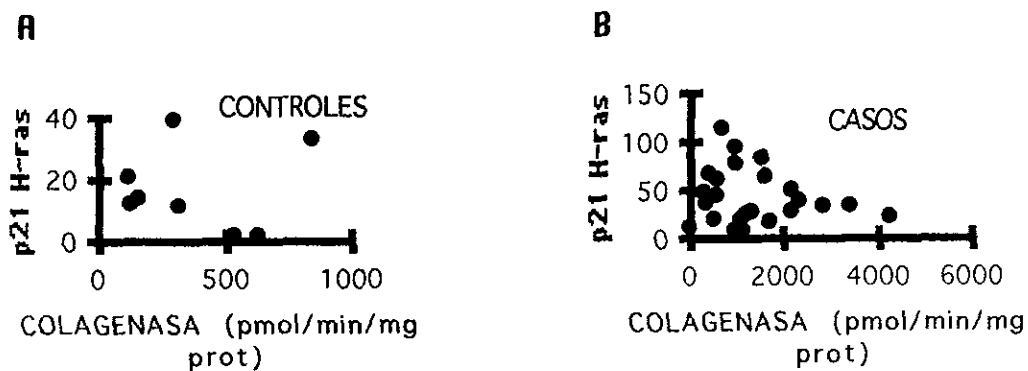
Existe una tendencia de una relación inversa entre los niveles de proteína NM23 y la actividad de colagenasa (coeficiente de regresión lineal $r = -0.4$; $p = 0.23$).

FIGURA 17. Correlación de la expresión p21^{H-ras} y actividad de catepsina B.



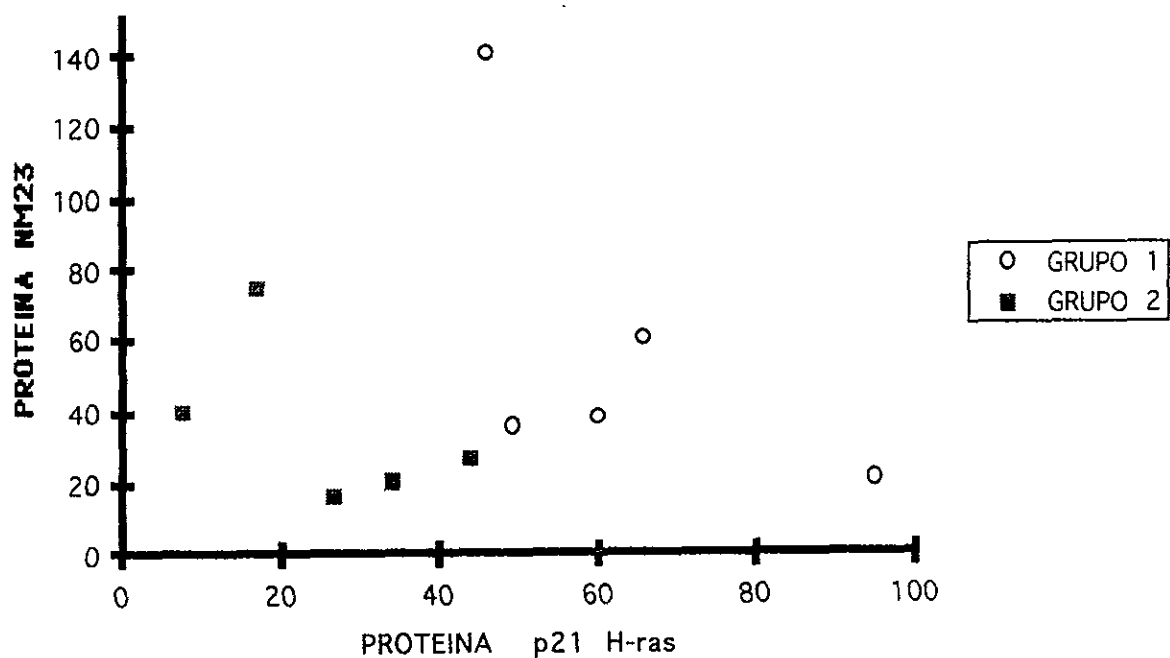
A) Actividad en muestras control (coeficiente de regresión $r = -0.1$; $p > 0.05$). B) Actividad en tejidos neoplásicos (coeficiente de regresión $r = -0.47$; $p > 0.05$).

FIGURA 18. Correlación de la expresión de p21^{H-ras} y actividad de colagenasa.



A) Actividad en muestras control (coeficiente de regresión = 0.03 ; $p > 0.05$). B) Actividad en los tejidos neoplásicos (coeficiente de regresión = -0.23 ; $p > 0.05$).

FIGURA 19. Correlación de las expresiones de las proteínas p21^{H-ras} y NM23.



De los 10 casos NM23 (+), que incluye los grupos 1 (NM23+, actividad de catepsina B moderada, p21^{H-ras} con mayor expresión que el grupo control, la mayoría de las pacientes muertas) y 2 (NM23+, actividad de catepsina B muy elevada, p21^{H-ras} igual que el grupo control, la mayoría de las pacientes vivas); el 60% de los tejidos NM23 positivos, guarda una correlación lineal (coeficiente de regresión $r=0.94$; $p<0.05$).

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Guido M and Isabelle Joris. Cells, tissues and disease. Principles of general pathology. 1992 Edited for Blackwell Science. p 795.
- 2.-Benítez B.L. y Quiñonez G. Epidemiología genética y molecular del cáncer. Rev Fac Med UNAM 1994; 37(2): 71-81
- 3.-Vogelstein B., Fearon E., Stanley B., Hamilton S., Kern S., Preisinger A., Leppert M., Nakamura Y., Whitte R., Smits A. and Bos J. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med.1988; 319: 525-532.
- 4.-Vogelstein B., Fearon E., Kern S., Hamilton S., Preisinger A., Nakamura Y. and White R. Allelotype of colorectal carcinomas. Science. 1989; 244: 207-211.
- 5.-J.Ladik and W Förner. The beginnings of cancer in the cell. Springer-Verlag BerlinHeidelberg. Printed in Germany.1994;47-81
- 6.-Liotta L. Cancer cell invasion and metastasis. Scient Amer.1992; febrero: 34-41.
- 7.-Nicolson G. Cancer metastasis. Scient. Amer. 1979; 240: 50-60
- 8.-Pnina Brodt. Cell adhesion and invasion in cancer metastasis. 1996. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- 9.-Giancotti F.g. and Mainiero F. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. BBA; 1994: 1198: 47-64.
- 10.-Ruoslahti E and Obrink B. Review. Common Principles in cell adhesion. Experimental Cell Research 1996; 227:1-11
- 11.-Sylvén B. and Malgren H. The histological distribution of proteinase and peptidase activity in solid tumor transplants. Acta Radiol. 1957. Suppl; 154:1.
- 12.-Pietras R., Szego C., Roberts J., Seeler B. Lysosomal cathepsin B-like activity: mobilization in prereplicative and neoplastic epithelial cells. J Histochem Cytochem. 1981; 29:3A:440-450
- 13.-Benítez L., Freyre R., Gallegos G., De la Huerta R., Alfaro L. Catepsina B y antiproteasas en enfermas con carcinoma cervicouterino. Arch Invest Méd. 1981;12:517.
- 14.-Barret A. In proteinases and tumor invasion, edited by Peter Sträuli et al. Raven Press. New York. 1980; 59-67.
- 15.-Benítez L., Freyre-Horta R., Villalobos M. y Pastrana L. Actividad del inhibidor de la proteinasa en sueros de pacientes con carcinoma del cuello uterino. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1987; 18: 187.
- 16.-Yavelow J., Finlay T., Kennedy A., Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. Cancer Res. 1983; (suppl) 43: 244s-2459s.
- 17.-Fong D., Chan M., Hsieh W., Menninger J and Ward D. Confirmation of cathepsin B gene (CYSB) assignment to chromosome 8. Human Genet. 1992; 89(1):10-12.
- 18.-Gong Q., Chan S., Bajkowski A., Steiner D. and Frankfater A. Characterization of cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. DNA and Cell Biology.1993;12(4):299-309.
- 19.-Mort J. and Buttle D. Molecules in focus. Cathepsin B. Int. J. Biochem Cell Biol. 1997; 29: 715-720.
- 20.-Orozco E., Benítez L., Hernández R. Invasion and metastasis mechanisms in Entamoeba histolytica and cancer cells. Some common cellular and molecular features. Mutation Research. 1994; 305: 229-239.
- 21.-Wang P., Macaulay L. Shinagawa T., Anderson P., Baxter J. Identification of renal

- cathepsin B as a human prorenin processing enzyme. *J Biol Chem* 1991;266:12633.
- 22.-Goldberg A and Rock K. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379.
- 23.-Poole A.R., Recklies A., Stoker T. Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edge of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature*. 1978; 273:545-547
- 24.-Recklies A., Tiltman T., Stoker A., Poole R. Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue. *Cancer Res.* 1980; 40:550-556.
- 25.-Graf M., Baici A., Sträuli P., Histochemical localization of cathepsin B at the invasion front of the rabbit V2 carcinoma. *Lab Invest.* 1981;45:6:587-596 *Pathol.* 1994; 145: 301-309 .
- 26.-Pietras R., Roberts J., Subcellular distribution and properties in neoplastic and control cells from human ectocervix. *J Biol Chem.* 1981; 256: 8536-8544.
- 27.-Spiess E.,Brüning A., Gack S., Ulbricht B., Spring H., Günter T., Werner E. Cathepsin B activity in Human lung Tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular level. *J Histochem Cytochem.*1994; 42:917-929.
- 28.-Sloane B, Cao L., Sameni M., Rozhin J., Moin K., Ziegler G and Tait R. Cathepsin B in tumor progression. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* 1993; 34:602-3.
- 29.-Mort J.S., Recklies A., Poole R. Characterization of a thiol proteinase secreted by malignant human breast tumours. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 614: 134-143.
- 30.-Werle B., Julke B Lah T.,Spiess E and Ebert W. Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *BJC* 1997; 75(8): 1137-1143.
- 31.-Pietras R.J., Szego C.M. Mangan C.E. y cols. : Elevated serum cathepsin B1 activity with vaginal adenosis and adenocarcinoma in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Fed. Proc.* 1977; 36:378.
- 32.-Pietras R., Szego C., Mangan C., Facog B., Burtnett M.,Orevi M. Elevated serum cathepsin B1 and Vaginal pathology after prenatal DES Exposure. *Obstet Gynecol* 1978; 52:3.
- 33.-Pietras R., Szego C.,Mangan C.,Facog B., Seeler B., Burtnett M., Elevated serum cathepsin B1-like activity in women with neoplastic disease. *Gynecol Oncol.* 1979; 7: 1-17.
- 34.-Benítez B.L. et all. Concentración de proteasas y antiproteasas en el suero y el líquido vaginal de pacientes con carcinoma cervicouterino. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 1980; 11:523-545.; 52: 3.
- 35.-Benítez L., Villanueva C., Freyre R., Amezcua J., De la Huerta R., Luévano E., Pastrana L. Niveles de proteinasas séricas y alteraciones funcionales y morfológicas de las plaquetas en pacientes con carcinoma cervicouterino. Correlación con el grado de progresión de la neoplasia. *Arch Invest Méd.* 1986;17:211-242.
- 36.-Makarewicz R, Drewa G, Szymanki W. Activity of cathepsin B and D in blood serum of women with uterine cervix neoplasms. *Ginekol Pol* 1994; 65(10): 578-81.
- 37.-Makarewicz R and Drewa G. A possible application of cathepsin B activity determination for estimating the spread of the cervix uteri carcinoma. *Acta-Biochim-Pol.* 1996; 43-(3): 521-4.
- 38.-Vasishta A., Baker P.,Hopwood D.,Holley M., Cuschieri A. Proteinase-like peptidase activities in malignant and non-malignant gastric tissue. *Br J Surg* 1985;72:386-388.

- 39.-Rugge M., Grigioni W.F. Nitti D and Naccarato R. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995. 76(3): 367-75.
- 40.-Vasishta A., Baker P., Preece P., Wood R., Cuschieri A. Cathepsin B and other proteinases in breast cancer tissue. *Eur Surg Res.* 1984; 16:48 (Abstract): 41.
- 41.-Vasishta A. Baker P., Preece P., Wood R., Cuschieri A. Serum and tissue proteinase-likepeptidase activities in women undergoing totl mastectomy for breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1984; 20:2:203-
- 42.-Benítez B.L. Martínez G., Ruíz M., Gutiérrez F., Utrera D. Proteinase activity in invasive cancer of the breast correlation with tumor progression. *Arch Med Res* 1995;26:S163.
- 43.-Vilbrricht B, Hagmann W., Ebert W., Spiess E. Differential secretion of cathepsins B and L from normal and tumor human lung cells stimulated by 12(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid. *Exp-Cell-Res.* 1996; 226(2): 255-63.
- 44.-Milburn Jessup J. Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma. *Am J. Pathol.* 1994; 145(2): 253-262.
- 45.-Rempel S, et al. Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Res.* 1994;54: 6027-6031.
- 46.-Shuja S and Murnane M. Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease. *Int. J. Cancer.* 1996; 66:420-
- 47.-Friezner D., Rajput B and Reich E. The human tissue plasminogen activator gene. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 6972-6985.
- 48.-Riccio A., Grimaldi G., Verde P., Sebastio G., Boast S., Blasi F. The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13: 2759-71.
- 49.-Rabbani S. In cell adhesion and invasion in cancer metastasis, edited by Pnina Brodt. 1996: 99-109. R.G. Landes Company.
- 50.-Mareel M, De Baetselier P and Van Roy F. Mechanisms of invasion and metastasis. *CRC Press.*1991:1-3.
- 51.-Hanahan D. and Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364.
- 52.-Ossowski L. and Reich E. Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res.* 1980; 40: 2300-2309.
- 53.-Duffy M., Reilly D., O'Sullivan, O'Higgins N., Fennelly J. and Andreasen P. Urokinase-Plasminogen Activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50: 6827-
- 54.-Markus G. The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. A review of recent literature. *Enzyme.* 1988; 40:158-172.
- 55.-Ganesh S., Sier C., Griffioen G., Vloedgraven H, et al. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 4065-4071.
- 56.-Gleeson N., Gonsalves R. and Bonnar J. The plasminogen activator urokinase and its inhibitor PAI-2 in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1992; 47: 58-61.
- 57.-Bruckner A., Filderman A., Kirchleimer B. and Remold H. Endogenous receptor-bound urokinase mediates tissue invasion of the human lung carcinoma cell lines A549 and Calu-1. *Cancer Res.* 1992; 52: 3043-3047.

- 58.-Schmalfeldt B., Kuhn W., Reuning U., Dettmar P., Schmitt M., Jänicke F., Höfler H. and Graeff H. Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors type 1 and 2. *Cancer Res.* 1995; 55:3958-3963.
- 59.-Kobayashi H., Fujishiro S. and Terao T. Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 1994; 54: 6539-6548.
- 60.-Laarsson G., Larsson A. and Astedt B. Tissue plasminogen activator and urokinase in normal, dysplastic and cancerous squamous epithelium of the uterine cervix. *Thrombosis and Haemostasis.* 1987; 58(3): 822-826.
- 61.-Mott D., Fabish P., Sani B. and Sorof S. Lack of correlation between fibrinolysis and the transformed state of cultured mammalian cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1974; 61, 621-627.
- 62.-Pollack R., Risser R., Conlon S. and Rifkin D. Plasminogen activator production accompanies loss of anchorage regulation in transformation of primary rat embryo cells by simian virus 40. *Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A.* 1974; 71,4792-4796.
- 63.-Woessner F. The family of matrix metalloproteinases. In *Clinical Importance of metalloproteinases and their inhibitors.* Annals New York Academy of Science. 1995: 11-14.
- 64.-Liotta L., Tryggvason K., Garbisa S., Hart I., Foltz C. and Shafie S. Metastatic Potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 1980; 284: 67-68.
- 65.-Levy T., Cioce V., Sobel M., Garbisa S., Grigioni W., Liotta L. and Stetler W. Increased expression of the Mr72000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 439-444.
- 66.-Kohichi K., Kinoshita H., Kato T., Nagatsu T., Takada K. and Sakakibara S. A new and highly sensitive fluorescence assay for collagenase like peptidase activity. *Anal Biochem.* 1979; 100: 43-50.
- 67.-O'Grady R., Upfold LI., Stephens R. Rat mammary carcinoma cells secrete active collagenase and activate latente enzyme in the stroma via plasminogen activator. *Int J Cancer.* 1981; 28:509-515.
- 68.-Morikawa K., Walker S., Nakajima M., Pathal S., Jessup S. and Fidle I. Influence of organ environment on the growth, selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1988; 48:6863.
- 69.-Hoyhtya M., Hujanen E., Turpeenniemi H., Thorgeirsson U., Liotta L. and Tryggvason K. Modulation of type-IV collagenase activity and invasive behavior of metastatic human melanoma (A2058) cells in vitro by monoclonal antibodies to type IV collagenase. *Int J Cancer* 1990; 46: 282-286.
- 70.-Ura H., Bonfil R., Reich R., Reddel R., Pfeifer A., Harris C and Szanto K. 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.* 1989; 49: 4615.
- 71.-Endo K., Maehara Y., Baba H., Yamamoto M., Tomisaki S., Watanabe A., Kakeji Y. and Sugimachi K. Elevated levels of serum and plasma metalloproteinases in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17(3C): 2253-8.

- 72.-Liotta L., Thorgeirsson U., Gaarbisa S. Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Met Rev.* 1982; 1: 277-288.
- 73.-Huhtala P., Tuuttila A., Chow L., Lohi J., Keski O. and Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92 kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92 and 72 kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 16485-90.
- 74.-Mackay A., Hartzler J., Pelina M. Studies on the ability of 65 kDa and 92 kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem* 1990; 265:21929-34.
- 75.-Collier I., Wilhelm S., Eisen A., H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J.Biol. Chem.* 1988; 263:6579-73.
- 76.-Bernhard E., Muschel R. and Hughes E. Mr. 92000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 1990; 50:3872-3877.
- 77.-Tandon A., Clark M., Chamness G., Chirgwin J., Mc Guire W. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 297.
- 78.-Ravdin P., Tandon A., Allred C., Clark G. Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J. Clin Oncol* 1994; 12:467.
- 79.-Gal S. and Gottesman M. The major excreted protein of transformed fibroblasts is an activatable acid-protease. *J Biol Chem.* 1986; 261: 1760-1765.
- 80.-Bolon I., Devouassoux, Robert C., Moro D., Brambilla C. and Brambilla E. Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1619-1629.
- 80B.-Riou G., et all. c-myc proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *The Lancet.* 1987;4:762.
- 81.-Ocadiz R., Saucedo R., Cruz M., Graef A. and Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1987; 47(15): 4173-7
- 82.-Gariglio P., Ocadiz R., Saucedo R. Human Papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells* 1987; 5:313-348.
- 83.-Rajput B., Degen S., Reich E., Waller E., Axeirod J., Eddy R., Shows T. Chromosomal locations of human tissue plasminogen activator and urokinase genes. *Science.* 1985; 230: 672-674.
- 84.-Douglas L. Function and regulation of Ras. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 85- 91.
- 85.-Denhardt D. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J.* 1996, 318: 729-747.
- 86.-Yoosden K. et al. Enhance spontaneous metastasis of mouse carcinoma cells transfected with an activated c-Ha-ras-1 gene. *Int J Cancer* 1986; 37: 425-433.
- 87.-Collard G. et al. Invasive and metastatic potential induced by ras transfection into mouse BW5147-lymphoma cells. *Cancer Res.* 1987; 47: 754-759.
- 88.-Sjoerd R. et al. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res (Suppl).* 1992; 52: 2665s-2669s
- 89.-Muschel R., Williams J., Lowy D. and Liotta L. Harvey ras induction of metastatic

- potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am J Pathol.* 1985; 121: 1-8.
- 90.-Vousden K. and Marshall C. Three different activated ras genes in mouse tumours: Evidence for oncogene activation during progression of a mouse lymphoma. *EMBO J.* 1984; 224: 1121.
- 91.-Riou G., Barrois V., Dutronquay V. and Orth G. Presence of Papillomavirus DNA sequences, amplification of c-myc and c-Ha-ras oncogenes and enhanced expression of c-myc in carcinomas of the uterine cervix. *Papillomavirus: Molecular and Clinical Aspects.* 1985: 47-56. Alan R. Liss, Inc.
- 92.-Van Le L. H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol. Oncol.* 1993; 49: 181-184.
- 93.-Sagae S., Kudo R., Kuzumaki N., Hisada T., Mugikura Y., Nihei T., Takeda T and Hashimoto M. Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Cancer.* 1990; 66: 295-301.
- 94.-Huang G. et al. Clinical significance on expression of the ras gene product p21 in human cervical carcinoma tissues. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao.* 1992; 23(1): 61-4.
- 95.-Yokota J. et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1989; 49(13): 3598-3601.
- 96.-Iwasaka T., et al. Detection of human Papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1992; 46: 298-303.
- 97.-Sagae S., Kuzumaki N., Mugikura Y., Kudo R. and Hashimoto M. ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer.* 1989; 63: 1577-1582
- 98.-Hayashi Y., Hachisuga T., Iwasaka T., Fukuda K., Okuma Y., Yokoyama M. and Sugimori H. Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol.* 1991; 40: 147-151.
- 99.-Symonds R., et al. No correlation between ras, c-myc, c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *Eur J Cancer.* 1992; 28A: 1615-1617.
- 100.-Enomoto T., Inoue M., Perantoni A., Buzard G., Miki H., Tanizawa O. and Rice J. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res.* 1991; 51: 5308-5314.
- 101.-Enomoto T., Inoue M., Perantoni A., Terakawa N., Tanizawa O. and Rice J. K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract. *Cancer Res.* 1990; 50: 6139-6145.
- 102.-Tenti P., Romagnoli S., Silini E., Pellegata N., Zappatore R., Spinillo A., Zara C., Ranzani N. and Carnevali L. Analysis and clinical implications of K-ras gene mutations and infection with human papillomavirus types 16 and 18 in primary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer.* 1995; 64: 9-
- 103.-Steeg P, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson U, Talmadge E, Liotta L and Sobel M. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl Cancer Inst.* 1988; 80:200-204.
- 104.-Degen W, Weterman M, Van Groningen J, Cornelissen I, Lemmers J, Agterbos M,

Geurts Van Kessel A, Swart G. and Bloemers H. Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer* 1996;65: 460-465.

105.-Weterman M., Ajubi N., van Dinter I., Degen J. nmb, a novel gene is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer*. 1995; 60: 73-81.

106.-Dong Jin Tang, Lamb P., Rinker-Schaeffer., Vukanovic J., Ichikawa., Isaacs J., Barrett J.C. Kal 1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995; 268:884-

107.-Stahl J, Leone A, Rosengard A, Porter L, King R. and Steeg P. Identification of a second human nm23 gene nm23-H2. *Cancer Res*. 1991; 51:445-449.

108.-Venturelli D.,Martinez R., Melotti P., Casella I.,Peschle C., Cucco C., Spampinato G., Darzynkiewicz Z. and Calabretta B. Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32 Dc13 myeloid cells. *Proc Natl. Acad Sci. USA*. 1995; 92:7435-7439.

109.-Jiang XP., Liu KD and Zhou XD. Cloning and sequencing of nm23-H3b, a new gene identified to nm23. *Chinese Med J*. 1994; 74(11):670-672.

110.-Milon L., Rousseau F., Munier A., Erent M., Lascu I., Capeau J. and Lacombe M. nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Human Genet*. 1997; 99(4): 550-7.

111.-Varesco L., Caligo M, Simi P., Black D., Vincenzo N., Casarino L., Rocchi M., Ferrara G., Solomon E. and Bevilacqua G. The nm23 gene maps to human chromosome band 17q22 and shows a restriction fragment length polymorphism with Bgl II. *Genes Chrom Cancer*.1992;4:84-88.

112.-Leone A., Flatow U., King R., Ann Sandeen M., Margulies I., Liotta L. and Steeg P. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*. 1991; 65:25-35.

113.-Biggs J., Hersperger E.,Steeg P., Liotta L. and Shearn A. A Drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell*. 1990; 63:933-940

114.-Wallet V., Mutzel R., Troll H., Barzu O., Wurster B., Veron M., Lacombe M.L. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to NM23 and AWD proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *J. Natl. Cancer Inst*. 1990; 82:14: 1199-1202.

115.-Liotta L.and Steeg P. Clues to the function of nm23 and awd proteins in development, signal transduction, and tumor metastasis provided by studies of Dictyostelium discoideum. *J. Natl Cancer Inst*.1990;82:14:1170-1172.

116.-Liotta L., Steeg P. and Stetler W. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991; 64:327-336.

117.-Gilles A.M., Presecan E., Vonica A. and Lascu I. Nucleoside diphosphate from human erythrocytes. *J. Biol. Chem*. 1991; 266:14: 8784-8789.

118.-MacDonald N., De la Rosa A., Benedict M., Freije J., Krutsch H. and Steeg P. A serine phosphorylation of nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J.Biol Chem*. 1993; 268(34): 25780-25789.

119.-Postel E., Berberich S., Flint S. and Ferrone C. Human c-myc transcription factor

- PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*. 1993; 261:478-480.
- 120.-Berberich SJ. and Postel EH. PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element. *Oncogene*. 1995;10: 2343-2347.
- 121.-Postel E., Weiss V., Beneken J. and Kirtane A. Mutational analysis of nm23-H2/NDP kinase identifies the structural domains critical to recognition of a c-myc regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93:6892-6897.
- 122.-Kraeft S.K., Traincart F., Mesnildrey S., Bourdais J., Veron M. and Bo Chen Lan. Nuclear localization of nucleoside diphosphate kinase type B (nm23-H2) in cultured cells. *Exp. Cell. Research*. 1996; 227: 63-69.
- 123.-Yamashiro S., Urano T., Shiku H. and Furukawa. Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines. *Ocogene* 1994; 9:2461-2468.
- 124.-Lakso M., Steeg P., and Westphal H. Embryonic expression of nm23 during mouse organogenesis. *Cell Growth different*. 1992; 3:873-879.
- 125.-Hailat N., Keim D., Melhem R., Zhu X., Christoph E., Brodeur G., Reynolds P., Seeger R., Lottspeich F., Strahler J. and Hanash S. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J. Clin. Invest*. 1991; 88:341-345.
- 126.-Kantor J., McCormick B., Steeg P and Zetter B. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res*. 1993; 53: 1971-1973.
- 127.-Urano T., Furukawa K. and Shiku H. Expression of nm23/NDP kinase proteins on the cell surface. *Oncogene* 1993; 8:1371-1376.
- 128.-Wagner P., Steeg P and Ngoc-Deep V. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 9000-9005.
- 129.-Bevilacqua G., Sobel M., Liotta L. and Steeg P. 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*. 1989; 49:5185-5190.
- 130.-Hennessy C., Henry J., May F., Westley B., Angus B. and Lennard T. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J. Natl. Cancer Inst*. 1991; 83:281-285.
- 131.-Hirayama H., Sawai S., Takagi Y., Mishima Y., Kimura N., Shimada N., Esaki Y., Kurashima Ch., Utsuyama M., Hirokawa K. Positive relationship between expression of anti metastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. *J. Natl Cancer Inst*. 1991;83(17):1249-1250.
- 132.-Barnes R., Masood S., Barker E., Rosengard A., Coggin D., Crowell T., King R., Jordan K., Wargotz E., Liotta L. and Steeg P. Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. 1991; 139:2:245-250.
- 133.-Charpin C., Bouvier C., García S., Martini F., Andrac L., Lavaut M. and Allasia C. Automated and quantitative immunocytochemical assays of nm23/NDPK protein in breast carcinomas. *Int.J.Cancer*. 1997; 74: 416-420.
- 134.-Kodera Y., Isobe K., Yamauchi M., Kondoh K., Kimura N., Akiyama S., Itoh K.,

- Nakashima I. and Takagi H. Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer* 1994; 73:259-65.
- 135.-Nakayama,H., Yasui W., Yokozaki H. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J. Cancer Res.* 1993; 84: 184-190.
- 136.-Lin K.,Lin Y.,Liu W., Chen S., Chang K., Cheng S. Increased invasive activity of human hepatocellular carcinoma cells is associated with an overexpression of thyroid hormone beta 1 nuclear receptor and low expression of the antimetastatic nm23 gene. *Cancer-Lett.* 1995; 98(1): 89-95.
- 137.-Soon Lee., Redshaw A., Boag G. nm23-H1 Protein immunoreactivity in laryngeal carcinoma. *Cancer.* 1996; 77: 2246-50.
- 138.-Lai W., Wu M., Yan J., Chen F. Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastases. *Ann-Thorac-Surg.* 1996; 62(5): 1500-1504.
- 139.-Ann Florenes V., Aamdal S., Myklebost O., Maelandsmo G., Bruland O. and Fodstad O. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: Inverse correlation to disease progression. *Cancer Res.* 1992; 52: 6088-6091.
- 140.-Radinsky R., Weisberg H., Starodelsky A. and Fidler I. Expression level of the nm23 gene in clonal populations of metastatic murine and human neoplasms. *Cancer Res.* 1992; 52: 5808:5814.
- 141.-Steege P., Bevilacqua G., Pozzatti R., Liotta L. and Sobel M. Altered expression of nm23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* 1988; 48: 6550-6554.
- 142.-Takeda O., Handa M., Vehara T., Maseki N., Sakashita A., Sakuri M., Kanda N., Arai Y., cKaneko Y. An increased nm23-H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas. *Br. J. Cancer.* 1996; 74(10): 1620-1626.
- 143.-Aryee D., Ströbel T., Kos K., Salzer-Kuntschik M., Zoubek A., Veron M., Ambros I., Traincart F., Gadner H. and Kovar H. High nm23 H-1/NDPK-A expression in Ewing tumors: paradoxical immunohistochemical reactivity and lack of prognostic significance. *Int. J. Cancer* 1995; 64:104-111.
- 144.-Nakopoulou L., Constandinides C., Tzonou A., Lazaris A., Zervas A and Dimopoulos C. Immunohistochemical evaluation of nm23-H1 gene product in transitional cell carcinoma of the bladder. *Histopathology* 1996; 28: 429-435.
- 145.-Yokoyama A., Okabe-Kado J., Sakashita A., Maseki N., Kaneko Y., Hino K., Tomoyasu S., Tsuruoka N. and Honma Y. Differentiation inhibitory factor as a new prognostic factor in acute monocytic leukemia. *Blood* 1996; 88:9: 3555-3561.
- 146.-Yokoyama at al. Evaluation by multivariate analysis of the differentiation factor nm23 as a prognostic factor in acute myelogenous leukemia and application to other hematologic malignancies. *Blood.* 1998; 91: 1845-1851.
- 147.-Aryee D., Simonitsch I.,Mosberger I., Kos K., Mann G., Schlogl E., Potschger U., Gadner H., Radaszkiewicz T., Kovar H. Variability of nm23-H1/NDPK-A expression in human lymphomas and its relation to tumour aggressiveness. *Br. J. Cancer.* 1996; 74(11): 1693-1698.
- 148.-Lacombe ML., Sastre G.X., Lascu I., Vonica A., Wallet V., Thiery J.P. and Véron M. Overexpression of nucleosidde diphosphate kinase (nm23) in solid tumours. *Eur J. Cancer.* 1991; 27: 10:1302-1307.

- 149.-Wang L., Patel U., Ghosh L., Chao Chen H. and Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1993; 53:717-720.
- 150.-Myeroff L., Markowitz S. 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.* 1993; 85:147-152.
- 151.-Okada K., Urano T., Goi T., Yamaguchi A., Furukawa K. and Shiku H. Isolation of human nm23 genomes and analysis of loss of heterozygosity in primary colorectal carcinomas using a specific genomic probe. *Cancer Res.* 1994; 54: 3979-3982.
- 152.-Royds J., Cross S., Scholefield J., Rees R. and Stephenson T. nm23 anti-metastatic gene product expression in colorectal carcinoma. *J. Pathol.* 1994; 172: 261-266.
- 153.-Mandai M., Konishi I., Koshiyama M., Komatsu T., Ysmamoto S., Nanbu K., Mori T., and Fukumoto M. Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1995; 75: 2523-2529.
- 154.-Kristensen G., Holm R., Abeler V. and Tropé C., Evaluation of the prognostic significance of nm23/NDP kinase protein expression in cervical carcinoma: An immunohistochemical study. *Gynecol. Oncol.* 1996; 61:378-383.
- 155.-Marone M., Scambia G., Ferrandina G., Giannitelli C., Benedetti P., Jacovella S., Leone A and Mancuso S. Nm23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br. J. Cancer* 1996; 74:7:1063-1068.
- 156.-Mandai M., Konishi I., Koshiyama M., Mori T., Arao S., Tashiro H., Okamura H., Nomura H., Hiai H. and Fukumoto M. Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: Correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2, and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. *Cancer Res.* 1994; 54: 1825-1830.
- 157.-Viel A., Dall'Agnesse L., Canzonieri V., Sopracordevole F., Capozzi E., Carbone A., Visentin M. and Boiocchi M. Suppressive role of the metastasis related nm23-H1 gene in human ovarian carcinomas: association of high messenger RNA expression with lack of lymph node metastasis. *Cancer Res.* 1995; 55:2645-265
- 158.-Harlozinska A., Bar J., Gerber J., Nm23 expression in tissue sections and tumor effusion cells of ovarian neoplasms. *Int. J. Cancer.* 1996; 69(5): 415-419.
- 159.-Lee C. Pirdas A., Lee M. Immunohistochemical demonstration of the nm23-H1 gene product in human malignant melanoma and Spitz nevi. *Pathology.* 1996; 28(3): 220-4.
- 160.-Freije J., Mac Donald and Steeg P (edited by: Günthert U and Birchmeier). Attempts to understand metastasis formation II. Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York. 1996; 221.
- 161.-The value of nm23 expression as an indepetors; cyclic-AMP. *J. Cutan Pathol.* 1996; 23(4): 344-349.
- 162.-Easty D. Maung K. Lascu I., Fallowfield M., Hart I., Bennett D. Expression of NM23 in human melanoma progression and metastasis. *Br. J. Cancer.* 1996; 74(1): 109-114.
- 163.-Myers R., Scrivastava S., Oelschlager D., Brown D., Grizzle W. Expression of nm23-H1 in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Human Pathol.* 1996; 27(10): 1021-1024.
- 164.-Konishi N., Nakaoka S., Tsuzuki T., Matsumoto K., Kitahori Y., Hiasa Y., Urano T.,

- Shiku H. Expression of nm23-H1 and nm23-H2 proteins in prostate carcinoma. *Jpn-J-Cancer-Res.* 1993;84(10): 1050-1054.
- 165.-Leone A., McBride., Weston A., Wang M., Anglard P., Cropp C., Goepel J., Lidereau R., Callahan R., Linehan M., Rees R., Harris C., Liotta L. and Steeg P. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res.* 1991; 51:2490-2493.
- 166.-Cohn K., Wang F., DeSoto-LaPaix F., Solomon W., Patterson L., Arnold M., Weimar J., Feldman J., Levy A., Leone A. and Steeg P. Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. *Lancet* 1991; 338:722-724.
- 167.-MacDonald N., Freije J., Stracke M., Manrow R. and Steeg P. Site-directed mutagenesis of nm23-H1. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:41:25107-25116.
- 168.-De la Rosa A., Mikhak B and Steeg P. Identification and characterization of the promoter for the human metastasis suppressor gene nm23-H1. *Arch Med.* 1996; 27: 395-401.
- 169.-Weber G., Ashkar S., Melvin J., Cantor H. Receptor- Ligand interaction between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science.* 1996; 271:509-512.
- 170.-Ghaffari S, Dougherty J., Landsdorp P., Eaves A., Eaves J. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1995; 86(8): 2976-2985.
- 171.-Kainz C, Kohlberger P, Tempfer C, Sliutz G, Gitsch G, Reinthaller A and Breitenecker G. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer.* 1995; 31(10):1706-1709.
- 172.-Kainz C., Kohlberger P, Sliutz G, Tempfer C, Heinzl H, Reinthaller A, Breitenecker G and Koelbl H. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol. Oncol.* 1995; 57: 383-387.
- 173.-Hernández M., Lazcano C., Berumen J., Cruz A., Alonso P. and González G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in México: A case-control study. *Arch Med Res.* 1997; 28: 265-271.
- 174.-Schiffman M. and Brinton L. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer.* 1995; 76: 1881-901.
- 175.-Robbins S., *Pathologic basis of disease.* 1994; 5th edition. W.B. Saunders Company: 1048.
- 176.-Philip B and Young R. Tumors and tumorlike lesions of the uterine corpus and cervix. New York: Churchill Livingstone. 1993.
- 177.-zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976; 36: 794.
- 178.-Schwarz E., Fresse U., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A. and Zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (Lond.).* 1985; 314: 111-114.
- 179.-Cullen A., Reid R., Champion M. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol.* 1991; 65: 606-612.
- 180.-Berumen J., Casas L., Segura E., Amezcua J. and García A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 1994; 56: 640-645.
- 181.-Berumen J., Unger E., Casas L. and Figueroa P. Amplification of human

papillomavirus type 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Human Pathol.* 1995; 26: 676-681.

182.-Boyer S., Wozer D. and Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996; 56: 4620.

183.-Werness B., Levine A. and Howley P. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248: 76-79.

184.-Berumen J., Miranda E., Zafra G., Casas L., Segura E., Ordoñez R., Agurre J., Martínez M., Rosas A., Ibarra V., Pedraza L., Saad A., Marroquín A., Gutiérrez M., Martínez A. and Gariglio P. *Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. Gac Méd Méx. Vol 133 Supl 1: 35-41.*

185.-Nuovo G., MacConnell P., Simsir A., Valea F. and French D. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res.* 1995; 55: 267-275.

186.-Willis G., Jennings B., Ball R., New N and Gibson I. Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinomata and their metastases. *Gynecol Oncol.* 1993; 49: 359-364.

187.-Czeglédý J., Iosif C., Hansson B., Evander M., Gergely L. and Wadell G. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer?. *Int J Cancer.* 1995; 64: 211-215.

188.-Sup Park J., Rhyu K., Kim C., Kim H., Han K., Ahn H., Kim S. and Namkoong S. Presence of oncogenic HPV DNAs in cervical carcinoma tissues and pelvic lymph nodes associating with proliferating cell nuclear antigen expression. *Gynecol Oncol.* 1996; 60: 418-423.

189.-Sapy T., Hernadi Z., Lukacsko L., Borsos A. The role of high risk HPV lymph node positivity in the surgical staging of cancer of the uterine cervix. *Acta Chir Hung.* 1997; 36(1-4): 313-5.

190.-Garzetti G., Civattini A., Lucarini G., Goteri G., Menso S., De Nictolis M., Romanini C., Biagini G. The role of human papillomavirus DNAs in cervical carcinoma and risk of lymph node metastasis: association with 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining. *Cancer,* 1998; 82(5): 886-92.

191.-Nindl I., Benítez L., Berumen J., Fisher S., Gross G., López L., Müller M., Tomasino M., Vázquez C. and Gissmann L. Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch Virol.* 1994; 137: 341-353.

192.-Fisher S., Benítez L., Nindl I., Stockfleth E., Müller M., Wolf H., Pérez F., Guzman J., Gutiérrez F., Irvin W. and Gissmann L. The association of human papillomavirus type 16 E6 and E7 antibodies with stage of cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1996; 61: 73-78.

193.-Nindl I., Gissmann L., Fisher S., Benítez L., Berumen J., and Müller M. The E7 protein of human papillomavirus (HPV) type 16 expressed by recombinant vaccinia virus can be used for detection of antibodies in sera from cervical cancer patients. *J Virol Meth.* 1996; 62: 81-85.

195.-Benítez L. *Biología de la célula neoplásica. Su importancia para la oncología clínica. Rev Méd IMSS.* 1987; 25: 457.

- 196.-Liotta L., Mandler R., Murano G., Katz D., Goron R., Chiang P. and Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 3302-3306.
- 197.-Sloana B., Dunn J., Honn K. Lysosomal cathepsin B: Correlation with metastatic potential. *Science*, 1981; 212: 1151. *Science*.1982; 217: 540-542.
- 198.-Pacchiarini L., Grignani G., Pagliarino M., Riccetti M., Bottazzi B., Montovani A. and Ascari E. Role of tumor proteinases in tumor cell-induced platelet aggregation. *Invasion and metastasis*. 1986; 6: 287-301.
- 199.-Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res*. 1974; 34:2109-2113.
- 200.-Fidler I., Ellis L. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994; 79: 185-188.
- 201.-Hanahand D. and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.
- 202.-Evans C. The metastatic cell. *Behaviour and biochemistry*. 1990: 218-330. Chapman and Hall. New York.
- 203.-FIGO Cancer Committee. Staging announcement: FIGO Cancer Committee. *Gynecol. Oncol* 1986; 25: 383-5.
- 204.-Wilcox J. Fundamental principles of in situ hybridization. *J. Histochem and Cytochem*. 1993; 41:1725-1733.
- 205.-Smith RE, Van Frank RM. The use of amino acid derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine for the assay and subcellular localization of tissue proteinases. In Dingle RT Dean. *Lysosomes in Biology and Pathology*. Vol.4. New York: Elsevier/North Holland. 1975:193-240.
- 206.-Husbey R., Smith R. Synthetic oligopeptide substrates.Their diagnostic application in blood coagulation, fibrinolysis, and other pathologic states. *Sem Thromb Hemostasis*. 1980; Vol VI, No.3.
- 207.-Szego C, Seeler BJ, Smith R. Lysosomal cathepsin B1: Partial characterization in rat preputial gland and re-compartmentation in response to estradiol-17 β . *Eur. J. Biochem* 1976;69:463-474.
- 208.-Zimmerman M, Quigley J.P., Ashe B, Dorn C. Goldfarb R, Troll W: Direct fluorescent assay of urokinase and plasminogen activators of normal and malignant cells: kinetics and inhibitor profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75,750.
- 209.-Vasishta A., Baker P., Preece P., Wood R., Cuschieri A. Inhibition of proteinase-like peptidase activities in serum and tissue from breastcancer patients. *Anticancer Res*. 1988; 8:785-790.
- 210.-Spiess E.,Brüning A., Gack S., Ulbricht B., Spring H., Günter T., Werner E. Cathepsin B activity in Human lung Tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular level. *J Histochem Cytochem*.1994; 42:917-929.
- 211.-Smith R. Identification of protease isozymes after analytical isoelectric focusing using fluorogenic substrates impregnated into cellulose membranes. *J. Histochem Cytochem* 1984; 32:12: 1265-1274.
- 212.-Wordinger R., Miller G. and Nicodemus D. *Manual of immunoperoxidase techniques*. 1987: Second edition. ASCP Press. Dallas, Texas.
- 213.-Loebl J. *Image analysis. Principles and practice*. Short Run Press Ltd, Exeter. Great Britain.199
- 214.-Herrington C. and McGee J. *Diagnostic molecular pathology a practical approach*. Vol

II. The practical approach series. Irl Press: 50-58.

215.-Makarewicz R., Drewa G., Szymanski W. and Skonieczna M. Cathepsin B in predicting the extent of the cervix carcinoma. *Neoplasma*. 1995; 42(1): 21-4.

216.-Bhuvaramurthy V. and Govindasamy S. Extracellular matrix components and proteolytic enzymes in uterine cervical carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 1995; 144(1): 35-43.

217.-Muranane J., Sheahan K., Ozdemirli M. and Shuja S. Stage specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 1991; 51: 1137-1142.

218.-Irimura T., Yamori T., Bennett S., Ota D. and Cleary K. The relationship of collagenolytic activity to stage of human colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 1987; 40: 24-31.

219.-Daneri A., del Toro S., Bravo A., Cabrera A., Cabrera N., Orbach S., Pérez R. *Biomed Pharmacother*. 1995; 49(6): 304-310.

220.-Rifkin D., Loeb J., Moore G. and Reich E. Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures. *J Exp.Med* 1974; 139: 1317-1328.

221.-Gunji Y., Herberman R and Gorelik E. Mechanisms of antimetastatic action of anticoagulants II. Fibrin coagulation protects tumor cells from destruction by NK or LAK cells. *Proc Am Ass Cancer Res*. 1987; 28: 72.

222.-Dvorak H., Dvorak A., Manseau E., Wilberg L., and Churchill W. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line I tumor regression. *J Nat Cancer Inst*. 1979; 62: 1459-1472.

223.- Bajou K., Gerard R., Masson V., Brunner N., Holst H., Skobe M., Fusenig N., Carmeliet P., Collen D and Foidart M. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nature Medicine*. 1998; 4: 923-928.

224.-Yuen P. and Kwaan H. Fibrinolytic activity in human tumor tissues. *Cancer Investigation*. 1983; 1(5): 369-373.

225.-Koelbl H., Kirchheimer J., Tatra G., Günter C and Binder B. Increased plasma levels of urokinase-type plasminogen activator with endometrial and cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 1988; 72(2): 252-6

226.-Kirchheimer J., Kolbl H., Tatra G. and Binder B. Relationship between plasma levels of components of the fibrinolytic system and acute-phase reactants in patients with uterine malignancies. *Eur J Clin Invest*. 1990; 20(1): 79-84.

227.-Sugimura M., Kobayashi H., Kanayama N. and Terao T. Clinical significance of urokinase- type plasminogen activator (uPA) in invasive cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol*. 1992; 46(3): 330-6.

228.-Saito K., Nagashima M., Iwata M., Hamada H., Sumiyoshi K., Takada Y. and Takada A. The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase en plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb Res*. 1990; 58(4): 355-366.

229.-Lee J., Lee S., Yang M., Ahmed M., Mohiuddin M. and Lee E. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 62(1): 49-54.

230.-Hayashi Y., Hachisuga T., Iwasaka T., Fukuda K., Okuma Y., Yokoyama M. and Sugimori H. Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell

- carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol.* 1991; 40: 147-151.
- 231.-Shirasawa H., Tomita Y., Sekiya S., Takamizawa H. and Simizu B. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol.* 1987; 68: 583-591.
- 232.-Hiwasa T., Yokoyama S., Myung J., Noguchi S. and Sakiyama S. c-Ha-ras gene products are potent inhibitors of cathepsins B and L. 1996. *FEBS Lett.* 211(1): 23-26.
- 233.-Hiwasa T., Sawada T., Sakiyama S. Synergistic induction of anchorage-independent growth of NIH3T3 mouse fibroblasts by cysteine proteinase inhibitors and a tumor promoter. *J Biol Chem.* 1996; 271(16): 9181-4
- 234.-Sigal I., Gibbs J., D'Alonzo J., and Scolnick E. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 1986; 83: 4725-4729.
- 235.-Hiwasa T., Fujita Y., Shirouzu M., Koide H., Sawada T. Sakiyama S. and Yokoyama S. c-H-Ras mutants with point mutations in Gln-Val-Val region have reduced inhibitory activity toward cathepsin B. *Cancer Lett.* 1993; 69: 161-165.
- 236.-Lah T., Kalman E., Shinde B., Somers R., Estrada S., Salero E. and Russo J. Lysosomal cathepsins D, B and L in the progression of human breast epithelial cell (HBEC) transformation. International Association for breast cancer research, biennial meeting. 1993. 25-28. Calgary, Alberta, Canada.
- 237.-Freiji J., Blay P., Mac Donald N., Manrow R. and Steeg P. Site-directed mutation of nm23-H1. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 5525-5532.
- 238.-Sloana B., Moin K., Sameni M., Tait L., Rozhin J. and Ziegler G. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. *J Cell Sci.* 1994; 107: 373-384.
- 239.-Jiang W., Hiscox S., Bryce R., Horrobin D. and Mansel R. The effects of n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of nm23 in human cancer cells. *Br. J. Cancer.* 1998; 77: 731-738.
- 240.-Holm R., Hoie J., Kaalhus O. and Nesland J. Immunohistochemical detection of nm23/NDP kinase and cathepsin D in medullary carcinomas of the thyroid gland. *Virchows Arch.* 1995; 427(3): 289-94.
- 241.-Jang A. and Hill R. An examination of effects of hypoxia, acidosis, and glucose starvation on the expression of metastasis-associated genes in murine tumor cells. *Clin Exp Metastasis.* 1997; 15(5): 469-83
- 242.-Songun I., van de Velde c., Hermans J., Pals S., Verspaget H., Vis A., Menon A., Litvinov S. van Krieken J. Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. *Br J Cancer.* 1996; 74(11): 1783-8.