

11261

3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"PARTICIPACION DE LOS GENES RAS Y
NM23 EN LA CAPACIDAD METASTASICA DE
CELULAS TRANSFORMADAS."**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(AREA BIOQUIMICA)**

PRESENTA:

BIOLOGO ZEFERINO ENRIQUE PEREZ CARDENAS

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DESCONTINUA

Esta tesis se realizo en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología así como en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la tutoría del Dr. Alejandro García Carrancá.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por CONACYT (F383-M9304) y el sustentante también fue becado por esta Institución con el No. de registro 87863.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Jurado de Examen:

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Guillermo Alfaro Martínez

Dr. Alejandro García Carrancá

Dr. Vicente Madrid Marina

Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl

"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos:

- Al Dr. Alejandro García Carrancá por la dirección de esta tesis y la amistad brindada.
- A los Químicos Fármaco Biólogos Beatriz Guzmán Soriano e Iván Vázquez Luna, así como a la Bióloga Wendy Morales Herrera, por su valiosa colaboración en el desarrollo de las diferentes partes experimentales de las que consta el presente trabajo.
- Al Dr. Ricardo Delgado Chávez y al Dr. Roberto Herrera Goepfert del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología, por su asesoría en la interpretación histopatológica de los cortes histológicos, así como en el registro fotográfico de los mismos.
- Al Químico Fármaco Biólogo Ernesto Alfaro Moreno, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo, así como por sus valiosas críticas al mismo.
- A la Biól. Catalina Trejo Becerril y al Dr. Mauricio Salcedo por sus comentarios, así como el asesoramiento del análisis inmunohistoquímico de los tejidos estudiados.
- Al M.V.Z. José F. García M. por su valiosa ayuda en el aporte de animales para la realización del presente trabajo.
- Al Dr. Alejandro Mohar Betancourt, por las facilidades brindadas para la obtención de reactivos que contribuyeron en la finalización de este trabajo.
- A los Doctores Lourdes Gutiérrez, Jaime Mas, Guillermo Alfaro y Vicente Madrid, por sus valiosas críticas y comentarios que enriquecieron la estructuración de ésta tesis.

A mi pequeña Mónica.....
que por desgracia no vio la luz,
pero si el amor de sus padres.....

A David, mi gran motor,
el resanador de los males y problemas
que aparecen en mi vida.....

A Caty, mi compañera y amiga.....
en todo momento,
en todo suceso,
en todo padecer.
¿Qué sería de mi vida sin ti.....?

*En mi corazón
Tú vivirás...
No importa que dirán
dentro de mi estarás siempre...*

Phil Collins

v

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Indice

	Paginas
Lista de Figuras y Tablas	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	
- Generalidades	6
- Características de la familia de genes <i>nm23</i>.	8
a) El gen <i>nm23-H1</i> (NDPk A) y su proteína.	9
b) El gen <i>nm23-H2</i> (NDPk B) y su proteína.	10
- El oncogen <i>ras</i>	
a) Características del gen <i>ras</i> y su proteína.	11
b) Función y regulación de las vías de señalización por <i>ras</i> .	13
- Metaloproteasas	15
Antecedentes	
- Participación de <i>nm23</i> y <i>ras</i> en el proceso metastásico.	
a) Papel de <i>nm23</i> .	16
b) Participación de <i>ras</i> en la transformación celular.	17
c) Relación entre <i>ras</i> y <i>nm23</i> .	
Hipótesis y Objetivos	21

Material y Métodos

- Obtención de células transformadas	
a) Células y cultivo celular.	22
b) Plásmidos recombinantes conteniendo los genes <i>neo</i> y <i>c-H-ras</i> .	22
c) Ensayos de transfección.	23
d) Selección y aislamiento de clonas.	23
- Caracterización de las clonas	
a) Western blot.	25
b) Ensayos de colonización en agar semisólido.	25
c) Obtención de medio condicionado.	25
d) Ensayo de quimioinvasión.	26
e) Doble reto de quimioinvasión.	26
- Caracterización de la tumorigenicidad de las clonas	
a) Animales empleados.	27
b) Ensayos de tumorigenicidad.	27
c) Desarrollo de metástasis.	27
d) Determinación de la actividad gelatinolítica.	28
e) Análisis inmunohistoquímico de Nm23.	28
f) Evaluación de los resultados de inmunohistoquímica.	29
g) Análisis histopatológico.	30
- Análisis estadístico	30

Resultados

- Caracterización de las clonas obtenidas	
a) Morfología celular.	31
b) Determinación de Ras por Western blot.	32
c) Ensayos de colonización en agar semisólido.	35
d) Ensayo de quimioinvasión.	37

- Caracterización de la tumorigenicidad de las clonas	
a) Evaluación de la capacidad tumorigénica de las células transfectadas en ratones	40
b) Desarrollo de metástasis por las células transfectadas en los ratones <i>et/et</i>	46
- Análisis comparativo de la secreción de gelatinasas	
a) Zimogramas de los cultivos y de los tumores.	49
- Análisis inmuohistoquímico de <i>nm23</i> en las células transfectadas y de los tumores subdérmicos y metastásicos	56
- Análisis histopatológico de los tumores generados por las diferentes clonas	62
Discusión	65
Conclusiones	76
Bibliografía	78



*Investigar es ver lo que todo el mundo ha
visto y pensar lo que nadie ha pensado.*

A. Szent-Gyorgyi

Se puede observar mucho con sólo mirar.

Yogi Berra

*Cuida del negro y del rojo, de la sabiduría y
la palabra escrita, del libro y de la escritura,
llégate a la presencia de los prudentes,
de los sabios....*

Códice Florentino, Libro VI.

Lista de Figuras y Tablas.

Figuras	Página
1. Regiones de la proteína p21 ^{ras} .	12
2. Vía de señalización de ras.	14
3. Esquema de los plásmidos empleados para la transfección de las células.	24
4. Morfología de las células transfectadas.	33
5. Western blot de la proteína Ras mutada en los lisados celulares de algunas clonas.	34
6. Ensayo de quimioinvasión empleando como barrera Matrigel.	38
7. Ensayo de quimioinvasión retando a las clonas con 50 y 100 µg de Matrigel.	39
8. Formación de tumores en ratones nu/nu.	42
9. Curva de la determinación del volumen tumoral a lo largo del tiempo.	43
10. Aumento en volumen y peso del baso en los animales inoculados.	45
11. Comparación de pulmones con y sin metástasis.	48
12. Patrón de las gelatinasas secretadas por las diferentes clonas.	52
13. Actividad gelatinolítica de la gelatinasa A y B entre las líneas celulares y los tumores	53
14. Actividad gelatinolítica de gelatinasas de 111 kDa y 58 kDa	55
15. Análisis inmunohistoquímico de Nm23 en las clonas transfectadas.	58
16. Análisis inmunohistoquímico de Nm23 en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas.	59
17. Análisis inmunohistoquímico de Nm23 en las metástasis generados por las clonas transfectadas.	60
18. Cortes Histológicos de pulmones con metástasis teñidos con H-E.	64

Tablas**Página**

1. Número de colonias en agar	36
2. Desarrollo tumoral en los ratones inoculados subdérmicamente.	44
3. Desarrollo de metástasis en los ratones et/et inoculados por vía intravenosa.	47
4. Análisis densitométrico de la secreción de gelatinasas	54
5. Análisis de la inmunotinción para nm23 realizada en las clonas, en los tumores y en las metástasis	61
6. Características histopatológicas de los tumores desarrollados en los ratones.	63

Resumen.

El desarrollo y generación de metástasis conlleva una serie de cambios en las células neoplásicas, entre los que se encuentran un aumento en la proliferación celular, aumento en la movilidad, incremento en la secreción de enzimas, pérdida de la inhibición por contacto, así como cambios en la expresión de genes supresores y oncogenes. El gen *nm23* es considerado un gen supresor de metástasis, ya que se ha observado que su ausencia en diferentes tumores humanos correlaciona con una mayor probabilidad de desarrollar metástasis, mientras que su presencia es un factor protector. La proteína Nm23 posee actividad de nucleosido difosfato cinasa, regulando los niveles de nucleósidos trifosfatados, y toda reacción celular que requiera de éstos, como son la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN, polimerización de proteínas de citoesqueleto, y en la transducción de señales. A pesar de ello, no se sabe como es que suprime el comportamiento metastásico en las células tumorales. Por otro lado, el oncogen *ras* se le ha relacionado de manera muy estrecha con la capacidad metastásica de las células tumorales. Sin embargo, la relación entre *nm23* y *ras* es poco clara. Diversos trabajos demuestran una relación inversa en la expresión de ambos genes. Estudios *in vitro* en células transformadas con *ras* presentan una disminución en la presencia de Nm23, así como un aumento en la capacidad metastásica, la pérdida de Ras con un concomitante aumento del gen supresor. Estudios *in vivo* empleando ratones también se observa esta relación inversa. ya que la región de control de *nm23* presenta dos sitios AP1, y diversos datos *in vitro* e *in vivo* indican Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y expresión de *nm23* en fibroblastos murinos (NIH 3T3) transfectados con el gen *ras*, tanto en su forma normal como en su forma oncogénica. De estas células se obtuvieron diferentes clones donde fueron evaluados los siguientes parámetros de transformación: independencia de anclaje, velocidad de proliferación, capacidad de atravesar membranas basales sintéticas (Matrigel), secreción de metaloproteasas y se realizaron ensayos *in vivo* empleando ratones nu/nu (atímicos), ratones NIH y ratones e1/e1 (hipotímicos) para generar tumores primarios y metástasis, valorando en éstos la secreción de proteasas y la expresión de Nm23 por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que la expresión de gelatinasas cambia al transformarse las células, aumentando ésta de manera estadísticamente significativa. Al

comparar la expresión de éstas enzimas con la secreción producida por los tumores en los ratones, se observó que ésta aumenta en las células que generan tumores. Estos resultados correlacionaron con una mayor proliferación, un aumento en el paso de las células al ser retadas con matrigel, aunque no se encontró una diferencia clara con la independencia de andaje. Al determinar inmunohistoquímicamente la presencia de Nm23, ésta disminuye en las células metastásicas en comparación con los tumores primarios. Por lo que podemos concluir por los resultados en nuestro modelo, que Nm23 al parecer correlaciona con la presencia de Ras, pero se pierde con la agresividad tumoral, lo que indica que *nm23* es un gen supresor metastásico.

Abstract.

The *nm23* gene was recently identified as a tumor metastasis suppressor gene. Alteration of expression levels of the *nm23* has been correlated with metastatic development. Decrease levels of nm23 protein or RNAm in breast cancer, hepatocellular carcinoma, melanoma, neuroblastoma and gastric carcinoma correlated with an increase in the tumoral metastasis. However, these same tumors shown controversial results. The *ras* oncogene expression is related with metastatic ability of the tumoral cells. For elucidate the relation between *nm23* and *ras* in the tumoral progression, we transfected the *c-H-ras* wild type or *c-H-rasval12* genes in NIH 3T3 cells, and we analyzed different parameters that are considered important for determining biological aggressiveness of the tumoral cells, such as tumor growth, soft-agar colonization, metalloproteinases expression, *in vitro* and *in vivo* invasion, tumor latency and metastasis generation in atimic, NIH and hypotimic mice. The Nm23 expression was analyzed by immunohistochemical assay. The *rasval12* transfection resulted in increased tumorigenesis and morphologically transformed NIH 3T3 cells, this it was associated with shortened tumoral latency and doubling times, and increased anchorage independent, *in vitro* Matrigel invasiveness, metalloproteinases expression (72 and 92 kDa) and experimental metastasis. A significant difference was showed in the total gelatinases expression between *raswt* clones and *rasval12* clones ($p < 0.005$). The wild type or pSV2 *neo* (control transfection) clones expresses Nm23 protein. Besides, both the *raswt* or *rasval12* transfected cell clones as subdermal tumors express markedly increases of Nm23 protein. However, protein reduced levels of *nm23*, it was observed in the lung-metastasis generated. Our data shown that *c-H-ras* gene modulate the *nm23* gene expression, but the development of metastatic potential is directly correlated with a reduction in Nm23-H1 immunohistochemical detection. It was not observed correlation between biological aggressiveness parameters and *nm23* expression.

These data support a model of *H-ras*-induced metastasis in NIH 3T3 transfected cells, that involves the modulation the expression of *nm23* gene in this cells, but only in tumoral cells with reduced levels of Nm23 were capable of generate metastasis, this it indicate that the cell populations with higher metastatic potential, they have a down-regulation or not expresses this protein, the reduction in nm23 expression is involved in metastasis. These suggest the suppressive role of *nm23*.

Introducción.

Generalidades.

El desarrollo tumoral involucra una secuencia de pasos en los cuales la células cancerosas se independizan del huésped, invaden los tejidos adyacentes y colonizan otros lugares a distancia (Nicolson, 1979; Feldman *et al.*, 1988; Weinberg, 1996). Durante este proceso ocurren múltiples alteraciones genéticas que tienen un efecto acumulativo sobre la pérdida del control de la diferenciación de la célula, la división celular y el crecimiento (Nicolson, 1987). Esta serie de cambios modifican en gran manera tanto la morfología como la conducta biológica tumoral, por lo que las células que constituyen un tumor, en comparación con una célula normal, exhiben múltiples diferencias en inmunogenicidad, cariotipo, producción de diferentes compuestos de exportación, contenido de receptores, rango de crecimiento, entre otros (Ossowski *et al.*, 1980). Esto es resultado de la pérdida del balance entre genes inhibidores y genes estimuladores del desarrollo tumoral. Los genes transformantes o estimuladores son colectivamente llamados *oncogenes*, y sus productos son efectores positivos de la transformación ya que originan una ganancia de funciones. Dominan la actividad en la célula y dan como resultado el fenotipo transformado, favoreciendo el desarrollo y proliferación celular (Buckley, 1991; Evans, 1991; Cooper, 1995). Los productos de los *genes supresores* son reguladores negativos del crecimiento y la pérdida de su función resulta en la expresión del fenotipo transformado (Marshall, 1991b). En general, son recesivos y para que sobrevenga la transformación celular es necesario que ocurra pérdida de heterocigocidad (Levine, 1992).

El resultado de los eventos que propician la activación de los oncogenes y la pérdida de la función de los genes supresores es la aparición de un significativo número de células las cuales poseen características únicas para la diseminación, implantación, invasión, sobrevivencia y desarrollo en sitios secundarios al tumor primario (Nicolson, 1979; Feldman *et al.*, 1988). Estas células con capacidad de invasión a distancia, o *metástasis*, más que el tumor inicial, constituyen la gran amenaza del cáncer, ya que en general, se ha considerado este comportamiento como la característica principal de un tumor maligno biológicamente agresivo y son la principal causa de muerte de los pacientes con ésta enfermedad (Nicolson, 1979; Nicolson, 1987; Ruoslahti, 1996). La metástasis esta conceptualizada como un proceso no azaroso, que involucra la selección y sobrevivencia de subpoblaciones celulares específicas que surgen por diversos eventos durante el desarrollo tumoral (Fodstad *et al.*, 1994; Price, 1994).

La aparición de colonias metastásicas depende de la interacción entre las células tumorales y múltiples factores del huésped. Durante el proceso metastásico, las células neoplásicas proliferan de manera incontrolada; invaden los tejidos adyacentes desarrollando nuevos vasos sanguíneos; penetran y viajan a través de vasos linfáticos y sanguíneos; y finalmente se extravasan e invaden un nuevo órgano blanco para formar nuevas colonias (Ruoslahti, 1996; Weinberg, 1996; Shingh *et al.*, 1996). Para que ocurra toda la cascada anterior, las células

metastásicas deben pasar inadvertidas por el sistema inmune del huésped, aumentar su movilidad, independizarse de factores de crecimiento, presentar nuevos receptores a nivel de membrana y secretar proteasas para invadir los tejidos adyacentes (Nicolson *et al.*, 1987; Liotta *et al.*, 1989). Ello lleva a que las células presenten una serie de cambios, tanto fenotípicos como genéticos para poder formar las metástasis (Ossowski *et al.*, 1980; Eccles, 1985; Needham, 1991).

Existen ejemplos claros de genes que están involucrados en el desarrollo tumoral (Hill *et al.*, 1988; Bishop, 1991) y genes que suprimen el desarrollo neoplásico (Patterson, 1992). Sin embargo, son pocos los estudios que analizan los genes involucrados en la adquisición de la conducta metastásica (Patterson, 1992). Recientemente, se ha puesto atención sobre el control genético de las metástasis por vía de la activación y/o desactivación de genes específicos, denominados como genes moduladores (Sobel, 1990). Estos influyen sobre las propiedades tumorales como la invasividad, susceptibilidad a metastatizar, en la habilidad de generar una respuesta inmune, e incluye tanto genes que favorecen el fenotipo metastásico como genes que lo suprimen (Sobel, 1990). Los genes que participan de manera directa en la adquisición del comportamiento metastásico o "metastagenes", aumentan la posibilidad de que las células tumorales adquieran las características para ser invasivas. Ejemplos de este tipo de genes son *LM59* y *GM21*, los cuales se han descrito en modelos murinos (Evans, 1991; Patterson, 1992).

En el caso del control genético de las metástasis por vía de la desactivación de genes específicos, se han reportado la presencia de genes supresores de metástasis. Este tipo de genes son diferentes a los genes supresores de tumor, ya que en particular, inhiben el desarrollo de las metástasis (Sobel, 1990). Entre estos genes se encuentran receptores de membrana (como el de la laminina) (Wewer *et al.*, 1987), proteínas de adhesión, inhibidores de proteasas (TIMPs), factores de movilidad autócrinos, genes involucrados en el reconocimiento inmune (MHC) y genes involucrados directamente en el comportamiento metastásico como *WDM1* y *WDM2* en ratones (Evans, 1991; Sobel, 1990), o en humanos *kai1* o *nmb* (Dong *et al.*, 1995; Weterman *et al.*, 1995).

A pesar de la importancia clínica de las metástasis tumorales, este proceso ha sido poco elucidado a nivel molecular, debido probablemente, a que se trata de un fenómeno *in vivo per se* y el cual es resultado del descontrol de varios productos génicos. El estudio de genes que promuevan o inhiban el proceso metastásico abre la posibilidad de plantear no solo nuevas alternativas de marcadores que den luz acerca del complejo proceso metastásico, sino además si éstos pueden jugar un papel en la predicción sobre el posible comportamiento biológico de un tumor y el desarrollo de nuevos enfoques de terapia de ésta enfermedad, lo cual justifica su estudio por dos razones: a) es poco lo que se conoce acerca del papel de los genes supresores en el proceso metastásico, y b) pese a el avance del manejo clínico de los tumores neoplásicos, la mayoría de los pacientes que mueren de esta enfermedad es a causa de las metástasis generadas por el tumor primario (Nicolson *et al.*, 1979).

Características generales de la familia de genes *nm23*.

Entre los genes supresores de metástasis se encuentra *nm23*, el cual fue aislado originalmente por sondeo diferencial de una biblioteca genómica de cDNA (Steege *et al.*, 1988a). El gen pertenece a una familia de genes que se expresan diferencialmente en diversos modelos metastásicos, de tal forma que en tumores que sobre-expresan dicho gen, presentan una disminución en el desarrollo de las metástasis, y viceversa, es decir, a menor expresión una mayor capacidad de generar colonias en sitios distantes.

La familia se encuentra constituida hasta el momento por 6 genes: *nm23-H1* (Steege *et al.*, 1988a), *nm23-H2* (Stahl *et al.*, 1991), *Dr-nm23* (Martínez *et al.*, 1997), *nm23-H4* (Milon *et al.*, 1997), *nm23-H5* (Munier *et al.*, 1998), *nm23-H6* (Tsuiki *et al.*, 1999) y otro probable miembro el cual se une a la chaperona constitutiva de 70 kDa (Heat shock cognate protein, Hcp 70) (Leung *et al.*, 1997). También se han descrito otras proteínas semejantes asociadas a membrana citoplásmica (Kimura *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 1988). Las proteínas Nm23-H1, Dr-Nm23, Nm23-H5 y la asociada a Hcp 70 se localizan en el citoplasma celular (Martínez *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 1997); mientras que Nm23-H4 y Nm23-H6 (Milon *et al.*, 1997; Tsuiki *et al.*, 1999) se localizan en la mitocondria, y Nm23-H2 en el núcleo celular (Milon *et al.*, 1997). Al parecer, todas (a excepción de H5) poseen actividad de nucleosido difosfato cinasa (NDPK, Nucleoside Diphosphate kinase), es decir, transfieren el fosfato de nucleósidos trifosfatados a nucleósido difosfatados, mediante una reacción de ping-pong (Gilles *et al.*, 1991):



Donde N_1TP y N_2TP son dos nucleósidos trifosfatados diferentes y NDPK es la enzima sin fosforilar y NDPK-P es la enzima fosforilada.

Entre estas proteínas existe una homología que va del 27% al 80% (Stahl *et al.*, 1991; Milon *et al.*, 1997; Munier *et al.*, 1998), y sus pesos moleculares oscilan entre 16 y 20 kDa (Milon *et al.*, 1997). Su localización en el genoma humano es diverso: *nm23-H1* y *nm23-H2* en el cromosoma 17 q21-22 (Varesco *et al.*, 1992), *Dr-nm23* en el cromosoma 16q13 (Martínez *et al.*, 1997), *nm23-H4* en el cromosoma 16p13.3 (Milon *et al.*, 1997) y *nm23-H5* en el cromosoma 5q23-31 (Munier *et al.*, 1998). Todos los genes *nm23* se encuentran altamente conservados a lo largo de la escala filogenética (Troll *et al.*, 1993), siendo similar la NDPK de humano en un 78% al gen *awd* de *Drosophila* (Biggs *et al.*, 1990), un 77% al gen *gip17* de *Dictyostelium* (Wallet *et al.*, 1990) y un 40%

a la NDPK de *Escherichia coli* (Engel *et al.*, 1998), lo cual sugiere que las funciones que llevan a cabo son de vital importancia (Biggs *et al.*, 1990).

Por su actividad de nucleosido difosfato cinasa, Nm23 participa en el mantenimiento del nivel celular de nucleósidos trifosfatados, así como de interaccionar con cualquier proteína que requiera de nucleósidos trifosfatados, particularmente con proteínas dependientes de GTP, como son las proteínas G (Kimura *et al.*, 1983; Lotta *et al.*, 1990; Bominaar *et al.*, 1993); en la síntesis y elongación de proteínas; en la polimerización de microtubulos como una proteína MAP (proteína asociada a microtubulos) (Wallet *et al.*, 1990), y como una probable proteína GAP (proteína activadora de GTPasa) (Hackestein *et al.*, 1992). La pérdida o disminución de la actividad de estas proteínas causaría severos daños en la función celular.

De la familia *nm23*, particularmente *nm23-H1* y *nm23-H2* son los mejor estudiados y descritos. De la información obtenida de este par de genes se sugiere que podrían participar en supresión del comportamiento metastásico.

a) *El gen nm23-H1 (NDPK A) y su proteína.* Este codifica a una proteína citoplásmica de 17 kD constituida de 152 aminoácidos (Leone *et al.*, 1991b), es ácida, y posee un punto isoeléctrico de 6.0 (Kimura *et al.*, 1988). La manera en que se encuentra normalmente es en forma hexamérica, la cual puede estar constituida únicamente por monómeros Nm23-H1, o formando heterohexámeros con Nm23-H2 en las siguientes combinaciones: 5:1, 4:2, 3:3, 2:4, ó 1:5, respectivamente. Como ya se menciono, posee actividad de nucleosido difosfato cinasa (EC2.7.4.6) y es en forma hexamérica como lleva a cabo esta función (Engel *et al.*, 1998).

Se han descrito en la proteína de *nm23* varios sitios de fosforilación: la histidina 118 involucrada en la actividad de nucleosido difosfato cinasa (MacDonald *et al.*, 1993; Bominaar *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1998); la serina 44, involucrada en la modulación de la capacidad metastásica (MacDonald *et al.*, 1993; Engel *et al.*, 1998); así como la serina 120 (Wagner *et al.*, 1997). Otro sitio importante es la prolina 96, la cual al mutarse en el gen *awd^{kpn}* de *Drosophila* genera anomalías durante el desarrollo embrionario de este organismo.

Datos recientes sugieren que esta proteína es capaz de tener una actividad de serin/treonin fosfo-transferasa, por lo cual presentaría una tercera reacción (Engel *et al.*, 1998):



Prot-Ser/Thr: proteína con aminoácidos serina y treonina

Prot-Ser/Thr-P: proteína con aminoácidos serina y treonina fosforilada

Al parecer la forma en que se lleva a cabo esta reacción es formando un complejo con

la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en una estequiometría de 1:1 (con un peso sumado de 37 kDa) (Engel *et al.*, 1998). Las implicaciones biológicas todavía no son determinadas, pero se sugiere que esta proteína (Nm23-H1) podría estar involucrada en la fosforilación de aquellas proteínas que para su función requieren ser fosforiladas en estos aminoácidos, como son las proteínas involucradas en la señalización (Engel *et al.*, 1998; Freije *et al.*, 1997). Interesantemente, Nm23-H1 es blanco de AMPc, compitiendo éste por el sitio de unión a ATP (Anciaux *et al.*, 1997); y citocinas como PGE₂, TNF- α y INF- γ reducen su expresión, dependiendo del tipo celular (Parhar *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1994). También algunos ácidos grasos polinsaturados pueden generar que se incremente su expresión (Jiang *et al.*, 1998).

La proteína Nm23-H1 se ha localizado en diferentes órganos como cerebro, bazo, corazón, pulmón, hígado, riñón, testículo, y músculo esquelético (Kimura *et al.*, 1990), así como en eritrocitos y linfocitos (Caligo *et al.*, 1995). Nm23 se expresa en etapa fetal temprana en ratón a los 8 días en todos los tejidos y luego va decayendo (Shi *et al.*, 1994).

También se ha sugerido que la proteína Nm23 ésta involucrada en el control del ciclo celular, ya que se ha observado que se mantiene en baja concentración durante G₀/G₁ y aumenta en fase S, encontrándose que su expresión se relaciona claramente con la actividad proliferativa (Caligo *et al.*, 1995). Otros datos que apoyan este hecho es que anticuerpos dirigidos contra Nm23 son capaces de inhibir la división celular al ser microinyectados en células en proliferación (Sorscher *et al.*, 1993). También se ha observado que esta involucrada en la modulación del huso mitótico, por lo que se le ha relacionado con la estabilidad génica de las células metastásicas (Biggs *et al.*, 1990; Steeg *et al.*, 1991a).

Por su capacidad de NDP cinasa, Nm23-H1 al parecer modula la movilidad celular inhibiéndola (Kantor *et al.*, 1993). Los aminoácidos Prol 96 y Ser 120 al ser mutados ocasionan que la proteína no inhiba el desplazamiento celular, lo que sugiere que ésta involucrada en este proceso (MacDonald *et al.*, 1996).

También se le ha identificado como un factor involucrado en la supresión de la diferenciación de células mieloides (Okabe-Kado *et al.*, 1992) y este efecto es independiente de la actividad de NDPk de esta proteína (Okabe-Kado *et al.*, 1995).

b) El gen nm23-H2 (NDPk B) y su proteína. La proteína Nm23-H2 posee un peso de 17-18 kDa con un punto isoelectrico básico (De La Rosa *et al.*, 1995). Se localiza en el núcleo celular y al parecer actúa como factor de transcripción del oncogén *c-myc* (Kraeft *et al.*, 1996). La His 118 involucrada en la actividad de nucleosido difosfato cinasa de Nm23-H1 y Nm23-H2 no esta involucrada en su papel como factor de transcripción de ésta última (Postel *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que Nm23-H2 se une a otros sitios promotores, como los de la ribonucleoproteína heterogénea K, los del EGF, TGF- β_3 , y el inhibidor del activador de plasminógeno (Pal-1)(Postel, 1996b). Inicialmente se pensó que la forma en que interactuaba la NDPK B con el DNA era formando zippers de leucina (Steege *et al.*, 1991a). Hoy se sabe que no es así, ya que al parecer dicha interacción, aunque si es dimérica, no es formando formas conocidas de asociación proteína-DNA (Postel *et al.*, 1996a). También se ha observado que en núcleo se asocia a la telomerasa, aunque no genera cambios en la actividad de esta enzima, por lo que no se sabe el papel biológico de esta interacción (Nosaka *et al.*, 1998).

El oncogen *ras*.

a) *Características del gen *ras* y su proteína.* El proto-oncogen *ras* pertenece a la familia de proteínas G (Macara *et al.*, 1996), la cuál está constituida por varios genes: H-*ras*, localizado en el cromosoma 12; K-*ras*, localizado en el cromosoma 13; N-*ras*, localizado en el cromosoma 1 y R-*ras*. Los tres primeros genes (N, H y K) presentan una estructura común constituida por 5 exones (Lowy *et al.*, 1993). En general, se expresan en todos los tejidos tanto adultos como fetales, aunque es en mayor proporción en estos últimos. La regulación transcripcional de los tres es tejido específico: K-*ras* en tejidos de origen epitelial, H-*ras* en tejidos de origen epitelial y mesenquimatoso, y N-*ras* en tejido nervioso (Maher *et al.*, 1995). No poseen caja TATA y presentan promotores ricos en nucleótidos GC (Lowy *et al.*, 1993).

Las proteínas Ras están constituidas por 189 aminoácidos, a excepción de K-*ras*, que por splicing alternativo puede generar dos tipos diferentes: K-*ras*-A de 188 aminoácidos y K-*ras*-B de 189 (Lowy *et al.*, 1993). Los tres sintetizan una proteína de 21 kDa con actividad de GTPasa denominada p21^{ras} (Cooper, 1995). Las proteínas generadas por los tres genes son homólogas en los primeros 164 aminoácidos, y presentan diferencias en los últimos 25 aminoácidos, región llamada heterogénea, con excepción de una cisteína en la posición 186 que es similar en estos genes (figura 1) (Lowy *et al.*, 1993).

p21^{ras} se sintetiza en el citoplasma celular en ribosomas libres como pro-p21^{ras} y su vida media es de 24 hrs (Gutiérrez *et al.*, 1990; Lowy *et al.*, 1991). La forma madura de la proteína Ras es resultado de modificaciones postraduccionales en el extremo carboxilo terminal, lo cual aumenta su hidrofobicidad en esta región. Ello logra que la proteína se una a la cara interna de la membrana citoplasmática, localización vital para la función de p21^{ras} (Hancock *et al.*, 1990; Lowy *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1995).

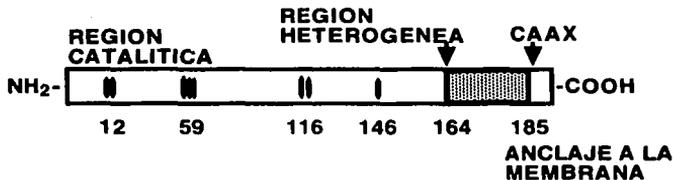


Figura 1. Regiones de la proteína p21^{ras}.

La región CAAX, conservada en todas las proteínas Ras, esta constituida por una cisteína (C) seguida de dos aminoácidos alifáticos o no polares (A) y a continuación cualquier otro aminoácido (X). La región heterogénea (■) es una secuencia de aminoácidos que varía entre los tres genes *ras*. Sitios de mutaciones frecuentes que activan las funciones de Ras (●).

b) *Función y regulación de las vías de señalización por Ras.* La proteína p21^{Ras} está involucrada en la transducción de señales provenientes de receptores transmembranales (Macara, 1996), participando como interruptor fisiológico que modula la actividad de una serie de enzimas blanco en respuesta a una variedad de señales. Su función es regulada por un ciclo de unión e hidrólisis de GTP (Cooper, 1995). Normalmente, el proceso de transducción de señales por parte de Ras inicia cuando un receptor de membrana es estimulado por algún factor de crecimiento, lo cual lleva a que dicho receptor se autofosforile (Cantley *et al.*, 1991)(figura 2). Dicha fosforilación es reconocida por proteínas adaptadoras (Grb2-SOS, figura 2)(Egan *et al.*, 1993; Chardin *et al.*, 1993; Olivier *et al.*, 1993; Pawson, 1994). Estas comunican la señal a Ras, favoreciendo la liberación del GDP y la unión a GTP, lo que genera que Ras pase de su forma inactiva (Ras-GDP) a la activa (Ras-GTP)(Vendettis *et al.*, 1994; Marshall, 1996).

Posteriormente, p21^{Ras} transduce la señal a diferentes moléculas denominadas efectores de Ras (Marshall, 1996). La activación de la vía de señalización de Ras puede ser de forma directa, interaccionando explícitamente p21^{Ras} con el efector; o por reclutamiento, ya sea por la activación de componentes de membrana plasmática o por asociación con sustratos en membrana plasmática (Marshall, 1996). Entre las múltiples vías de señalización de Ras se encuentran: a) la cascada de serin/treonin cinasas activadas por Raf (MAPk/MEKk-ERK), los cuales a su vez encienden una cascada de proteínas cinasas que transmiten la señal al núcleo (Treisman, 1996) (figura 2); b) también Ras media la señal a través de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-k) (Sjölander *et al.*, 1991; Kiss *et al.*, 1995); c) a través de factor intercambiador de guanina Ral/GDS, d) y por medio de PKC (Müller *et al.*, 1993). La forma en que Ras controla estas vías todavía es incierto (Maruta *et al.*, 1994; Macara *et al.*, 1996). Las señales transmitidas a través de Ras pueden mediar la diferenciación o proliferación dependiendo del tipo de célula y del receptor transmembranal.

Una vez que Ras ha transducido la señal, p21^{Ras} es capaz de hidrolizar el GTP al cual se halla unido y pasar a la forma inactiva o unida a GDP. Esto se lleva a cabo gracias a que intrínsecamente Ras presenta la actividad de GTPasa y a la participación de proteínas denominadas activadoras de GTPasa o GAPs (GTPase activating proteins), las cuales aceleran la hidrólisis del GTP por parte de Ras, los cuales son reguladores negativos de Ras (Lowy *et al.*, 1991). Cabe señalar, que en particular, la vía MAPk/MEKk-ERk transmite las señales mediante fosforilaciones en serina y treonina de la cascada de proteínas Raf, Ral, MEK1 y 2, MAPK1, MAPK2 y RSK, hasta llegar al núcleo (Maruta *et al.*, 1994) (figura 2). Al término de esta cascada se activan algunas proteínas nucleares entre las cuales se encuentran factores de transcripción como Jun y Myc (figura 2), permitiendo el encendido de genes cuyos sitios de control poseen sitios de unión a proteínas AP1/ets (Müller *et al.*, 1993; Maruta *et al.*, 1994; Macara *et al.*, 1996; Treisman, 1996).

b) *Función y regulación de las vías de señalización por Ras.* La proteína p21^{Ras} esta involucrada en la transducción de señales provenientes de receptores transmembranales (Macara, 1996), participando como interruptor fisiológico que modula la actividad de una serie de enzimas blanco en respuesta a una variedad de señales. Su función es regulada por un ciclo de unión e hidrólisis de GTP (Cooper, 1995). Normalmente, el proceso de transducción de señales por parte de Ras inicia cuando un receptor de membrana es estimulado por algún factor de crecimiento, lo cual lleva a que dicho receptor se autofosforile (Cantley *et al.*, 1991)(figura 2). Dicha fosforilación es reconocida por proteínas adaptadoras (Grb2-SOS, figura2)(Egan *et al.*, 1993; Chardin *et al.*, 1993; Olivier *et al.*, 1993; Pawson, 1994). Estas comunican la señal a Ras, favoreciendo la liberación del GDP y la unión a GTP, lo que genera que Ras pase de su forma inactiva (Ras-GDP) a la activa (Ras-GTP)(Vendettis *et al.*, 1994; Marshall, 1996).

Posteriormente, p21^{Ras} transduce la señal a diferentes moléculas denominadas efectores de Ras (Marshall, 1996). La activación de la vía de señalización de Ras puede ser de forma directa, interaccionando explícitamente p21^{Ras} con el efector; o por reclutamiento, ya sea por la activación de componentes de membrana plasmática o por asociación con sustratos en membrana plasmática (Marshall, 1996). Entre las múltiples vías de señalización de Ras se encuentran: a) la cascada de serin/treonin cinasas activadas por Raf (MAPK/MEKk-ERk), los cuales a su vez encienden una cascada de proteínas cinasas que transmiten la señal al núcleo (Treisman, 1996) (figura 2); b) también Ras media la señal a través de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3-k) (Sjölander *et al.*, 1991; Kiss *et al.*, 1995); c) a través de factor intercambiador de guanina Ral/GDS, d) y por medio de PKC (Müller *et al.*, 1993). La forma en que Ras controla estas vías todavía es incierto (Maruta *et al.*, 1994; Macara *et al.*, 1996). Las señales transmitidas a través de Ras pueden mediar la diferenciación o proliferación dependiendo del tipo de célula y del receptor transmembranal.

Una vez que Ras ha transducido la señal, p21^{Ras} es capaz de hidrolizar el GTP al cual se halla unido y pasar a la forma inactiva o unida a GDP. Esto se lleva a cabo gracias a que intrínsecamente Ras presenta la actividad de GTPasa y a la participación de proteínas denominadas activadoras de GTPasa o GAPs (GTPase activating proteins), las cuales aceleran la hidrólisis del GTP por parte de Ras, los cuales son reguladores negativos de Ras (Lowy *et al.*, 1991). Cabe señalar, que en particular, la vía MAPK/MEKk-ERk transmite las señales mediante fosforilaciones en serina y treonina de la cascada de proteínas Raf, Ral, MEK1 y 2, MAPK1, MAPK2 y RSK, hasta llegar al núcleo (Maruta *et al.*, 1994) (figura 2). Al término de esta cascada se activan algunas proteínas nucleares entre las cuales se encuentran factores de transcripción como Jun y Myc (figura 2), permitiendo el encendido de genes cuyos sitios de control poseen sitios de unión a proteínas AP1/ets (Müller *et al.*, 1993; Maruta *et al.*, 1994; Macara *et al.*, 1996; Treisman, 1996).

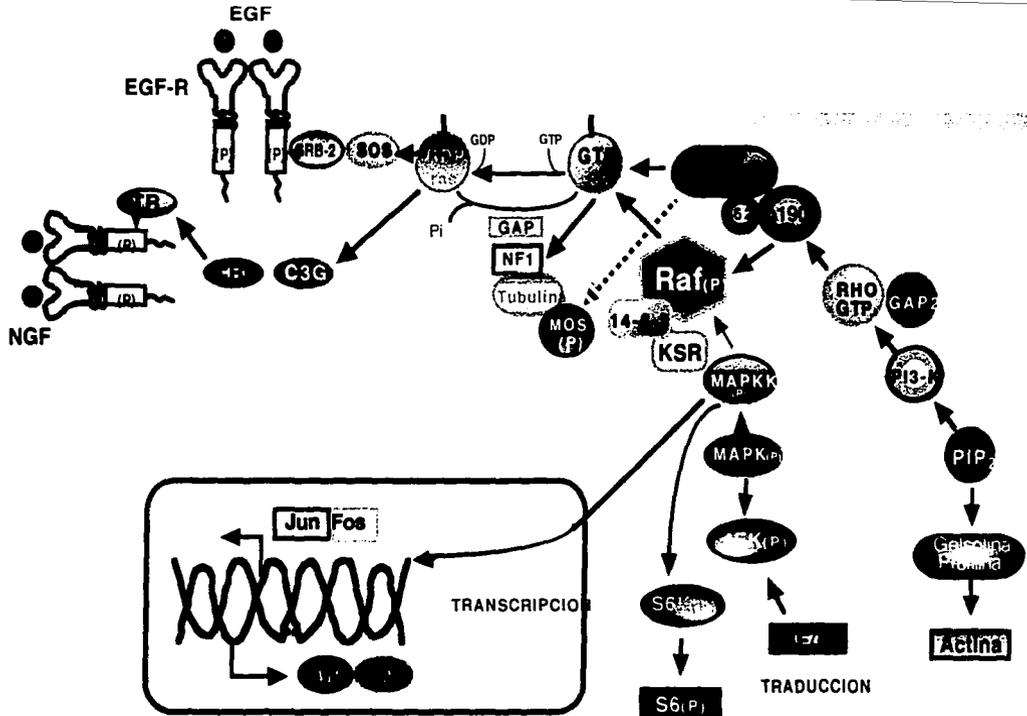


Figura 2. Vía de señalización de Ras.

En la figura se muestra algunas de las rutas más importantes de la vía de señalización de Ras, así como sus integrantes (tomado Treisman *et al.*, 1996 y Xing *et al.*, 1997; con modificaciones).

Metaloproteasas.

Las metaloproteasas (MMP) comprenden una familia multigénica, cuyas proteínas se caracterizan por tener la capacidad de degradar componentes de membrana basal y de matriz extracelular. Estas enzimas son secretadas o son exportadas en forma de proteínas transmembranales como proenzimas y requieren ser activadas para ejercer su acción. Su actividad es regulada en tres formas: a) A nivel de expresión, siendo estimuladas por TGF- β , IL-1, TNF- α o PDGF (Matrisian, 1992; Mauviel, 1993); b) en su activación, ya que requieren de se cortadas (zimógeno) con otras enzimas (Seiki, 1996); y/o c) liberándose de su correspondiente inhibidor tisular (Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)(Matrisian, 1990; Seiki, 1996; Baker *et al.*, 1998). Poseen en sus sitios activos un ion de Zinc, requiriendo como cofactor Calcio (Murphy *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1996).

La familia de MMPs esta dividida en tres clases de acuerdo a la especificidad de su substrato: a) **colagenasas**, que degradan colágenas fibrilares; b) **gelatinasas**, las cuales degradan colágenas de membrana basal y c) **estromelisin**, que degradan proteoglicanos y glicoproteínas (Ray *et al.*, 1994).

La función normal de estas enzimas es la reparación y remodelación tisular (Matrisian, 1990; Sreenath *et al.*, 1992). Las metaloproteasas se han encontrado frecuentemente sobreexpresadas en una gran variedad de tumores (Seiki, 1996). En particular, la gelatinasa A de 72 kDa o MMP-2 y la gelatinasa B de 92 kDa o MMP-9 son de las más ampliamente estudiadas. Ambas degradan gelatina, colágena IV, V, y elastina, aunque la gelatinasa A puede degradar además colágena VII, X y fibronectina. Las proenzimas o formas inmaduras cambian su peso molecular al activarse de 92 a 82-83 kDa en el caso de la gelatinasa B, y de 72 a 62-52 kDa en el de la gelatinasa A (Matrisian, 1992).

La activación de ambas enzimas es importante en la invasión tumoral y metástasis. La aparición de la forma activa de la gelatinasa A y B en los tejidos tumorales se ha asociado con estados avanzados de diferentes carcinomas humanos (Seiki, 1996). El desbalance entre niveles de secreción de metaloproteasas y TIMPs, y una mayor activación de las enzimas puede llevar al desarrollo tumoral y angiogénesis (Lokeshwar *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1998).

La secreción de estas enzimas en tumores humanos se ha asociado a un comportamiento biológico tumoral agresivo (Lokeshwar *et al.*, 1993; Sugiura *et al.*, 1998), así como un marcador del comportamiento tumoral (Garbisa *et al.*, 1992; Moses *et al.*, 1998). Particularmente, la expresión de este tipo de proteasas se ha relacionado con tumores con mayor invasividad y mayor capacidad metastásica (Sreenath *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1994; Théret *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1998).

La evaluación de la expresión de estas proteasas ha correlacionado con el potencial invasivo y metastásico de las células tumorales (Kolkhorst *et al.*, 1998) y por ello se ha empleado como un factor discriminador de potencial invasor (Kolkhorst *et al.*, 1998).

Antecedentes.

Participación de *nm23* y *ras* en el proceso metastásico.

a) *Papel de nm23*. La capacidad supresiva del desarrollo metastásico de *nm23* se sugirió al encontrarse tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* reducciones de la expresión de este gen en tumores que presentaban una capacidad metastásica alta, de tal forma que al parecer su presencia inhibe el desarrollo metastásico (Steeg *et al.*, 1988; Rosengard *et al.*, 1989; Lacombe *et al.*, 1991; De La Rosa *et al.*, 1995). Cabe aclarar, que Nm23 no es capaz de inhibir el potencial celular de generar tumores primarios (Leone *et al.*, 1991b). La transfección del cDNA de *nm23* en líneas celulares metastásicas de melanoma (B16-F0) reduce significativamente su potencial metastásico (Leone *et al.*, 1991b).

Diversas evidencias sugieren que la forma en que *nm23* suprime la formación de metástasis podría ser alterando la comunicación celular, alterando el huso acromático durante la mitosis (Biggs *et al.*, 1990; Evans, 1991), generando cambios en el citoesqueleto e inhibiendo la movilidad celular (Kantor *et al.*, 1993). Por ser una nucleósido difosfato cinasa, podría estar involucrada en mantener el nivel de nucleósidos trifosfatados, particularmente GTP, activando proteínas G así como microtubulos (Bominaar *et al.*, 1993; De La Rosa *et al.*, 1995), lo cual estaría implicado en la transducción de señales así como en la división celular. Se ha observado que la sobreexpresión de *nm23* en las células genera una disminución a la respuesta a factores de crecimiento como TGF- β (De La Rosa *et al.*, 1995). Por su semejanza con *awd* y *gip17*, se sugiere que puede estar involucrada en el desarrollo y diferenciación celular (Biggs *et al.*, 1990; Wallet *et al.*, 1990), y participar en el ciclo celular (Sorscher *et al.*, 1993; Caligo *et al.*, 1995).

El papel *in vivo* de *nm23* en tumores humanos ha sido analizado después del seguimiento de pacientes con cáncer, al correlacionar la presencia de esta proteína con un mayor tiempo libre de enfermedad y presentar una conducta biológica tumoral menos agresiva. En el caso de *nm23-H1*, la disminución de su expresión se ha asociado con el desarrollo de metástasis y/o pobre curso clínico de pacientes con tumores de mama (Bevilacqua *et al.*, 1989; Wallet *et al.*, 1990; Slamon, 1991; Henessy *et al.*, 1991; Hirayama *et al.*, 1991), carcinoma

ovárico (Mandal et al., 1994), carcinoma cérvico uterino (Marone et al., 1996), de tiroides (Aral et al., 1993), carcinoma gástrico (Kodera et al., 1994), carcinoma hepatocelular y melanoma (Florenes et al., 1992; De La Rosa et al., 1995). Sin embargo, existen reportes en estos mismos tumores que muestran resultados controversiales (Lacombé et al., 1991; Haut et al., 1991; Sastre-Garau et al., 1992; Luo et al., 1993; Myeroff et al., 1993; Sawan et al., 1994; Kristensen et al., 1996). En otras neoplasias como en carcinoma de pulmón (Higashiyama et al., 1992; Engel et al., 1993), de colon, de próstata (Igawa et al., 1994; Fishman et al., 1994), de tiroides (Zou et al., 1993) y de riñón, no se ha encontrado relación entre la presencia de *nm23* y el desarrollo metastásico (De La Rosa et al., 1995; Freije et al., 1996); mientras que en tumores de páncreas, neuroblastomas y oligodendrogliomas su presencia correlaciona con una mayor agresividad metastásica (De La Rosa et al., 1995).

En el caso de *Nm23-H2*, su presencia se ha correlacionado menos con la supresión de metástasis en comparación con *Nm23-H1*, aunque en algunos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha encontrado cierta relación entre la presencia de ésta proteína y una menor capacidad metastásica (Henderson, 1993; Marone et al., 1996; Fishman et al., 1994; Mandal et al., 1994; Ji et al., 1995).

b) Participación de ras en la transformación celular. La activación y sobreexpresión de *ras* no sólo son pasos críticos en la carcinogénesis, sino también podrían ser en parte, responsable de la adquisición de algunas de las características de invasividad y de formar metástasis por parte de las células tumorales. El hecho de que cerca del 15 al 30 % de los tumores humanos presentan a *ras* mutado y que su activación favorece el desarrollo del fenotipo metastásico (Cooper, 1995), sugiere que su participación es preponderante en el progreso tumoral, por lo que se le ha propuesto como un elemento trascendental en el desarrollo metastásico (Nicolson, 1987; Sobel, 1990).

Mutaciones puntuales en *ras* en los codones 12,13, 59, 61, 63, 116, 117, 119 y 146 generan la forma oncogénica o activa del gen (Cooper, 1995). Como ya se explicó anteriormente, la proteína producto del proto-oncogen lleva a cabo la hidrólisis de GTP y

queda en su estado inactivo. Sin embargo, las formas mutadas u oncogénicas de *ras* generan una proteína que no es capaz de hidrolizar al GTP, quedando unido este nucleósido trifosfatado a la proteína por mucho más tiempo, y por ello transduciendo la señal continuamente (Marshall, 1991a). El papel destacado que juega *ras* en la transformación celular se debe en gran medida por encontrarse en el inicio de las vías de señalización de las que forma parte (Hunter, 1997), así como las múltiples funciones que posee (White *et al.*, 1995). La forma en que *ras* contribuye al progreso tumoral es aumentando la invasividad celular, tanto por el incremento en la secreción de proteasas (Spinucci *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1993a; Meade-Tollin *et al.*, 1998), como por una disminución de sus inhibidores (TIMPs)(Chambers *et al.*, 1993a); favorece el movimiento celular, por la secreción de factores autócrinos de movilidad y cambios a nivel de citoesqueleto (actina)(Seiki *et al.*, 1991; Hunter, 1997); promueve la independencia de anclaje y disminuye la afinidad de receptores a adhesinas (Hunter, 1997; Hajnal *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1997); regula negativamente la apoptosis, tanto por disminución de receptores como Fas (Arends *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1995; Fenton *et al.*, 1998), como mediante el secuestro de Bad por Rsk (Bonni *et al.*, 1999); favorece la generación de metástasis, aumentando el anclaje de las células a la membrana basal de los endotelios (Sobel, 1990; Chambers *et al.*, 1993b); y finalmente, aumenta la expresión de oncogenes que participan como factores de transcripción como *jun*, *fos* y *NFκB* (Chambers *et al.*, 1993a; Koong *et al.*, 1994; Cooper, 1995).

Cabe señalar, que la transformación celular generada por *ras* requiere de la cooperación de otros oncogenes como *myc* (Lu *et al.*, 1992; Greene *et al.*, 1995) o *erbB* (Husain *et al.*, 1989), o de la pérdida de genes supresores como p16^{INK4a} o p53 (Levine, 1992; Serrano *et al.*, 1997).

c) *Relación entre ras y nm23*. Existen varios trabajos en donde se relaciona la expresión de *nm23* con la presencia de Ras. Uno de los primeros reportes en donde se asoció a *nm23* como supresor metastásico fue en fibroblastos embrionarios de rata (células REF) transfectados con *ras*. Al cotransfectar éstas células con el gen *E1a* de adenovirus se observó un aumento de la expresión de *nm23* y una disminución en la capacidad

metastásica (Steeg *et al.*, 1988). Esta observación también fue corroborada por Su y col. (1993), los cuales al transfectar fibroblastos de rata (células CREF) con *ras*, observaron un aumento del RNAm de varios genes relacionados con un comportamiento tumoral agresivo, como la gelatinasa de 92 kDa, Osteopontina, transina, tenascina y cripto, junto con la disminución de *nm23-H1* y TIMP-1 (en comparación con las células silvestres). Estos resultados correlacionaron con un incremento en la capacidad metastásica, mayor independencia de anclaje y una disminución de la inhibición por contacto (Su *et al.*, 1993).

Sin embargo, otros reportes han dado resultados contradictorios. Honoki y col. (1993) empleando células derivadas de osteosarcomas (células SOS) encuentran un aumento de los transcritos de *ras* y NDP cinasa (*nm23*); concomitantemente con la capacidad metastásica de dichas células, lo cual no ocurre con otro oncogen como *c-myc* (Honoki *et al.*, 1993). Chambers (1993), en un artículo de revisión comenta que en células NIH 3T3 transfectadas con *ras*, encuentran que *nm23* aumenta en células metastásicas (Chambers *et al.*, 1993). Cabe señalar, que ya se ha identificado y caracterizado la región promotora de *nm23-H1*, encontrándose que esta posee sitios AP-1, TFIID, TIS, CTF/NF1, ACAAAG y Ets (Chen *et al.*, 1994; De la Rosa *et al.*, 1996), comprobándose que los sitios CTF/NF1 pueden controlar la expresión de éste gen (De la Rosa *et al.*, 1996), así como este promotor puede unir proteínas AP-1 (Chen *et al.*, 1994). Estos datos sugieren, que *nm23* podría ser regulado por la vía de señalización de *ras*.

También este gen supresor se le ha relacionado con otros oncogenes, particularmente a *nm23-H2* como factor de transcripción del oncogen *c-myc* (Kraeft *et al.*, 1996), uniéndose a -142 y -115 pares de bases del sitio de inicio de transcripción (Postel *et al.*, 1991). Dicho sitio es hipersensible a nucleasas (Berberich *et al.*, 1995) y la proteína interactúa con una región polipirimídica GGGTGGG (Hildebrandt *et al.*, 1995; Postel *et al.*, 1996a). Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la presencia de ambos genes y el desarrollo tumoral (Honoki *et al.*, 1993).

A pesar de que se conoce bastante acerca de Nm23-H1 y Nm23-H2, no es claro su posible papel en el desarrollo tumoral (Rosengard *et al.*, 1989; Coligo *et al.*, 1992; Onheda *et al.*, 1994); y los estudios en pacientes presentan resultados contradictorios, en los cuales se ha reportado

a Nm23 como supresor metastásico, o se asocia su presencia con un comportamiento tumoral agresivo (Slamon, 1991; Lacombe *et al.*, 1991; Haut *et al.*, 1991; Sastre-Garau X *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Myeroff *et al.*, 1993; Flørenes *et al.*, 1992).

Dado que no se ha determinado como la expresión del gen *nm23* inhibe la capacidad de invasión de las células metastásicas y como podría interaccionar con el gen *ras*, se propone el estudio de estos genes en un modelo *in vitro*, transformando fibroblastos normales de ratón *NIH 3T3* con el oncogen *ras*. Una vez obtenidas éstas células evaluar mediante ensayos de invasión *in vitro* e *in vivo* como se modifica la capacidad de invasión de éstas y correlacionarlo con la presencia de Nm23.

Hipótesis.

Dado que el producto del gen *nm23* se ha considerado como un supresor de metástasis y que el oncogen *ras* induce de manera activa éste proceso, se esperaría que la presencia de ambas proteínas antagonizarán en el comportamiento metastásico.

Objetivo.

Determinar la presencia de *nm23* en células 3T3 NIH transformadas con el oncogen *H-ras*, y correlacionarlo con el comportamiento biológico tumoral.

Objetivos particulares.

- a.- Determinar la expresión de metaloproteasas, independencia de anclaje y la capacidad de invasión en las células transfectadas mediante ensayos de invasión *in vitro*.
- b.- Determinar la capacidad de generar tumores primarios así como metástasis de las células transfectadas *in vivo*.
- c.- Determinar la expresión de proteasas de los tumores generados *in vivo*.
- d.- Analizar inmunohistoquímicamente la presencia de Nm23 en las células transfectadas y en los tumores generados por éstas.
- e.- Correlacionar las células transfectadas con c-H-*ras* *gly12* (*ras* normal) o c-H-*ras* *val12* (*ras* mutado) y la presencia de Nm23 con los hallazgos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Material y Métodos.

Obtención de las células transformadas.

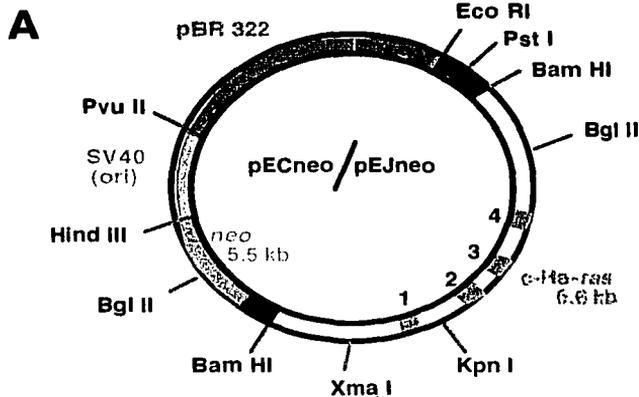
a) *Células y cultivo celular:* Se emplearon las siguientes líneas celulares: fibroblastos de ratón NIH 3T3, células de cáncer de vejiga T24, y células epiteliales de carcinoma mamario humano MCF7, ambas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron en monocapa en Medio Mínimo Esencial Dulbecco F12 (DMEM-F12, GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) y complementado con penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (GIBCO). Para cosechar las células se empleó solución de tripsina-EDTA (0.25% tripsina y 1mM EDTA, Sigma Chemical Co, St. Luis, MO) en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), deteniendo la reacción con solución amortiguadora de fosfatos adicionada con albúmina al 1% (albúmina Fracción V, Sigma). El conteo y la verificación de la viabilidad celular se realizó empleando azul tripán al 0.05% en PBS.

b) *Plásmidos recombinantes conteniendo los genes de neo y c-H-ras.* Para la transfección de H-ras humano, se emplearon dos diferentes construcciones: con el gen normal (RAS^{wt/neo}) o mutado (RAS^{mut/neo}). Ambas fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Alejandro García Carrancá (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)(figura 3). Dicha construcción se realizó empleando los plásmidos pEC (c-H-ras^{gly12}) o pEJ (c-H-ras^{val12}), los cuales tienen insertado el DNA genómico de ras en el vector pBR322. Ambos plásmidos fueron donados por la Dra. Chang (Chang *et al.*, 1982; Tabin *et al.*, 1982). Dichos plásmidos fueron digeridos con BamH I, aislando posteriormente al oncogen y el protooncogen ras. Los fragmentos de BamH I, fueron su vez clonados en pSV2neo (Guido *et al.*, 1992). Ambas construcciones fueron secuenciadas, comprobando que su secuencia fuera la

correcta y estuviera en la dirección correcta (Capon *et al.*, 1983). Para la transfección, las construcciones se linearizaron cortando con la enzima con EcoR I (Amersham), y a pSV2neo con BamH I (Amersham). Una vez lineales se emplearon para la transfección de células NIH 3T3.

c) *Ensayos de transfección* : La transfección de las células NIH 3T3 se realizó mediante electroporación, de acuerdo a lo descrito por Guido, *et al* (1992). 2×10^6 células en 250 μ l de solución de HEBS (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0.7 mM, Glucosa 6 mM, HEPES 20 nM, pH 7.05) más 10 μ g del plásmido linearizado y 240 μ g de ADN de esperma de salmón (Sigma). Se electroporó con un pulso de 5 seg de 400 volts a 250 μ F (Bio-Rad, Gene pulser). Tres experimentos de transfección se realizaron: 1) con la construcción del gen *ras* normal (RAS^{wt/neo}); 2) con el gen *ras* mutado (RAS^{mut/neo}); 3) y como control con el gen pSV2neo únicamente (figura. 3). Dos días después de la electroporación se adicionaron al medio de cultivo 800 μ g/ml del antibiótico G418 (geneticina, GIBCO) para seleccionar las células transfectadas.

d) *Selección y aislamiento de las clonas*: Las células cultivadas en presencia de G418 fueron clonadas mediante el método de dilución (Chambers *et al.*, 1993), el cual consistió en colocar las células transfectadas a muy baja densidad en placas de 96 pozos, con el objetivo de dejar una célula por pozo, lo cual se verificó mediante la observación al microscopio. Las clonas obtenidas se seleccionaron nuevamente con G418 para corroborar la expresión del plásmido transfectado. Se les nombró y numeró de acuerdo al tipo de plásmido electroporado: **N#** para aquellas transfectadas con pSV2neo, **J#** aquellas electroporadas con *ras* mutado y **C#** para aquellas inoculadas con *ras* normal. Las células silvestres, sin transfectar, y empleadas como testigo se les denominó **T**.



B

Plásmido	Gen <i>ras</i>	7	8	9	10	11	12	13	188	189
pECneo	normal	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Ser
		GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GGC	GGT.....	CTC	TCC
							↓			
pEJneo	mutado	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Leu	Ser
		GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GTC	GGT.....	CTC	TCC

Figura 3. Esquema de los plásmidos empleados para la transfección de las células. En la figura **A** se muestran la base de los plásmidos pECneo ($RAS^{wt/neo}$) o pEJneo ($RAS^{mut/neo}$) que contienen el gen *ras^{gly12}* y *ras^{val12}*, respectivamente, así como los sitios de corte por diversas enzimas de restricción. También se esquematizan el sitio de origen y promotor del plásmido SV40, el gen de resistencia a neomicina (*neo*) adyacente a *ras*. Ambos genes se encuentran en el vector pBR322. Los números del 1 al 4 corresponden a los exones de *ras*. En la figura **B** se muestran la diferencia entre el gen *ras* normal y el mutado.

Caracterización de las clonas:

a) *Western blot*: La presencia de la proteína p21^{ras} se detecto mediante Western blot por el método descrito por Hill *et al.* (1988). Las células de cada clona fueron lisadas empleando solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 28 mM, pH 7.1; NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 1%, deoxicolato de Sodio al 0.5%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). Se cuantifico la concentración de proteína por el método de Bradford (1976) y se corrieron 50 μ g de proteína de cada lisado en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % a 15 mA durante 1 hr. Las proteínas se transfirieron a papel PVDF (Millipore) por 2 hrs a 200 mA a 4°C, empleando buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8.3). La proteína Ras se detectó con el anticuerpo monoclonal pan-ras IgG2b (Oncogene) en una dilución 1:1000. Se reveló la presencia de las proteínas por quimioluminiscencia empleando película X-Omat y el sistema ECL (Amersham). Para evaluar la especificidad del anticuerpo empleado, se goteo en cada membrana ya transferida 1 μ g/ μ l de péptido pan-ras^{val} 12 y 1 μ g/ μ l pan-ras^{gly} 12 (Oncogen).

b) *Ensayos de colonización en agar semisólido*: Para evaluar la independencia de anclaje celular se determinó la formación de colonias en agar blando (Steeg *et al.*, 1988). Se resuspendieron 3 x 10³ células en 0.5 ml de medio conteniendo 10 % SFB, 4.5 g/l glucosa, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y 0.5 % de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) ó 0.3 % de agar noble (pN)(Difco). La mezcla se colocó sobre 0.5 ml de medio sólido constituido de DMEM con 0.7 % de agarosa en cajas de 24 pozos. Las colonias se contaron 15 días más tarde. El ensayo se realizó por triplicado.

c) *Obtención de medio condicionado*: 0.25x10⁶ fibroblastos NIH 3T3 silvestres fueron colocados en botellas de cultivo de 25 cm² (COSTAR) con medio DMEM con rojo fenol ó en RPMI 1640 sin rojo fenol, ambos suplementados con 10 % SFB. Al encontrarse las células en semiconfluencia (90-95%) se les cambio con los mismos medios pero sin SFB, y se dejaron a 37 °C durante 24 hrs. Pasado este tiempo se colectó el medio el cual se

centrifugó a 1500 rpm durante 10 min (Sorvall, rotor HS). Se obtuvo el sobrenadante en condiciones estériles y se filtro con membranas de $0.22 \mu\text{m}$ (COSTAR). El medio filtrado fue empleado como medio condicionado quimioatrayente para la quimionvasión.

d) *Ensayo de quimioinvasión*: Se utilizaron cámaras de microquimiotáxis Neuro Probe de 48 pozos, empleado como separación entre la cámara superior e inferior una membrana de Nucleopore de 8-12 μm de diámetro de poro (Albini *et al.*, 1987; Bonfill *et al.*, 1994), La membrana fue previamente cubierta con 50 $\mu\text{g/ml}$ de matrigel (Collaborative Prod.). El matrigel se diluyó a la concentración deseada con agua bidestilada, aplicada a los filtros y secada bajo campana durante 24 hrs. Media hora antes de iniciar el ensayo la membrana fue reconstituida rehidratandola con 100 μl de DMEM libre de suero.

En la parte superior de la cámara Neuro Probe se colocaron 17500 células por pozo en medio DMEM sin suero fetal. En la cámara inferior se colocó como quimioatrayente medio condicionado o medio con 10% de suero. Se incubaron por 24 hrs a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las membranas se fijaron en metanol y se tiñeron con Eosina-Azure, contado las células que atravesaron la membrana; 10 campos por pozo a 100 X de aumento. Las células que no pasaron el matrigel se eliminaron limpiando la cara superior de la membrana con un hisopo húmedo.

e) *Doble reto de quimioinvasión*. Se empleó cámaras de Transwell (Costar) de 24.5 mm de diámetro. En la parte superior de la cámara se colocaron 0.5×10^6 células/pozo en medio sin suero. En la cámara inferior se adicono como quimioatrayente medio condicionado o DMEM con 10 % de SFB. Inicialmente, las células se retaron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de matrigel sobre una membrana de $8 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Kramer *et al.*, 1986; Albini *et al.*, 1987; Siegal *et al.*, 1993). A las 48 hrs las células que atravesaron la membrana cubierta con matrigel, y que se encontraban en el pozo inferior, fueron contadas y propagadas. Posteriormente, las células se volvieron a retar con 100 $\mu\text{g/ml}$ de dicha matriz extracelular sintética. Las células que se encontraron en el pozo inferior fueron contadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización de la tumorigenicidad de las clonas celulares.

a) *Animales empleados:* Para evaluar la capacidad de las clonas transfectadas para generar tumores subdérmicos, se emplearon 15 ratones atímicos Balb/C nu/nu, 36 ratones NIH y 12 ratones hipotímicos et/et. Para evaluar la capacidad metastásica de las clonas obtenidas, se emplearon 36 ratones et/et inoculados intravenosamente por la vena de la cola.

b) *Ensayos de tumorigenicidad:* La generación de tumores en los ratones se realizó de acuerdo a lo descrito por Muschel *et al* (1985). Se inyectaron subdérmicamente 1×10^6 células de las clonas transfectadas a los ratones atímicos nu/nu Balb/C, NIH y et/et. El volumen tumoral fue determinado de acuerdo a la siguiente fórmula: $V_t = a \times b^2 \times \pi / 6$, donde V_t es el volumen tumoral, a es el diámetro mayor y b es el diámetro menor (Kønniksen *et al.*, 1989; Olea *et al.*, 1992). Los diámetros se determinaron midiendo con un escalímetro cada tercer día el largo y ancho tumoral. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical al presentar disfunción y cada ensayo se realizó por triplicado. La autopsia de los animales, consistió del examen anatomopatológico de los pulmones, hígado, cerebro y bazo; así como del tumor desarrollado subdérmicamente. Se hicieron cortes histológicos y se contrastaron con hematoxilina-eosina o tinción tricromica de Masson para su análisis histopatológico. Otro fragmento de tumor se empleó para analizar la secreción de proteasas mediante zimogramas.

c) *Desarrollo de metástasis:* Se inyectaron intravenosamente (por la vena de la cola) 5×10^5 células de las clonas transfectadas a ratones hipotímicos et/et (Muschel *et al.*, 1985; Hill *et al.*, 1988). Los ratones se sacrificaron por sobredosis de anestésico (Anestosal, 100 μ l por animal, Lab. Smith-Kline) al presentar disfunción respiratoria o a un tiempo determinado (70 o 90 días). La autopsia de los animales consistió del examen anatomopatológico de los pulmones, hígado, cerebro y bazo. Se hicieron cortes histológicos y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El volumen tumoral fue determinado de acuerdo a la fórmula ya descrita de $V_t = a \times b^2 \times \pi / 6$ y cada ensayo se realizó por triplicado. Los bazos de cada animal fueron medidos y pesados para determinar esplenomegalia.

d) *Determinación de actividad gelatinolítica (zimogramas)*: Se determinó la actividad gelatinolítica de las líneas celulares *in vitro* y de los tumores desarrollados por éstas, de acuerdo a lo descrito por Montgomery (1993). 1×10^6 células se cultivaron en cajas de cultivo de 150 cm². Al llegar los cultivos al 70-80% de confluencia, se dejaron por 48 hrs en medio sin suero fetal y sin rojo fenol. De los tumores se cultivó un fragmento de 1 cm³ sobre un cojín estéril de Gelfoam y se sembró en medio DMEM en las mismas condiciones que las células. El medio se colectó y se concentró mediante ultrafiltración con celdas de Amicon de 10 kDa. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

Dos μ g de proteína de los sobrenadantes de las células y de los tumores se corrieron electroforéticamente en minigeles de poliacrilamida al 8% copolimerizada con gelatina tipo A 1%. La gelatina empleada como sustrato para las enzimas se disolvió junto con la poliacrilamida antes de polimerizar. La corrida se realizó a 15 mA durante 1 hr. Al término de la corrida, se lavó el gel en Tritón X-100 (Merck) al 2.5% y se incubaron en solución de TNC (Tris 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 20 mM; pH 7.4) durante 4 hrs a 42 °C. Se revelaron las bandas de degradación tiñendo en solución de azul de Coomassie al 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente. Se cuantificó la actividad gelatinolítica en cada gel por densitometría (Beckman DU 650).

Para determinar la naturaleza de metaloproteasa de las gelatinasas en los sobrenadantes, éstos se incubaron con 20 mM de EDTA, con el fin de inhibir la actividad de las enzimas al quelar el Mg²⁺ y el Ca²⁺ necesarios para su actividad. Para corroborar la presencia de las formas inactivas en cada gelatinasa, los sobrenadantes fueron incubados con 1mM APMA (aminophen-mercury acetate, Sigma), el cual favorece el rompimiento de la proenzima, permitiendo solo la observación de formas activas de menor peso.

e) *Análisis inmunohistoquímico de Nm23*: Se determinó la presencia de Nm23 en los tumores y en las células transfectadas mediante inmunohistoquímica. Se emplearon tanto cortes en fresco como cortes en parafina y se usaron dos anticuerpos primarios anti-nm23 (Oncogene y Dako). 2.5×10^5 células cultivadas sobre laminillas y los cortes de criostato ó en

parafina se incubaron con uno de los anticuerpos primarios (dilución 1:50) durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado revelando con 3-3-diaminobencidina ó con fosfatasa alcalina marcada con avidin-biotina LSAB2 (dilución 1:100, Dako), durante 1 hr a 37 °C. De acuerdo al compuesto de revelado, se observó como reacción positiva para el anticuerpo biotinilado una tinción de color café, contrastado con Hematoxilina de Harris; o para el LSAB2 la reacción positiva fue una tinción de color azul contrastada con Fast red.

Como control se adicionó de cada laminilla un corte sin anticuerpo primario, para determinar la inmunoreacción no específica por la peroxidasa o por la fosfatasa alcalina endógena. Como control positivo se incluyeron cortes de tumor mamario humano y células MCF7 de cáncer de mama humano. Para todos los tejidos, se evaluó la presencia de Vimetina (Dako) para identificar que los tejidos se encontraran en buen estado.

f) Evaluación de los resultados de inmunohistoquímica. Se evaluó la intensidad inmunoreactiva en las células y en los tejidos de forma semicuantitativa, definiendo arbitrariamente una escala de cuatro puntos de la siguiente manera:

(+++) = inmunoreactividad fuerte, aquella cuya intensidad fue equivalente o mayor a la del control positivo;

(++) = inmunoreactividad moderada, aquella que fue menor que la observada en el control positivo;

(+) = inmunoreactividad baja, aquella menor que la inmunoreactividad moderada pero que si presento señal y no era negativa;

(-) = inmunoreactividad negativa, aquella que no se observo inmunoreactividad y de forma equivalente a lo observado en el control interno negativo.

También se evaluó el patrón de distribución de las células inmunoreactivas para nm23, denominando como **Homogéneo**, el tejido que mostró tener en todas sus células una inmunoreactividad uniforme; mientras que se clasifico como **Heterogéneo**, aquel tejido que mostró en el mismo corte una mezcla de intensidad de inmunoreactividad. Además, se adiciono la estimación del porcentaje de tejido inmunoreactivo, de tal forma que el tejido que presente un valor de 100% en todas las células mostraron inmunoreactividad. Cada ensayo

se realizó por triplicado y los resultados obtenidos fueron analizados por tres diferentes observadores.

g) *Análisis histopatológico.* Se realizaron cortes histológicos de 4 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El diagnóstico y análisis morfológico fue realizado por dos diferentes observadores: el Dr. Ricardo Delgado Chávez y el Dr. Roberto Herrera Goepfert, ambos del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Cancerología. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina-eosina evaluándose la morfología celular, pleomorfismo, número de mitosis, vascularización y grado de diferenciación; y también se contrastaron con tinción tricromica de Masson para evaluar la colágena intersticial.

Análisis estadístico.

Se realizaron pruebas de Sheffe's, para comparar la actividad total de las gelatinasas entre los cultivos celulares y los explantes tumorales de los datos obtenidos de tres ensayos mediante zimogramas.

Resultados.

Caracterización de las clonas obtenidas:

a) *Morfología celular:* Las células transfectadas con los genes *Ha-ras* normal y mutado, así como con el vector *pSV2neo*, fueron clonadas por dilución con el fin de obtener una población celular homogénea de cada transfección. De cada plásmido transfectado se obtuvieron el siguiente número de clonas: 16 para *pSV2neo*, 17 para *pECneo*, y 20 para *pEJneo*. Se emplearon únicamente aquellas clonas que mostraron una mayor resistencia a la geneticina: **T1**: células silvestres, **N5**: transfectadas con *pSV2neo*, **C4** y **C10**, electroporadas con *ras* normal, y **J3** y **J20**, con *ras* mutado.

Al analizar la morfología de las diferentes clonas transfectadas se observó una clara diferencia entre las células que contenían *ras* normal o mutado, en comparación a las clonas testigo. En general, las células transfectadas solamente con el vector *pSV2neo* presentaron una forma típica de los fibroblastos silvestres, es decir, en forma de huso, de orillas anguladas, manteniendo proporcional la relación núcleo/citoplasma y formando una monocapa al cubrir toda la caja de cultivo (figura 4A y 4B). Sin embargo, las clonas transfectadas con *ras* normal (*p21^{9ly12}*), aunque presentaron una morfología similar a las clonas testigos, llegaron a aparecer células en donde se perdía la relación núcleo citoplasma, es decir, se encontraron células de un tamaño mucho mayor que las normales, con núcleos muy grandes o multinucleadas, y en algunos casos llegaron a formar focos, las cuales son colonias de células que crecen unas sobre otras (figura 4C y 4D). Con respecto a las clonas transfectadas con *ras* mutado (*p21^{val12}*), estas mostraron clonas donde las células pierden la relación núcleo/citoplasma, particularmente células muy grandes y multinucleadas. Al comparar la formación de focos entre las células transfectadas con *Ras^{mut}/neo*, con respecto a las células

con Ras^{w1}/neo se observó que las primeras presentaban una mayor cantidad de éstos (figura 4E). Cabe aclarar que, en general, la formación de focos en estas clonas sólo se presentó cuando la superficie de la caja de cultivo se encontraba completamente cubierta de células. Una clona en particular, a la cual se le denominó **J20**, fue la que presentó el cambio morfológico más marcado con respecto al resto de las clonas, ya que ésta no requería cubrir la caja de cultivo para presentar la aparición de focos. Como puede observarse en la figura 4F, esta clona presenta células que se alinean una con otra, formando columnas que unen un foco con otro.

b) Determinación de la expresión de ras por Western blot: Para comprobar la expresión de los plásmidos transfectados en las diferentes clonas, se realizaron ensayos de Western blot. Como puede observarse en la figura 5, las clonas con *ras* mutado, **J3** y **J20**, mostraron la presencia de p21^{val12}, la cual fue 6 veces más que la expresión que **T1**, de acuerdo al análisis densitométrico. También se adicionó la inmunodetección de un péptido testigo que presentó la mutación de glicina por valina en el codón 12 y que es reconocido por el anticuerpo pan-ras, así como a la línea celular T24, como control positivo. De esta manera se corroboró la especificidad de los anticuerpos empleados. Al comparar la expresión de p21^{ras} normal entre las células **C4** y **C10**, con respecto a las testigo, no se observó ninguna diferencia.

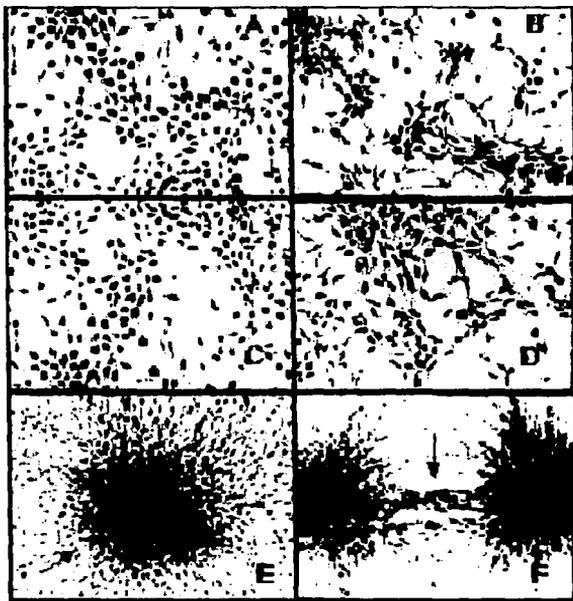


Figura 4. Morfología de las células transfectadas.

A) Células testigo **T1**; B) células transfectadas con el vector pSV2neo (clona **N5**); C) y D) células transfectadas con el plásmido pECneo (**C4** y **C10**); E) y F) células transfectadas con el plásmido pEJneo (**J3** y **J20**). Las flechas indican la formación de focos en (E) y la intercomunicación entre estos mediante redes de células en F. Aumento 160 X.

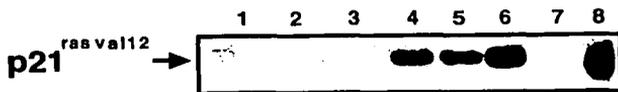


Figura 5. Western blot de la proteína Ras mutada en los lisados celulares de algunas clonas.

Se adicionaron 50 μ g de proteína de los lisados de las clonas por carril a geles de poliacrilamida-SDS al 10 %. 1) N5 (clona con el plásmido pSV2neo); 2) clona C4 y 3) clona C10 (clonas con ras normal); 4) clona J3 y 5) clona J20 (clonas con ras mutado); 6) línea celular T24; 7) fibroblastos 3T3 NIH silvestres (T1); y 8) péptido testigo para H-Ras (val 12). Las proteínas se transfirieron a papel PVDF (Millipore) por 2 hrs a 200 mA a 4°C. Se empleo el sistema de quimiluminiscencia ECL (Amersham) mediante luminol para revelar la presencia de la proteína.

c) *Ensayos de colonización en agar semisólido*: Una medida de transformación ampliamente utilizada es la independencia de anclaje de una célula *in vitro*. Para ello, 3000 células de cada clona se sembraron en un colchón de agar de bajo punto de fusión al 0.5% y en agar noble al 3% en cajas de 24 pozos, dejándolas crecer durante 15 días y contando el número de clonas por pozo. Se emplearon dos diferentes tipo de agar para poder comparar y discernir más fácilmente la independencia a anclaje (Steeg *et al.*, 1988) En la tabla 1 se muestra el número de colonias formadas en agar blando por las diferentes clonas transfectadas. En general, las clonas crecieron mejor en agar de bajo punto de fusión (BPF) que en agar noble, debido a que éste último es menos firme y selectivo. Cabe destacar que a los 15 días se observó que las clonas que se transfectaron con el gen *ras* mutado presentaron un mayor número de colonias (mediana de 9.7 y 2 colonias para agar de bajo punto de fusión y agar noble, respectivamente) en comparación con el resto de las clonas sin importar el tipo de agar (mediana de colonias para la clona testigo= 0 y 0; clonas con *neo*= 4.5 y 0.9; y clonas con *ras* normal= 2.15 y 0 para agar bpf y agar noble, respectivamente).

La clona silvestre (**T1**) genero algunas colonias en agar BPF (1.3 colonias). La clona transfectada con pSV2*neo* (**N5**) generó en promedio 4 colonias en agar de BPF. Las clonas transfectadas con *ras* normal (**C4** y **C10**), formaron un máximo de 5 colonias, solamente con agar de BPF. Sin embargo, las clonas transfectada con *ras* mutado (**J20** y **J3**) presentaron de 4y 50 colonias en agar de BPF; y 2 y 17 colonias en agar noble (respectivamente)(tabla 1). La variación interexperimental fue muy amplia, lo cual se observó por el amplio rango de desviación estándar (mayor al 10 %), aunque la tendencia fue muy evidente, ya que la mayoría de las clonas transfectadas con el oncogen *ras* exhibieron un mayor número de colonias en promedio con respecto al resto de las clonas.

Tabla 1. Número de colonias en agar para determinar independencia de anclaje (promedio de tres experimentos por triplicado).

Clona	Promedio de colonias en agar bpf (\pm D.E.).	Promedio de colonias en agar noble (\pm D.E.).
T1	1.3 \pm 2.3	0.3 \pm 0.6
N5	4.4 \pm 13.8	0.3 \pm 0.6
C4	1.0 \pm 1.7	0.0 \pm 0.0
C10	4.6 \pm 6.4	0.0 \pm 0.0
J3	50.7 \pm 2.5	17.0 \pm 12.5
J20	4.0 \pm 1.7	2.0 \pm 0.0

bpf: Agar de bajo punto de fusión.

D.E: Desviación estandar.

d) *Ensayo de quimioinvasión*: Para determinar si las células de las diferentes clonas son capaces de invadir matrices extracelulares *in vitro*, se realizaron ensayos de quimioinvasión empleando como barrera matrigel, el cual contiene muchos de los componentes de matriz extracelular, como es colágena IV, fibronectina y laminina (Vukicevic, *et al*, 1992). Como se puede observar en la figura 6, la respuesta al matrigel, es diferente dependiendo del medio quimioatrayente que se emplee, ya que en general, la respuesta obtenida al medio condicionado (MC), es mucho mayor que al medio con 10% de suero fetal de bovino (SFB). La respuesta al MC, es muy similar entre las clonas testigo (**T1**= 130.7±19.1 células) ó transfectadas con *ras* normal (**C4**= 135.5±13.4; **C10**= 113.0±26.9 células) ó con el plásmido *neo* (**N5**=123.0±21.7 células). Al compararlas con las clonas que poseen *ras* mutado, se observa una ligera tendencia a ser mayor (**J3**= 168.0±29.2 y **J20**= 134.0±45).

Cuando se comparó la respuesta al medio con suero, la tendencia es diferente, pues no se observó una clara correlación entre la transfección y la capacidad de invasión *in vitro*. Algunas clonas como **C4** y **J3**, presentaron una mayor capacidad de invasión (103.7±35.0 y 88.5±12.5 células por clona, respectivamente) en comparación al resto de las clonas (**T1**= 27.0±13.4, **N5**= 39.7±7.4, **C10**= 35.0±39.7±7.4 y **J20**= 3.0±4.3 células). Cabe resaltar que la clona **J20** que fue capaz de atravesar el matrigel con MC, con el medio con suero fetal presentó una respuesta mucho menor que el resto de las clonas (3.0±4.3 células) y mucho menor que las células sin plásmido o testigo (**T1**= 27.0±13.4) (figura 7).

En la figura 7 se pueden observar los resultados de la evaluación de la capacidad de quimioinvasión con las cámaras de transwell y el reto a las clonas celulares con dos diferentes concentraciones de matrigel. Las clonas fueron inicialmente retadas con 50 µg ml⁻¹/pozo de matrigel y contadas las que pasaron a la cámara inferior después de 48 hrs. Posteriormente, se propagaron éstas mismas células y se retaron con 100 µg de matrigel por pozo. En general, en el primer ensayo no pasaron más de 100 células, independientemente del medio quimioatrayente y de la clona empleada, lo cual concuerda con el experimento anteriormente descrito. Sin embargo, al retar éstas mismas células con el doble de concentración de matrigel, se observó que solo las transfectadas con Ras^{mut}/neo fueron capaces de pasar. Al comparar el número de células que pasaron los 100 µg de matrigel, la clona **J3** paso 7 veces más (700%) y **J20** 25 veces más (2500%) a ésta última concentración. Con respecto al resto de las clonas el número de células que pasaron en ambas concentraciones fue muy similar (con un rango de 0 a 52 células y una mediana de 11 células).

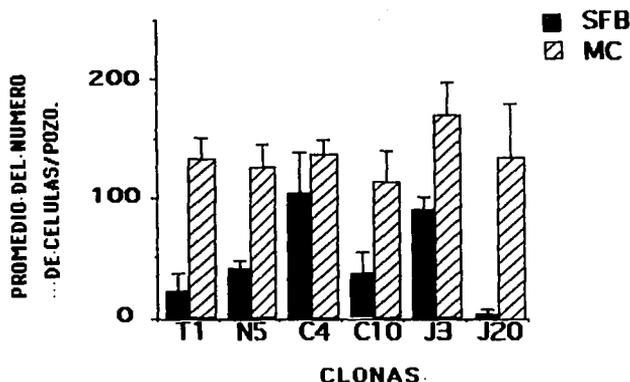


Figura. 6. Ensayo de quimioinvasión empleando como barrera Matrigel.

Se midió la capacidad de invasión de las clonas transfectadas retardolas a pasar a través de 50 μg de matrigel. En cámaras de microquimiotáxis Neuro Probe de 48 pozos se empleo como separación entre la cámara superior e inferior una membrana de Nucleopore de 8-12 μm de diámetro de poro cubierta con matrigel. 17.5 $\times 10^3$ células se colocaron en la cámara superior, mientras que en la inferior como quimioatrayente se adiciono medio condicionado (MC) o medio con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Pasadas 24 hrs las células se contaron en 10 campos a 100 X de aumento (inmersión fuerte). En la gráfica se muestra el promedio más la desviación estándar del ensayo por triplicado. Note se el mayor número de células con medio condicionado.

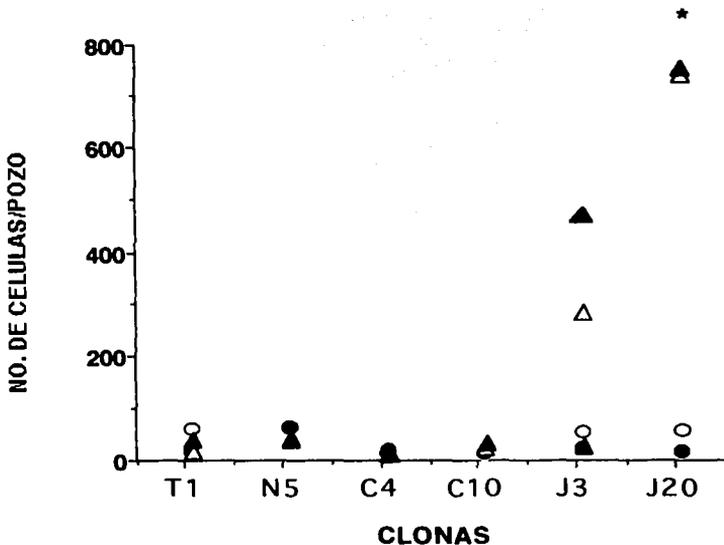


Figura 7. Ensayo de quimioinvasión retando a las clonas con 50 y 100 µg de Matrigel.

En la gráfica se muestra el número de células de dos diferentes experimentos que pasaron 50 y 100 µg de matrigel en cámaras de transwell. 0.5×10^6 las células se retaron con 50µg de matrigel. Pasadas 24 hrs, se eliminó la cámara superior con las células que no lograron pasar y se dejó que en la cámara inferior se propagaran las células que habían pasado. Estas mismas células se volvieron a retar pero con 100 µg de matrigel. En ambos casos se contaron las células que pasaron a las 24 hrs. Las figuras en círculos (experimento 1 ○ y 2 ●) muestran el número de células que pasaron 50 µg; y en triángulos se muestra las células que pasaron 100µg de matrigel (experimento 1 △ y 2 ▲) Como quimioatrayente se empleó medio condicionado (MC) y medio con 10 % de suero fetal bovino (SFB). * $p < 0.05$.

Caracterización de la tumorigenicidad de las clonas.

a) *Evaluación de la capacidad tumorigénica de las células transfectadas en ratones:* Para evaluar la capacidad tumorigénica de las células transfectadas se inocularon subdérmicamente sólo 5 clonas (testigo **N5**; **C4** y **C10** con *ras* normal; y **J3** y **J20** con *ras* mutado) en 15 ratones de la cepa Balb/C nu/nu atímicos, en 36 ratones NIH y en 24 ratones et/et hipotímicos. Los volúmenes tumorales se expresaron en cm³, como se describe en materiales y métodos. En la figura 8, se muestra un ejemplo del desarrollo tumoral alcanzado por tres diferentes clonas, en donde el tumor formado por **J3** presenta de manera macroscópica zonas extensas de necrosis y gran formación de vasos (angiogénesis), a diferencia de lo observado con los tumores generados por **C10** ó **N5**. Como se observa en la figura 9, los ratones inoculados con las clonas transfectadas con *ras* mutado (**J3** y **J20**) formaron tumores en 6 de 6 ratones, presentando neoplasias biológicamente más agresivas, con un tiempo de aparición más corto (6 días en los ratones nu/nu y et/et) y una evolución más rápida (máximo volumen alcanzado entre los 15 y 32 días)(tabla 2). De las clonas transfectadas con *ras* normal, sólo **C10** fue capaz de formar tumor en 1 de 3 ratones, de un tamaño menor a los ya descritos para **J3** y **J20** (tiempo de aparición 28 días). La clona **N5** que tiene sólo el vector, también fue capaz de formar tumor en 1 de 3 ratones, pero de muy lento crecimiento y largo tiempo de aparición (tiempo de aparición 11 y 42 días, y máximo crecimiento a los 46 días)(figura 9).

En la tabla 2, se resumen los datos de desarrollo tumoral en los ratones nu/nu inoculados subdérmicamente. Como puede observarse, el tiempo de aparición de los tumores formados por las células transfectadas con *ras* mutado (**J3** y **J20**), fue muy similar (alrededor de 6 días). Al comparar el volumen tumoral en éstos mismos ratones se presentó una variabilidad alta (de 5.12 ± 3.99 cm³ para **J3** y de 4.2 ± 3.8 cm³ para **J20**). Sin embargo, son los de mayor tamaño en comparación con el resto de las clonas (alrededor de un 300% mas). Los tumores desarrollados por las células transfectadas con *ras* normal, presentan largos tiempos de aparición (28 y 96 días para **C10** y **C4** respectivamente), con una incidencia menor, sólo en 2 de 5 ratones. La clona testigo **N5**, presentó también la formación de tumor con un volumen pequeño (0.47 cm³). Cabe destacar, que **C4** fue menos agresiva que el

resto de las clonas y de hecho, menos que la clona testigo **N5**.

También se evaluó la capacidad tumorigénica de las mismas clonas en ratones *et/et* hipotímicos y NIH. Observándose que en los ratones *et/et* solo tres clonas generaron tumores subdérmicos: la clona **J20** en 2 de 2 ratones, con un tiempo de aparición de 4.5 ± 0.7 días, desarrollando un volumen máximo de 1.36 ± 0.05 cm³ a los 21 y 25 días. Las otras dos clonas, ambas testigo desarrollaron tumor en un solo ratón, la clona **T1** desarrollo un tumor a los 50 días de 0.07 cm³ y la clona **N5**, que genero un tumor cuya aparición fue a los 11 días y el volumen máximo que alcanzó fue de 1.6 cm³ a los 40 días. El resto de las clonas no fueron capaces de generar tumor, sacrificandolos hasta los 80 días. (Tabla 2)

En el caso de los ratones NIH se inocularon subdérmicamente las mismas clonas. Se emplearon 6 ratones por clona. En este caso, sólo las células transfectadas con *ras* mutado formaron tumores: 1 de 6 ratones para **J3** (tiempo de aparición a los 35 días) y 1 de 6 ratones para **J20** (tiempo de aparición 30 días)(Tabla 2).

Para poder explicar la diferencia en el número y tamaño tumoral entre los diferentes clonas celulares y en las cepas de ratones inmunocompetentes (NIH), se procedio a determinar si presentaban los ratones aumento en el tamaño del bazo (esplenomegália), como evidencia de rechazo hacia las células inoculadas. Al medir el volumen y peso del vaso, se observó que las los ratones inoculados con las clonas **T1**, **N5**, **C4** y **C10** presentaban un ligero aumento en el tamaño de este órgano (Figura 10) con respecto a los animales inyectados con **J3** y **J20**, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



Figura 8. Formación de tumores en ratones nu/nu.

Ejemplos del desarrollo tumoral observado en los ratones nu/nu inoculados con 1×10^6 células de cada clona subdérmicamente. A) testigo, B) clona C10, la flecha delgada indica el tumor en este ratón; y C) clona J3, observe la zona oscura indicada por la flecha ancha que es una región del tumor con necrosis y la flecha delgada indica zonas de vascularización en el tumor.

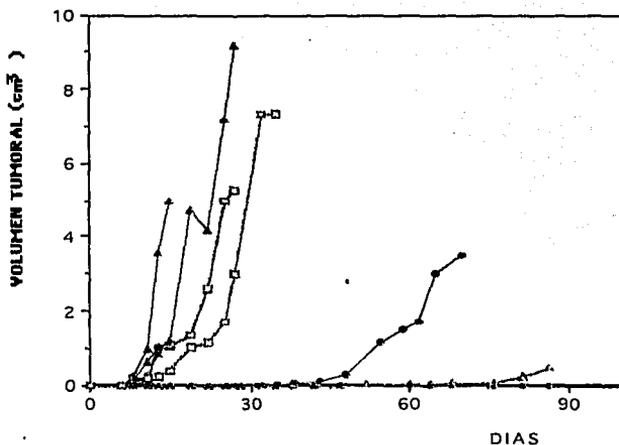


Figura 9. Curva de la determinación del volumen tumoral a lo largo del tiempo.

Desarrollo de los tumores subdérmicos en los ratones nu/nu. El volumen tumoral fue determinado de acuerdo a la fórmula: $V_t = a \times b^2 \times \pi / 6$, donde V_t es el volumen tumoral, a es el diámetro mayor y b es el diámetro menor. Cada ratón fue examinado cada tercer día, y medido el largo y ancho tumoral con un vernier. las figuras representan: (\blacktriangle) clona N5, (\odot) clona C4, (\bullet) clona C10, (\blacktriangle) clona J3 y (\square) clona J20. Los ratones se sacrificaron al presentar disfunción o sangrado en el tumor.

Tabla 2.**Desarrollo tumoral en los ratones inoculados subdérmicamente**

Clona	No de ratones con tumor.	Tiempo de aparición (días)	Volumen tumoral máximo (cm ³)
Ratones Balb/C nu/nu			
N5	1/3	42	0.47
C4	1/3	96	0.06
C10	1/3	28	3.53
J3	3/3	6	5.00
		6	1.19
		6	9.18
J20	3/3	6	5.25
		6	0.39
		8	7.34
Ratones e1/e1			
T1	1/2	50	0.07
N5	1/2	11	1.60
J20	2/2	4	1.31
		5	1.41
Ratones NIH			
J3	1/6	35	1.13
J20	1/6	30	5.32

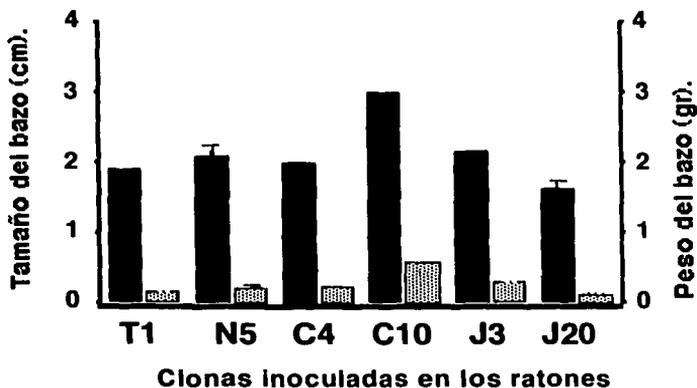


Figura 10. Aumento en el volumen o peso del bazo en los animales inoculados con las diferentes clonas celulares.

La presencia de esplenomegalia en los animales inoculados con las diferentes clonas fue analizada. Para ello se midió la longitud mayor del bazo, así como su peso en una balanza, después del sacrificio. Las barras cerradas (■) muestran el promedio de la longitud de dicho órgano, y las barras sombreadas (▨) el peso en gramos.

b) Desarrollo de metástasis por las células transfectadas en los ratones et/et. En los ratones et/et se probó la capacidad metastásica de las diferentes clonas empleadas en los tumores subdérmicos. Se inocularon 5×10^5 células por la vena de la cola de cinco ratones en dos diferentes experimentos. En la tabla 3 se resumen los hallazgos anatomopatológicos, cuya única variación fue el número de días en que los ratones murieron por problemas respiratorios o se sacrificaron a un número determinado de días (23,76 y 96 días). Las dos clonas transfectadas con *ras* mutado generaron las metástasis más grandes en volumen (**J3**= 0.36 ± 0.37 cm³ y **J20**= 0.70 ± 0.5 cm³), aunque cabe aclarar que la clona **J20** presentó desarrollo tanto de macrometástasis como de micrometástasis (ver la amplitud de el error estándar del volumen tumoral de dicha clona en la tabla 3 y la figura 11). En general, **J20** generó metástasis en un tiempo más corto (23 días), en un mayor número de nódulos y ratones (3/5 ratones), así como las metástasis más grandes (la más grande llegó a medir 1.9 cm³, la cual invadía la totalidad del pulmón). Sólo hasta los 96 días todas las clonas llegaron a presentar metástasis. La clona **N5**, la cual está transfectada con *neo* generó metástasis en 2/5 ratones, pero en comparación con el resto de las clonas, estos nódulos eran pequeños (0.0084 cm³) y poco abundantes. La clona **C10**, fue la única clona transfectada con *ras* normal capaz de formar nódulos metastásicos en el pulmón, presentando un volumen de 0.033 cm³, 4 veces mayor los presentados en los ratones inoculados con **N5**, pero menor que **J3** (10 veces menor) y **J20** (21 veces menor, ver tabla 3). Las clonas **T1** y **C4** no fueron capaces de generar macro ni micrometástasis en los pulmones de los ratones inoculados. Cabe señalar, que no se encontraron metástasis en otros órganos.

Tabla 3.
Desarrollo de metástasis en los ratones balb/C et/et inoculados por vía intravenosa.

Clona Inoculada	No. Ratones con tumor	No. Nódulos pulmones	Máximo volumen ±EE (cm ³) ^a	Máx. tiempo de desarrollo ± EE (días)
Experimento 1				
T1	0/2	0	0	-
N5	0/2	0	0	-
C4	0/2	0	0	-
C10	0/2	0	0	-
J3	0/3	0	0	-
J20	1/2	8	0.001±0.0004	23±0.8
Experimento 2				
T1	0/3	0	0	-
N5	2/3	2	0.0084±0.001	96
C4	0/3	0	0	-
C10	2/3	2	0.0034	96
J3	1/3	2	0.369±0.034	96
J20 2/3	3.5±0.7	0.701±0.516	75.5±1.8	

EE: Error estándar.

a : Máximo volumen promedio calculado para el nódulo metastásico.

- : Negativo.



Figura 11. Comparación de pulmones con y sin metástasis.

En la fotografía se muestra dos ejemplos de pulmones de ratones et/et, inoculados con células T1 y J20 (izquierda y derecha, respectivamente). La flecha con la M indica una metástasis, y el círculo muestra la toda la extensión que abarca la neoplasia.

Análisis comparativo de la secreción de gelatinasas.

a) *Zimogramas de los cultivos y de los tumores.* En la figura 12, se muestran dos zimogramas representativos, donde se observan las bandas de degradación de las enzimas secretadas tanto por los cultivos celulares (figura 12A) como por los explantes tumorales (figura 12B). Como se puede advertir, todas las clonas expresaron las formas activa e inactiva de las gelatinasas A y B, de 72 y 92 kDa. En la tabla 4 se muestran los resultados de la secreción de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Al comparar las bandas de degradación entre las diferentes clonas se puede advertir la similitud en particular entre **C10** y **J3** (figura 12A y B, así como figura 13). También se realizó un zimograma de gelatina incubando las muestras con 20 mM de EDTA, un quelante de iones metálicos. En éste tipo de gel se observó una inhibición total de la actividad gelatinolítica, dando geles sin bandas (datos no presentados).

Los resultados del análisis densitométrico de los zimogramas de tres experimentos diferentes se muestran en la tabla 4 y en la figura 13, en donde se comparan las actividades de la gelatinasa **A** (colagenasa tipo IV de 72 kDa/MMP-2) y de la gelatinasa **B** (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9) entre las líneas celulares y los tumores desarrollados por éstas clonas. A estas proteasas se les ha relacionado con la capacidad de invasión y como puede observarse, a excepción de **C4** y **J3**, todas las clonas cultivadas *in vitro* expresaron una cantidad muy similar de la gelatinasa **A** en su forma inactiva (un valor de alrededor de 1.26 UD.) de igual forma que las células silvestres (**T**). La clona **J3** presentó casi el doble de esta enzima (2.31 ± 0.008 UD.), mientras que **C4** expresó casi la mitad (0.67 ± 0.008 UD). En el caso de la forma activa de 62 kDa, solo las clonas **C10** y **J3** presentaron una mayor actividad ($C10 = 0.69 \pm 0.003$ y $J3 = 0.039 \pm 0.008$ UD). Al analizar la gelatinasa **B**, solo las clonas **J3** y **J20**, capaces de generar los tumores de mayor tamaño, presentaron una ligera banda de degradación de la forma inactiva de 92 kDa (0.02 ± 0.004 UD, ver tabla 4).

En general, al analizar la actividad gelatinolítica de las clonas celulares con los tumores formados por éstas en los ratones nu/nu, se observó que la cantidad de gelatinasas era diferente entre los observados *in vitro* y los explantes tumorales. En el caso de la gelatinasa **A**, la clona **N5** presentó bandas de degradación muy similares *in vitro* y en los tumores, tanto

de la forma activa como inactiva (alrededor de 1.15 y 0.14 UD, formas inactiva y activa, respectivamente). En el caso de las clonas **C10** y **J3**, se observó una disminución en la secreción de los tumores de hasta un 50% comparados con lo secretado por las clonas *in vitro*. (tabla 4) Por el contrario, en el caso de la clona **J20**, se ve aumentada casi un 50% la actividad en el tumor de ésta gelatinasa, tanto en su forma activa como inactiva en comparación con lo observado *in vitro* (de 1.23 UD. vs 2.49 UD. en la forma inactiva y 0.17 UD. a 0.235 UD. en la forma activa).

Al analizar la expresión de la gelatinasa **B**, se observó la tendencia a aumentar la secreción en los tumores en comparación con las clonas. Las células **N5** presentaron un aumento en ambas formas de la gelatinasa (0.005 y 0.001 UD vs 0.023 y 0.026 UD, formas inactivas y activas, respectivamente). **C10** presentó un aumento en 0.1 UD en la forma inactiva en los tumores, mientras que disminuyó un 50% en la forma activa. En el caso de las dos clonas transfectadas con *ras^{Val12}* (**J3** y **J20**) presentaron un incremento sólo en la forma activa de más de un 50%. Las otras dos clonas (**T1** y **C4**) al no generar tumores no se pudo comparar.

Al analizar la actividad de otras gelatinasas detectadas como las de 111 y 58 kDa, se observó que éstas se incrementaron en los explantes tumorales en comparación con las líneas celulares (figura 14). La banda de 111 kDa se incrementó hasta el doble en los tumores formados por **C10** con respecto a la línea celular (0.66 ± 0 vs 0.35 ± 0.01 UD, respectivamente), mientras que en el tumor generado por la clona **J20** se incrementó 8 veces más que en las líneas celulares (1.81 ± 0.03 vs 0.23 ± 0.004 UD, respectivamente) (figura 14). En el caso de **J3** se mantuvo muy similar (células= 0.59 ± 0.005 UD vs explante= 0.68 ± 0.005 UD).

La banda de degradación de 58 kDa presentó un aumento en los explantes con respecto a las líneas celulares. **N5** presentó un incremento de 0 a 0.286 ± 0.008 UD y **J20** de 0 a 0.4 ± 0.008 UD en los tumores, mientras que el explante de **C10** se duplicó la banda de degradación (línea celular= 0.28 ± 0.006 vs tumor= 0.54 ± 0 UD). Sin embargo, en estas dos

gelatinasas no se observó una tendencia clara. Cabe aclarar que las líneas celulares **T1** y **C4**, que no fueron biológicamente agresivas, no presentaron esta banda de 58 kDa. La clona **J3** presentó una pequeña disminución en los explantes con respecto a *in vitro* (células= 0.27 ± 0.001 vs tumor= 0.24 ± 0.009), aunque esta diferencia fue mínima.

También se analizó si las bandas de degradación observadas eran formas activas o inactivas, y por ello se evaluó la aparición de las formas activas de las enzimas a partir de la desaparición de las formas latentes. Para ello, los sobrenadantes se incubaron con 1mM de APMA (acetato de aminophen-mercurio), con el fin de activar dichas proteasas. Sólo en la clona **J20** se observó un claro cambio de la gelatinasa de 92 kDa a la de 82 kDa cuando se incubó con APMA. En las clonas **C10** y **J3** se observaron las formas inactivas de estas enzimas, pero no cambió la expresión de éstas al estar en APMA. Contrariamente, **C10** presenta un claro cambio en la banda de degradación de 42 a 38 kDa y **J3** de 72 a 62 kDa al ser activados con APMA. También se realizaron geles empleando sustrato de caseína en vez de gelatina para corroborar si la banda presente de 58 kDa era estromelina, ya que este sustrato identifica a ésta enzima. No se observó en estos geles ninguna banda de degradación en éste peso molecular.

Se comparó la actividad gelatinolítica total (es decir la sumatoria de la actividad gelatinolítica de todas las bandas) entre las clonas de las líneas celulares y entre las clonas de los explantes tumorales, observándose una similitud en el comportamiento gelatinolítico entre **C4** y **J20**, y entre **C10** y **J3** en las líneas celulares. Al comparar ambos grupos la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$). Al analizar los explantes tumorales, solo se encontró similitud entre **N5** y **J3**, siendo ambos diferentes a **J20** ($p < 0.05$).

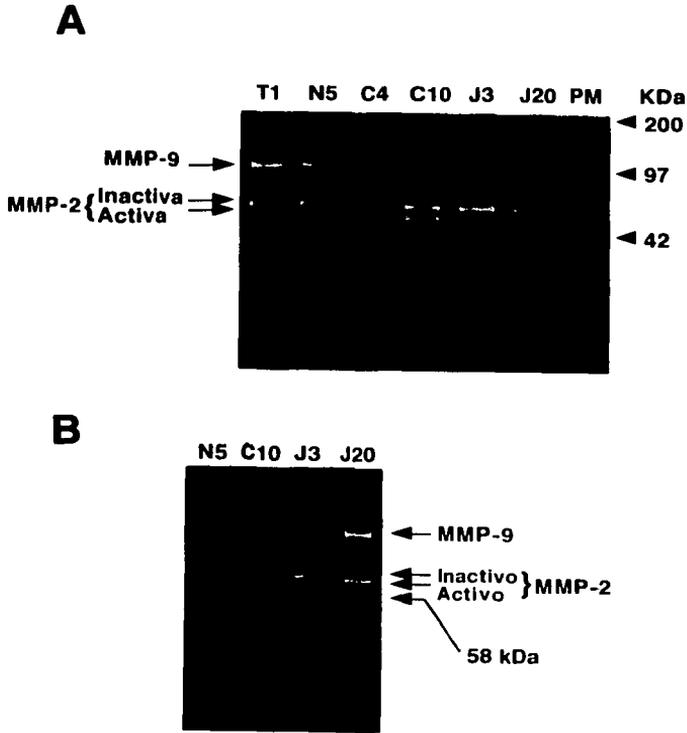


Figura 12. Patrón de gelatinasas secretadas por las diferentes clonas celulares y por los tumores generados por éstas.

Zimogramas donde se muestran las bandas de degradación que corresponden a la gelatinasa B de 92-82 kDa (MMP9) y a la gelatinasa A de 72-62 kDa (MMP2)(formas inactiva-activa, respectivamente). 2 μ g de proteína de los sobrenadantes de las células y de los tumores se sometieron electroforéticamente en minigeles de poliacrilamida al 8% copolimerizada con gelatina tipo A 1%. Se revelaron las bandas de degradación tiñendo en una solución de azul de Coomassie al 0.1%. El gel A) muestra las gelatinasas secretadas por las diferentes clonas; el gel B) muestra las enzimas secretadas por los tumores generados por éstas clonas. Las clonas corresponden a: **T1**: células silvestres; **N5**: clona transfectada con vector; **C4** y **C10**: clonas transfectadas con *ras* normal; **J3** y **J20**: clonas transfectadas con *ras* mutado. **PM**: marcadores de peso molecular.

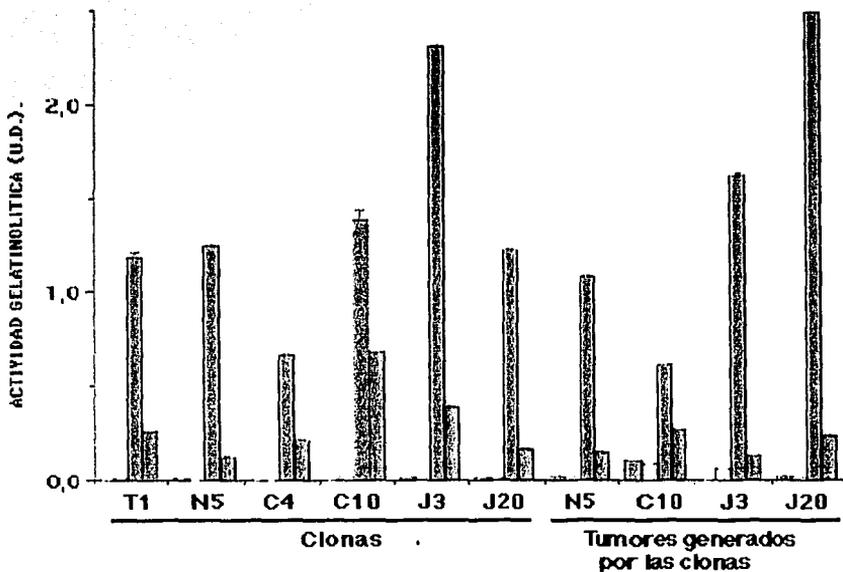


Figura 13. Actividad gelatinolítica de las gelatinasas A y B en las líneas celulares y tumores.

Se determinó la actividad gelatinolítica en cada gel por densitometría de los zimogramas realizados por triplicado de cada clona y el tumor generado por ésta (Beckman DU 650). Se graficó el área bajo la curva de cada banda y se expresó en unidades densitométricas (U.D.). Se muestra la actividad gelatinolítica de la gelatinasa A o MMP2 (■ forma inactiva de 72 kDa y □ forma activa de 62 kDa) y la gelatinasa B ó MMP9 (▣ forma inactiva de 92 kDa y □ forma activa de 82 kDa), en sus formas inactiva y activa (respectivamente). Los datos representan la media de las actividades de tres lecturas ± Error estándar. La clonas T y C4 no se presentan en los tumores ya que no fueron capaces de generar neoplasias en los ratones nu/nu.

Tabla 4. Análisis densitométrico de tres experimentos de la secreción de la gelatinasa en las clonas celulares como en los explantes tumorales.

	Gelatinasa B		Gelatinasa A	
	92 kDa	82 kDa	72 kDa	62 kDa
Clonas				
T1	0±0	0.01±0.002	1.18±0.030	0.26±0.003
N5	0.01±0	0±0	1.25±0.008	0.13±0.004
C4	0±0	0±0	0.67±0.008	0.21±0.008
C10	0±0	0.02±0	1.38±0.060	0.69±0.003
J3	0.02±0	0.01±0	2.31±0.008	0.39±0.008
J20	0.02±0	0.01±0.001	1.23±0.005	0.17±0.005
Explantos tumorales				
N5	0.02±0.007	0.03±0.008	1.09±0.006	0.15±0.008
C10	0.10±0	0.09±0	0.61±0	0.27±0
J3	0±0	0.07±0.002	1.63±0.013	0.13±0.001
J20	0.03±0.005	0.02±0.004	2.49±0.022	0.24±0.008

Datos expresados en unidades densitométricas (UD) ± Error estándar.

Las UD son arbitrarias, tomando como cero el valor densitométrico obtenido de la tinción del azul de Coomassie en el gel de gelatina, y dándole valor a la zona no teñida de las bandas de degradación (programa del espectrofotómetro Beckman DU 650).

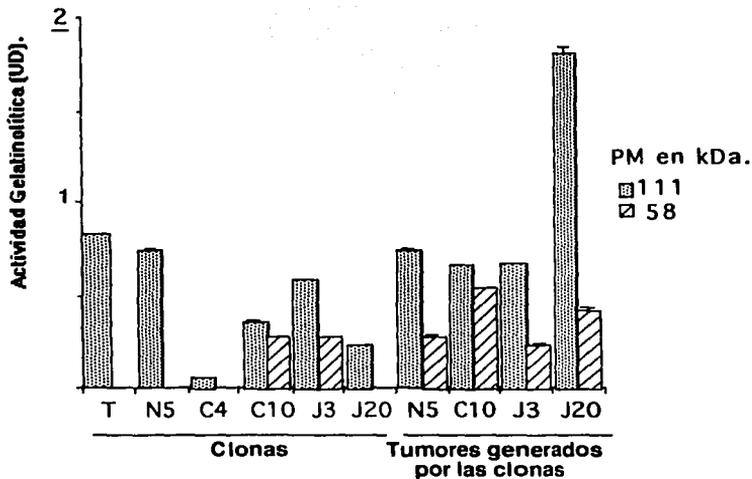


Figura 14. Actividad gelatinolítica de gelatinasas de 111 kDa y 58 kDa en las líneas celulares y los tumores generados con ellas.

En cada barra se muestra la media de las actividades de tres lecturas \pm error estándar de la actividad gelatinolítica de las gelatinasas de 111 kDa (■) y 58 kDa (▨). Están expresadas en unidades densitométricas (UD.).

Análisis inmunohistoquímico de nm23 en las células transfectadas y en los tumores subdérmicos y metastásicos.

Al analizar inmunohistoquímicamente la expresión de Nm23 en las clonas cultivadas y compararla con la de los tumores generados por las mismas en los ratones nu/nu, se observó una tendencia similar: las clonas **T1** y **N5** presentaron una inmunotinción entre baja y media para la proteína Nm23 (+/++) y un porcentaje de tinción de 80% y 20%, respectivamente. De las dos, solo **N5** generó tumor, que presentó un 10% de inmunotinción (figuras 15A y B, y 16B; tabla 5).

Por otra parte, las clonas transfectadas con *ras* normal (**C4** y **C10**) presentaron *in vitro* e *in vivo* una expresión de Nm23 baja y media, de forma similar a las testigo, sin embargo, el porcentaje de células entre ambas fue muy diferente, siendo 10 veces mayor en **C10** con respecto a **C4** (tabla 5). En los tumores generados por **C10** se observó una intensidad similar al observado *in vitro*, pero el porcentaje teñido del tumor fue mayor (del 80%)(Figura 15C y D, 16C; tabla 5).

Las clonas transfectadas con *ras* mutado, **J3** y **J20**, fueron las que revelaron la mayor expresión de Nm23 con respecto al resto de las clonas (con una intensidad de entre media y alta (++)/+++)) y en un porcentaje de entre un 70 al 90%, que también se observó en los tumores (tabla 5, figuras 15E y F, 16D y E).

La inmunotinción fue específica, lo cual se pudo corroborar por los controles empleados tanto positivos (línea celular MCF7 y un tumor de mama humano) como negativos (ensayo de inmunohistoquímica empleando sólo anticuerpo secundario). En estos últimos no se observaron tinción de fondo o unión inespecífica (figuras 15H y 16F).

Cabe resaltar que en algunos casos pudo observarse inmunotinción tanto citoplásmica como nuclear (tabla 5). En general, se observó la tendencia de presentarse tinción únicamente citosólica y homogénea (inmunotinción similar en todo el tejido, sin zonas de contraste) en las clonas testigo y en la clona **C4**, tanto *in vitro* como en los tumores *in vivo*. Sin embargo, las clonas transfectadas con *ras* mutado, **J3** y **J20**, presentaron inmunotinción en algunos casos

en ambos compartimentos celulares y de forma heterogénea, apareciendo zonas en las cuales las células no se teñían con cromógeno y otras con inmunotinción muy intensa (tabla 5). Un punto importante de mencionar es el caso de la clona **C10**, la que paradójicamente, presenta la tinción citoplásmica y nuclear *in vitro*, y únicamente citoplásmica en el tumor (tabla 5).

Al analizar inmunohistoquímicamente la expresión de Nm23 en los pulmones de los ratones expuestos a las clonas por vía intravenosa, se observó que los pulmones de los ratones testigo presentaban inmunotinción en el epitelio alveolar (figura 17A). Sin embargo, en los pulmones en los cuales se encontraron lesiones metastásicas, resaltaba el contraste entre la inmunotinción de Nm23 del epitelio alveolar con la tinción negativa de las metástasis (figura 17B a 17E). Cabe resaltar que en el caso de las metástasis generadas por **N5**, **C10**, **J3** y **J20** la inmunotinción tendió a ser negativa (figura 17, tabla 5), resaltando que en éstas dos últimas clonas las metástasis presentaron una inmunotinción mucho más débil que los tumores subdérmicos, a tal grado que solo el epitelio de los vasos sanguíneos que irrigaban dentro de la metástasis presentaban una inmunotinción para Nm23, y el tejido tumoral fue negativo (figura 17 E). Todas las metástasis mostraron un patrón heterogéneo, de alrededor del 10 % (tabla 5).

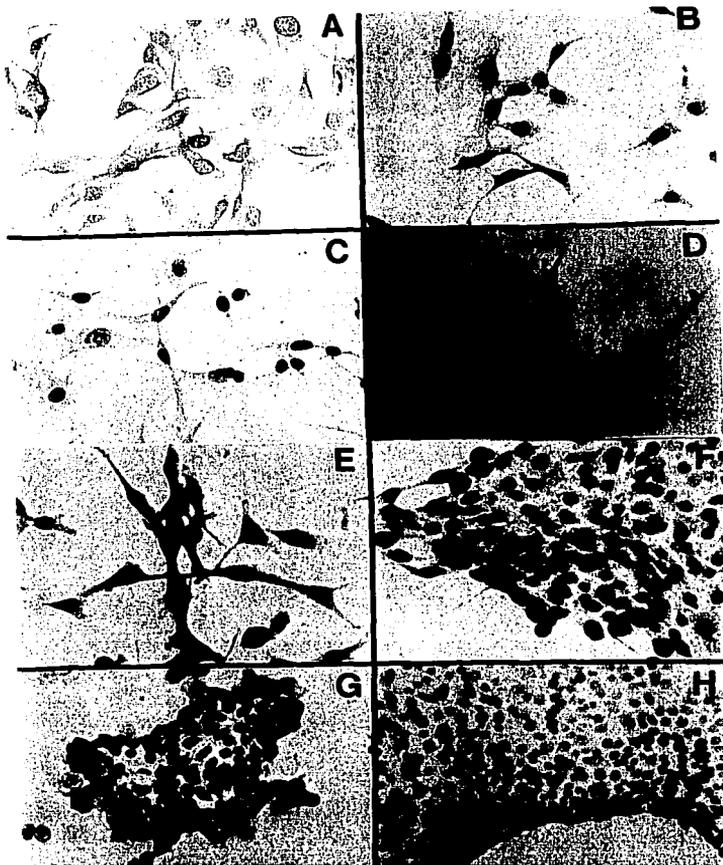


Figura 15. Análisis inmunohistoquímico de Nm23 en las clonas transfectadas.

2.5 X 10⁵ células de las clonas transfectadas se colocaron sobre laminillas estériles y se cultivaron durante 2-5 días a 37 °C. Se fijaron con acetona fría a -20 °C y se incubaron con el anticuerpo de nm23 por 17 horas a temperatura ambiente en una dilución 1:50. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado. La unión específica se reveló adicionando el complejo avidin-biotina con Diaminobencidina. A) clona T1, B) clona N5, C) clona C4 y D) clona C10. E) clona J3, F) clona J20, G) células MCF7 (control positivo para Nm23) y H) clona J20 control negativo. Notese la tinción citosólica mostrada en las figuras B y D y la diferencia entre una tinción positiva y una negativa figura G y H. Aumento 400 X.

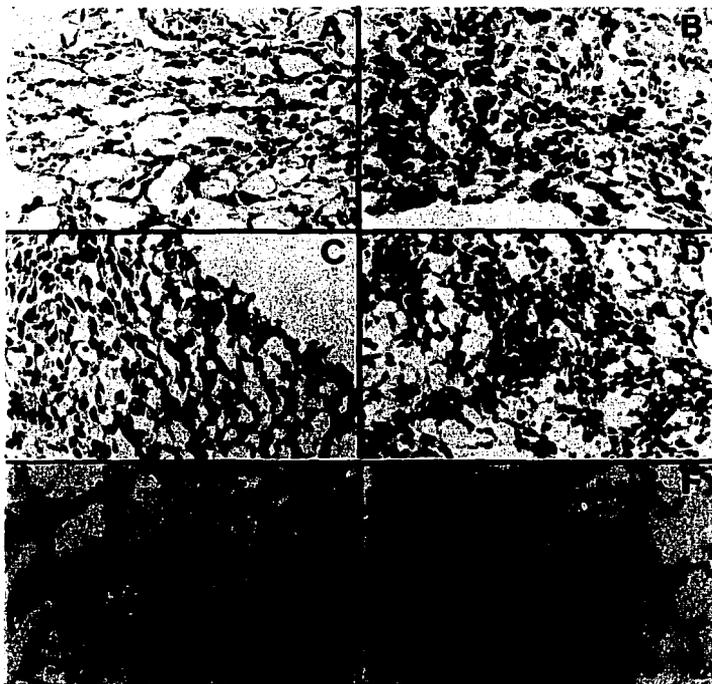


Figura 16. Análisis Inmunohistoquímico de Nm23 en los tejidos tumorales generados por las clonas transfectadas.

A) Tumor generado por la clona N5, B) tumor generado por la clona C10, C) tumor generado por la clona J3, D) tumor generado por la clona J20, E) carcinoma de mama (control positivo para Nm23) y F) tumor generado por la clona J20 (control negativo de la técnica). Observe la diferencia de tinción entre las figuras B y C, así como hay zonas de los tejidos que presentan diferentes intensidades de tinción. Aumento 400 X.

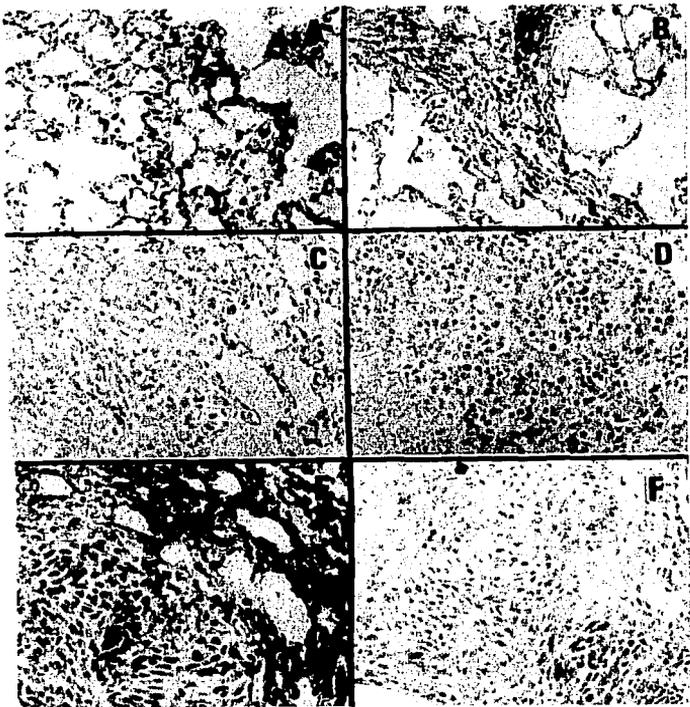


Figura 17. Análisis Inmunohistoquímico de Nm23 en las metástasis generadas por las clonas transfectadas.

A) Epitelio pulmonar de un ratón expuesto a las células testigo, B) metástasis generada por la clona N5, C) metástasis generada por la clona C10, D) metástasis generada por la clona J3, E) metástasis generada por la clona J20 y F) metástasis generada por la clona J20 (control negativo de la técnica). Obsérvese la diferencia de inmunotinción entre el epitelio alveolar normal (EA) y la metástasis (M), siendo estas últimas negativas. La flecha indica un vaso sanguíneo.

Tabla 5. Análisis de la inmunotinción para nm23 realizada en las clonas, en los tumores subdérmicos y en las metástasis.

CLONA	INTENSIDAD DE TINCIÓN	PORCENTAJE TEÑIDO	OBSERVACIONES
T1	+	80 %	Tinción citoplasmática homogénea
N5	+ ++	5-20 %	Tinción citoplasmática homogénea
C4	+	5 %	Tinción citoplasmática homogénea
C10	+ ++	40 - 50 %	Tinción citoplasmática heterogénea
J3	++ +++	70-90 %	Tinción citoplasmática heterogénea
J20	++ +++	70-90 %	Tinción citoplasmática heterogénea

TUMOR SUBDERMICO	INTENSIDAD DE TINCIÓN	PORCENTAJE TEÑIDO	OBSERVACIONES
N5	+	10 %	Tinción citoplasmática homogénea
C10	+ ++	80 %	Tinción citoplasmática homogénea
J3	++ +++	80 %	Tinción citoplasmática, heterogénea
J20	++ +++	90 %	Tinción citoplasmática, heterogénea

METASTASIS	INTENSIDAD DE TINCIÓN	PORCENTAJE TEÑIDO	OBSERVACIONES
N5	+	10 %	Tinción citoplasmática heterogénea
C10	+	10 %	Tinción citoplasmática heterogénea
J3	+	10 %	Tinción citoplasmática, heterogénea
J20	+	10 %	Tinción citoplasmática, heterogénea

Intensidad de la tinción: - nula; + baja; ++ media; +++ alta

Análisis histopatológico de los tumores y metástasis generados por las diferentes clonas.

Al estudiar histopatológicamente los tumores se observó que todos eran fibrosarcomas. En la tabla 6, se muestra el análisis histológico en el que se evaluó varios parámetros indicativos del grado de tumorigenicidad de cada neoplasia. Como puede observarse, los tumores desarrollados por las clonas transfectadas con *ras* normal (**C4** y **C10**), así como con el plásmido testigo (**N5**), presentaron células de morfología mixta; es decir, de células de aspecto epitelioide (células redondas) y células semejantes a fibroblastos. En general, estos tumores mostraron un grado similar de pleomorfismo y diferenciación, aunque **C4** presentó un menor número de mitosis (<10 en 10 campos), comparado con **C10** (>10 en 10 campos). Al comparar éstas características con aquellos tumores formados por las clonas con *ras* mutado (**J3** y **J20**), se observó que éstas clonas presentaron tumores con un mayor número de mitosis (>10 a 20 en 10 campos), una mayor vascularización (vasos sanguíneos en neoformación o angiogénesis) y su morfología era predominantemente fusiforme. En el resto de los parámetros fueron muy similares. Cabe mencionar que al analizar a los animales anatomopatológicamente no se observaron metástasis en ningún órgano al realizar la autopsia de los mismos, sin importar la cepa del ratón, ya fuese NIH, nu/nu o et/et.

Solo los ratones inoculados intravenosamente con las células **N5**, **C10**, **J3** y **J20** generaron metástasis. Únicamente **T1** y **C4** no fueron capaces de generar estos tumores en los pulmones. En la figura 18 se muestran dos ejemplos de cortes histopatológicos de nódulos metastásicos en pulmón de ratones inoculados con **J3** y **J20**, teñidos con hematoxilina-eosina. Se observaron tanto nódulos centrales como periféricos al pulmón, así como algunos perivasculariales. En estos tumores se observaron características similares a los desarrollados subdérmicamente, de aspecto fibroblastoide, pleomórficos y de diversos tamaños. También se pudieron observar algunas figuras mitóticas. Las células metastásicas infiltraban e invadían el pulmón, llegando a observarse en los cortes histológicos múltiples nódulos pequeños, o nódulos únicos de gran tamaño (tabla 6)

Tabla 6.**Características histopatológicas de los tumores desarrollados en los ratones.**

Clona	Morfología celular	Pleomorfismo	No de Mitosis por 10 campos.	Vascularización	Grado de diferenciación
N5	Mixta	++	<10	++	++
C4	Mixta	++/+++	<10	+	++
C10	Mixta	+++	>10	+	++
J3 y J20	Fusiforme	++/+++	>10 a 20	+++	++

+: bajo ++: medio +++: alto

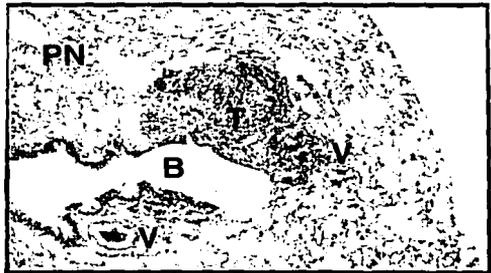


Figura 18. Cortes Histológicos de pulmones con metástasis teñidos con Hematoxilina-Eosina.

Ejemplos de dos nódulos metastásicos: A) nódulo central, B) nódulo periférico. EA, espacio alveolar; TP, tumor periférico; PN, pulmón normal; V, vaso sanguíneo; T, nódulo tumoral; AV, alveolos; B, bronquiolos. Aumento 100X.

Discusión.

La transfección del oncogen *ras* es un procedimiento ampliamente usado para transformar un sin número de líneas celulares (Kaprianou *et al.*, 1990; Ochieng *et al.*, 1991; Seiki *et al.*, 1991; Gelman *et al.*, 1992; Su *et al.*, 1993; Meade-Tollin *et al.*, 1998). Cabe señalar que en éste trabajo se encontró que la transfección tanto del gen *ras* normal como de mutado fue capaz de transformar a las células NIH 3T3, lo cual se evaluó tanto morfológicamente como en la formación de colonias en agar blando. Estos resultados ya han sido previamente demostrados en la literatura (Greig *et al.*, 1985; Thorgeirsson *et al.*, 1985).

En general las clonas transfectadas con *ras* mutado, presentan un mayor grado de transformación en comparación con el resto de las clonas tanto testigo como las transfectadas con el vector (*neo*) o con *ras* normal. Se observaron claros cambios en la morfología celular, particularmente en la aparición de células multinucleadas de mayor tamaño a las silvestres, o con aspecto semejante a neurona. El comportamiento celular también se vio modificado, ya que se observó claramente la pérdida de la inhibición por contacto en las células transfectadas con *ras*, lo cual ha sido previamente descrito (Lowy *et al.*, 1995). Particularmente, las células electroporadas con *ras*^{Val12} (**J3**, y **J20**), presentaron la formación de focos en las cajas de cultivo, con una mayor aparición de cúmulos celulares de mayor tamaño. Estos resultados correlacionaron con un mayor número de colonias en agar en dichas clonas, lo que indica que presentaron una menor dependencia de anclaje. Esto fue más evidente al emplear agar noble, ya que este tipo de agar es más selectivo por presentar una consistencia de mayor solidez, ya que en agar blando algunas células llegaron a crecer en el fondo de la caja.

Las células transfectadas con el proto-oncogen *ras* (**C4** y **C10**) también presentaron la formación de focos en algunos casos, aunque en general, éstos crecieron mucho menos en agar. Las células testigo y transfectadas con *neo* no presentan estas características morfológicas ni de comportamiento. En agar solo **T1** fue capaz de generar algunas colonias (menos de 5 por pozo). Cabe señalar que la simple introducción del plásmido no es suficiente para obtener esta característica de transformación celular, ya que en nuestro modelo

la clona **N5** no presentó cambios morfológicos o de comportamiento, como los observados para las transfectadas con *ras*, ya fuera silvestre o mutado. Esta clona (con el vector *neo*), únicamente fue capaz de generar 4 colonias en agar de bajo punto de fusión, mientras que en agar noble no se observó ninguna.

Por lo que, en general, la tendencia observada fue de una mayor capacidad de crecer en agar en las clonas con *ras* mutado con respecto al resto.

Al corroborar por Western blot la expresión de p21^{val12} se encontró que las células transfectadas con el oncogen presentaban 7 veces más esta proteína que las células testigo o transfectadas con *ras* normal, de acuerdo al análisis densitométrico. Entre las clonas **J3** y **J20** se observó que la expresión fue muy similar. El resto de las clonas no presentó la expresión de p21 mutada. La especificidad del anticuerpo fue corroborado mediante la inclusión en cada membrana de dos péptidos con el sitio del codón 12, uno con el aminoácido normal (glicina) y el otro con el mutado (valina). Al analizar la expresión de la proteína normal, no se observaron diferencias entre las células testigo y las transfectadas con pSV2*neo* (**N5**) o con pEC*neo* (**C4** y **C10**). En el caso de éstas últimas, se esperaba que las células transfectadas con Ras^{wt/neo} sobre-expresaran dicha proteína. Aunque las clonas **C4** y **C10** son capaces de sobrevivir a la selección con geneticina, ello no indica que la pEC/Ras^{wt} se este expresando. Ya que la vida media de la proteína Ras normal es menor que la de Ras mutado (Lowy D, *et al.*, 1993), puede dificultar su detección. Generalmente se recomienda el inmunoprecipitar la proteína normal para enriquecer la detección por Western blot. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, no fue posible realizar este procedimiento. Otra posibilidad es ver incrementada la presencia de RNAm para *ras* en estas células, no obstante, ello solo sugeriría que podría existir un incremento de la proteína, pero no necesariamente.

La caracterización de la invasividad *in vitro* dio resultados muy contrastantes. El menor índice de quimioinvasión por parte de las células al emplear como quimioatrayente medio con suero fetal de ternera es explicable, porque el suero contiene inhibidores de proteasas y otros factores capaces de reducir la degradación del Matrigel como son los TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteasas) o la α -2 macroglobulina (Woesner *et al.*, 1991),

y por consecuencia disminuye el paso de las células a través de la barrera. Sin embargo, al usar medio condicionado de fibroblastos, las clonas **T1** y **C4** que no formaron tumores en los ratones, fueron capaces de atravesar el Matrigel. Este resultado sugeriría que estas células también podrían generar tumores *in vivo*. Al retar las clonas con el doble de concentración de matrigel (de 50 a 100 μg), se evidenció que solo las clonas electroporadas con *ras* mutado (**J3** y **J20**) fueron capaces de atravesar esta membrana basal sintética hasta 7 y 25 veces más, respectivamente, y el resto de las clonas lo hicieron en una cantidad menor o parecida a la observada empleando 50 μg de Matrigel. Es bien conocido que una característica de un tumor agresivo es su alta capacidad invasiva y tumorigénica. El método de quimioinvasión empleando Matrigel ha sido ampliamente utilizado y validado (Albini *et al.*, 1985; Ochieng *et al.*, 1991; Casciari *et al.*, 1995). No obstante, también se ha establecido que dicho modelo no representa las condiciones que ocurren *in vivo*, así como en algunas líneas celulares no refleja su capacidad real de invasión y de generación de tumores en animales (Noël *et al.*, 1991; Vukicevic *et al.*, 1992). En nuestro caso, solo cuando se volvió a retar las clonas con el doble de concentración de Matrigel se evidenció a aquellas células con capacidad tumorigénica. Estos resultados sugieren que es muy importante la concentración empleada de esta matriz, para que realmente sea una barrera selectiva, aunque ello no sea un fiel reflejo de lo que sucede *in vivo*. Los resultados obtenidos del empleo de esta matriz por diversos autores depende de las condiciones experimentales empleadas, así como el origen de la línea celular empleada (Ochieng *et al.*, 1991; Noël *et al.*, 1991; Vukicevic *et al.*, 1992; Casciari *et al.*, 1995). A pesar de que ya se había reportado el empleo de 50 μg de Matrigel (en una área similar de membrana de nucleopore a la utilizada por nosotros), como una concentración adecuada para discriminar células NIH 3T3 no transformadas de aquellas células transfectadas con H-*ras* val12 (Albini *et al.*, 1985), en nuestras condiciones experimentales solo el doble de concentración fue capaz de diferenciar a las células transfectadas con el oncogen *ras* del resto. Ello sugeriría que para determinar la capacidad de invasión de una línea celular es indispensable el realizar ensayos de invasión *in vivo*, ya que los estudios *in vitro*, solo son útiles en la caracterización de la tumorigenicidad de las células y nos permiten evaluar en cierta medida su conducta biológica tumoral, pero pese a ello, solo en condiciones *in vivo* podemos tener la evaluación real de su

capacidad neoplásica (Noël *et al.*, 1991).

En cuanto a los tumores generados por las diferentes clonas estudiadas, se observó una clara diferencia entre las que contienen *ras* mutado o normal. Los tumores desarrollados por las clonas **J3** y **J20** son biológicamente más agresivos en comparación con los generados por el resto de las clonas, presentando un corto tiempo de aparición, un volumen tumoral mayor y una incidencia más alta, lo que correlaciona histopatológicamente con su alto pleomorfismo, mayor angiogénesis y alto número de mitosis. Dichas clonas fueron capaces de generar tumores subdérmicos, tanto en los ratones Balb/C nu/nu, como en los NIH y en los *et/et*; así como produjeron las metástasis de mayor tamaño en los ratones *et/et*, con un mayor número de nódulos pulmonares. Aunque dependiendo de la cepa de ratón, se pudo observar una mayor generación de tumores. Los ratones Balb/C nu/nu, los cuales son atímicos, y por lo tanto están inmunocomprometidos, presentaron un mayor número de tumores; mientras que los Balb/C *et/et* y los NIH, hipotímicos e inmunocompetentes (respectivamente), presentaron una menor generación de tumores. Se pudo observar que en algunos de éstos animales mostraban esplenomegalia, particularmente en aquellos animales inoculados con las clonas que no tenían transfectados a *ras* mutado. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la capacidad de generar metástasis, la clona **J20** generó nódulos metastásicos en un menor tiempo y de un mayor tamaño, comparados con los desarrollados por la clona **J3**. Al comparar con las clonas transfectadas con *ras* normal, solo **C10** fue capaz de generar tumor. En previos estudios, se ha observado que las células transfectadas con *ras* normal pueden formar tumores, debido a la sobre-expresión de proto-oncogen, lo que permite su transformación; aunque no de igual manera que el oncogen (Greig *et al.*, 1985; Bradley *et al.*, 1986). Esto explica, porque la clona **C10** también formó tumor con un desarrollo menos agresivo. La clona **C4** no fue capaz de formar tumor a pesar de estar transfectada con *ras* normal, esto sugiere que otros factores en el proceso de invasividad son importantes. De hecho, esta clona es la línea que secreta menos enzimas con respecto a las demás, lo que explica su baja capacidad de invasión *in vivo*, aunque es capaz de atravesar matrigel *in vitro*. Ambas clonas

(C4 y C10), no generaron tumores en los ratones NIH ni en los et/et.

Si ordenamos a las clonas de forma decreciente de acuerdo a la agresividad tumoral la disposición sería **J20>J3>C10>N5>C4**. Cabe señalar, que en el caso de éstas dos últimas esperábamos encontrar un comportamiento inverso, es decir, que **C4** fuera más agresivo que **N5**. Sin embargo, el tumor generado por **N5** apareció en un menor tiempo y con mayor volumen tumoral que el tumor generado por la clona **C4**, además de presentar la generación de metástasis. Ello puede deberse a varios factores: a) se ha reportado que las células NIH 3T3 silvestres son capaces de formar tumores en ratones nu/nu, pero su capacidad tumorigénica es muy baja (Greig *et al.*, 1985); b) por el método de transfección usado no es posible controlar el sitio de inserción del plásmido, por lo que no sabemos si en el caso de la clona **N5** se introdujo en un sitio del genoma celular que favoreciera este tipo de comportamiento; y c) En el caso de la clona **C4**, aunque tenga la resistencia a la geneticina se observó por el Western blot que no expresaba más la proteína Ras normal, lo cual nos indica que probablemente la expresión sea similar a la control. Una manera de resolver este problema sería determinando la expresión de RNAm de *ras* por Northern blot.

La determinación de la expresión de gelatinasas complementó los datos previamente recabados. Las enzimas observadas en los explantes tumorales y en las líneas celulares, fueron inhibidas por el EDTA, lo que sugiere que éstas enzimas son metaloproteasas, ya que este quelante secuestra al zinc y al calcio necesario para su función (McCawley *et al.* 2000). Se pudo observar bandas de degradación que correspondían a la gelatinasa A o MMP-2 (de 72-62 KDa) y a la gelatinasa B o MMP-9 (de 92-82 KDa). También, se observaron otras bandas de diferente peso molecular: 111, 58, 42, y 32 KDa. Al tratar de caracterizar las proteasas secretadas, se emplearon geles que tuvieran como sustrato caseína para corroborar si la presencia de caseinasas de 58 KDa correspondían a la enzima estromelisin (Muskin *et al.*, 1981; Matrisian *et al.*, 1990b). Los resultados sugieren que esta proteasa no corresponde a dicha enzima ya que no se generaron bandas de degradación en este sustrato. En previos estudios se han reportado gelatinasas de mayor peso a la MMP-2 y MMP-9, que al parecer son formas oligoméricas de dichas enzimas (Koshikawa *et al.*, 1992). Por lo

que también cabe la posibilidad que las gelatinasas de 111 kDa observadas aquí presentan el mismo comportamiento. Cabe recordar que la formación de los zimogramas para evaluar la secreción de gelatinasas es en condiciones semi-desnaturalizantes, ya que las proteínas al ser colocadas en el gel de poliacrilamida solo tienen SDS, no poseen β -mercaptoetanol para reducirlas y tampoco son calentadas, por lo que es probable el que se formen oligómeros proteicos (Koshikawa *et al.*, 1992).

Un punto importante de resaltar es el hecho que al parecer, a diferencia de otros autores que tratan de darle un peso mayor a la gelatinasa A ó a la B en la capacidad de invasión de una célula tumoral (Matrisian 1992; Woessner 1994; Rodgers 1999). Nuestros resultados sugieren que es necesario incluir a todas las gelatinasas secretadas por una célula o tumor. En nuestro caso, no se observó una relación entre la capacidad tumoral y una proteasa en particular, pero sí una mayor expresión de proteasas totales en las células con mayor capacidad de formación de tumores, lo que correlacionó con aquellas transfectadas con el oncogen *ras* (**J3** y **J20**) y en menor medida con las clonas transfectadas con *ras* normal, **C10**. En el caso de la clona **C4**, ésta presentó una expresión mucho menor que el resto de las clonas, lo cual correlaciona con su incapacidad de generar tumores. No obstante es de llamar la atención, que estadísticamente se encontró que la expresión del total de proteasas era muy semejante entre **C4** y **J20**, y entre **C10** y **J3** (y también entre **T1** y **N5**). Si relacionamos la capacidad de generar tumores con la expresión de proteasas, parecería lógico que **J3** y **C10** fueran capaces de generar tumores, ya que fueron las dos clonas con mayor expresión de gelatinasa A *in vitro*. Sin embargo, **J20** es capaz de generar tumores y **C4** no, por lo que, como se comentó en la introducción del presente trabajo, para que una célula sea capaz de desarrollar el fenotipo metastásico, requiere presentar cambios a diferentes niveles, como es el aumento de secreción de proteasas, aumento en la movilidad, disminución en la unión a proteínas de matriz, etc (Nicolson *et al.*, 1987; McCawley *et al.* 2000). En otras palabras, el fenotipo metastásico no está dado solo por un factor, sino que se requiere de la suma de una serie de eventos que capacitan a la célula para poder invadir y metastatizar (Nicolson *et al.*, 1987). Esto se ve de forma más clara al analizar la expresión de gelatinasas en los tumores, ya que si comparamos tanto **C10** como **J3**, disminuye la expresión de estas, en particular de las

MMP-2. Sin embargo, aumenta la expresión de la gelatinasa B o MMP-9, lo que sugiere que bajo estas circunstancias, para estas dos clonas (y al igual que para **N5**) se requiere en la invasión *in vivo* de la participación de la otra enzima; y en el caso de **J20** la expresión de estas gelatinasas aumenta en el tumor *in vivo*, hasta el doble en comparación a lo presentado *in vitro*. El hecho que la expresión de proteasas presentara variaciones en el tumor con respecto a la línea celular de origen, implica que al interaccionar la célula neoplásica con el huésped, la respuesta celular cambia, muy probablemente debido a diversos factores (comunicación intercelular, factores de crecimiento, etc.) (Nicolson *et al.*, 1982), a los que se encuentra expuesta la célula en el interior del animal. Es bien conocido que la interacción huésped-célula tumoral juega un papel primordial en el desarrollo tumorigénico (Fodstad *et al.*, 1994; Price 1994). Cabe señalar, que no son cuantitativamente comparables la expresión *in vitro* con la expresión *in vivo*, por las diferentes condiciones de las células entre ambos sitios; cualitativamente, la comparación de ambas enzimas generadas entre las células en cultivo y en el tumor en el ratón permiten relacionar los cambios de expresión que suceden entre ambas condiciones. Cada clona, a pesar de transfectarse en condiciones y con genes similares, responden de manera muy particular a las presiones de selección que ocurren en el interior del animal, y su capacidad tumorigénica no puede atribuirse solamente a cambios en la expresión de proteasas (Fodstad *et al.*, 1994; Price 1994).

Con lo que respecta al análisis inmunohistoquímico de Nm23, se observó una clara tendencia a aumentar su expresión de esta proteína en las clonas que fueron transfectadas con *ras* mutado y los tumores subdérmicos generados por éstas, en comparación con el resto de las clonas. La inmunotinción fue observada principalmente en el citoplasma celular. Cabe señalar que el anticuerpo empleado para este ensayo, reconoce tanto a la proteína citosólica (Nm23-H1), como a la nuclear (Nm23-H2), por lo que se pudo observar inmunotinción en ambos compartimentos celulares. Las clonas **T1**, **N5** y **C4** presentaron muy bajo porcentaje de tinción en las células así como en los tumores generados por éstas (0-10%) de forma homogénea. Al comparar con las clonas **C10**, **J3** y **J20**, las cuales generaron los tumores de más rápida aparición y crecimiento, éstas presentaron una inmunotinción para Nm23 mayor (del 50 % para **C10** y del casi 90 % para **J3** y **J20**), así como una mayor heterogeneidad. La

poca homogeneidad de inmunotinción en éstos tumores puede explicarse, particularmente por su mayor proliferación celular, lo cual se evidencia por un mayor volumen tumoral a lo largo del tiempo y mayor número de mitosis, en el caso de **J3** y **J20**. Caligo y col. (Caligo *et al.*, 1993) demostraron que la expresión de *nm23* se ve favorecida en la fase S del ciclo celular y disminuida en las otras, por lo que la expresión de Nm23 varía dependiendo de la etapa del ciclo celular en la que se encuentren las células. Es bien conocido, que un tumor esta constituido por múltiples clonas (Woodruff *et al.*, 1986; Nicolson *et al.*, 1987), que pueden generar distintas subpoblaciones con diferentes estadios del ciclo celular, ya que no hay una sincronización en todo el tumor. Ello aumenta la probabilidad de ver un mayor número de células en diferente fase del ciclo celular, lo que permitiría observar diversas zonas con una variada inmunotinción para Nm23 (Caligo *et al.*, 1993). También estos resultados concuerdan con el hecho de que el promotor de *nm23-H1* posee sitios AP1 (De la Rosa *et al.*, 1996), los cuales son controlados por la vía de señalización de Ras (Lowy *et al.*, 1991; Lowy *et al.*, 1993; Treisman *et al.*, 1996; Xing *et al.*, 1997; Malumbres *et al.*, 1999), por lo que se esperaría que las clonas trasfectadas con *ras*, ya fuera normal o mutado, presentarían un aumento en la expresión de éste gen. Sin embargo, contrastan los resultados observados en las metástasis para Nm23, ya que en estos la expresión de ésta proteína se observa en el 10% de las células metastásicas sin importar la transfección del gen *ras* realizada. Estos datos sugieren que en la generación de los tumores subdérmicos; así como en las clonas, existe cierta coexpresión de Nm23 con *p21^{ras}* en un porcentaje alto de células, lo cual correlaciona con un aumento de Nm23 con la transfección del gen activo de *ras*. No obstante, las células metastásicas no expresan a Nm23 en una concentración que sea apreciable inmunohistoquímicamente, lo que sugiere que durante el proceso metastásico podrían seleccionarse solo aquellas células que expresan *ras*, que son capaces de generar metástasis, pero que no expresan una concentración alta de Nm23. Cabe resaltar que en las metástasis pulmonares, el tejido alveolar normal del ratón presenta inmunotinción para Nm23, contrastando con la metástasis. Estos resultados coinciden con el hecho de que el gen *nm23-H1* es un gen supresor de metástasis (Stegg *et al.*, 1988; Rosengard *et al.*, 1989; Lacombe *et al.*, 1991; Stegg *et al.*, 1991b; De la Rosa *et al.*, 1995).

Son pocos los artículos donde relacionen la presencia de Ras con NM23. *ras* es un oncogen que se le ha relacionado con el comportamiento metastásico (Chambers *et al.*, 1993), por lo que uno esperaría que Nm23, al ser un gen supresor de metástasis, correlacionara de forma inversa con la activación de éste oncogen. Los primeros estudios realizados por Steeg demuestran que células REF (fibroblastos embrionarios de rata), transfectadas y transformadas con el oncogen *ras*, presentan una disminución en la expresión de RNAm para *nm23* (Stegg *et al.*, 1988b). Estas mismas células al ser cotransfectadas con el gen *E1a* de adenovirus, presentaron una disminución en su capacidad metastásica, así como un aumento en la expresión de *nm23* (Stegg *et al.*, 1988), lo que indicaría que este gen participa como un gen supresor de metástasis, o es un epifenómeno asociado a la disminución de la capacidad metastásica de éstas células. En este sentido, estudios realizados por el grupo de Zimmer (Graff *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1993) empleando dos diferentes formas de revertir la transformación celular generada por *H-ras*, como fue el cotransfectar a células CREF (clonas de células REF) con *Krev-1*, un gen 50% similar a *ras* (Su *et al.*, 1993); o cotransfectando con antisentidos del factor de iniciación de la traducción 4E (eIF-4E) en células CREF (Graff *et al.*, 1995), se observa la misma tendencia, una disminución en la expresión de *nm23-H1* asociada con un aumento en la capacidad metastásica; esto relacionado a otros factores de transformación, como es la disminución de TIMP-1 (inhibidor de metaloproteasa tisular-1), una alta expresión de la metaloproteasa de 92 kDa (MMP-9), un menor tiempo de latencia y una mayor velocidad de crecimiento en el volumen tumoral (Graff *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1993).

En estudios clínicos en pacientes con carcinoma hepatocelular, también se ha encontrado esta correlación inversa de un aumento en la expresión de *ras* con una disminución de *nm23-H1*, y un concomitante aumento en la presencia de metástasis, asociado a un aumento de PCNA y en la angiogénesis (Zheng *et al.*, 1998). Estas observaciones apoyarían el papel de *nm23* con un gen supresor de metástasis.

Sin embargo, diferentes estudios encuentran una correlación entre la expresión de *ras* con *nm23*. Honoki y col, encuentran que en células SOS, derivadas de lesiones pulmonares

generadas por la línea celular COS, de osteosarcoma; presentan un incremento en el RNAm de *c-Ha-ras* junto con un incremento en la expresión de *nm23* y una mayor capacidad metastásica (Honoki *et al.*, 1993). En la revisión realizada por Chambers, menciona que obtiene resultados similares en células NIH 3T3 transfectadas con el oncogen *ras* (Chambers *et al.*, 1993). En tumores humanos del cérvix-uterino, se ha reportado una relación lineal entre la expresión de Ras y Nm23, presentando éste último cierta correlación con una mayor sobrevida (Ultrera-Barillas *et al.*, 2000). Estos datos sugerirían que Nm23 correlaciona con un comportamiento tumoral agresivo y no como un gen supresor, como se ha propuesto en varios estudios en tumores humanos.

Es controversial el papel de Nm23 en el desarrollo metastásico. Mieroff en 1993 propuso que dependiendo de la extirpe celular *nm23* podría jugar o no el papel de gen supresor de metástasis. Diversos datos apoyan que *nm23* es un supresor de metástasis en modelos animales y tumores humanos. La asociación de *ras* y este gen todavía no es claro. Sin embargo, se esperaría que la expresión de *nm23* no correlacionara con la expresión de *ras*, ya que es un oncogen que favorece el comportamiento metastásico. Nuestros resultados indican que la expresión de *nm23* es modulada por oncogen *ras*; pero durante el desarrollo tumoral, algunas clonas con una menor expresión de este gen son capaces de generar metástasis, hipótesis que es apoyada porque al analizar inmunohistoquímicamente la presencia de Nm23 en las clonas y en los tumores subdérmicos, se encontraron células o sitios con mayor expresión, así como células o zonas con menor o nula presencia de ésta proteína. En las metástasis, solo se seleccionan aquellas células que no expresan Nm23, y por ello no se detecta a esta proteína en el tejido tumoral, y solo se observa en el tejido pulmonar normal circundante. Ello concordaría con que la presencia de un *ras* activo promueve una mayor expresión de Nm23, pero que al generar las metástasis, se seleccionan clonas que no lo expresan. Esto es claramente factible, dada la alta inestabilidad genética que se presenta durante el desarrollo neoplásico, lo que permitiría la aparición de nuevas subclonas durante la tumorigénesis. Cabe señalar, que el aumento en la expresión de Nm23 en las clonas con *ras* (C10, J3 Y J20) concuerda por lo observado por Bominar, que propone que Ras al ser una proteína G que requiere GTP para su actividad y Nm23 al poseer función de

NDPK podría proveer de GTP a Ras, por lo que al aumentar la expresión de Ras, Nm23 también aumentaría (Bommar et al., 1993). Recientemente, Zhu y col, han demostrado que *rad*, un gen perteneciente a la familia de *ras*, es regulado por Nm23, actuando éste como una proteína GTPasa activante, es decir, promueve la hidrólisis de GTP por parte de la proteína Rad, así como la unión de GTP a ésta proteína. A su vez, Rad regula la actividad de cinasa de Nm23, ya que la proteína es un nucleosido difosfato cinasa (Zhu et al., 2000). Lo más interesante, es que demuestran que Nm23 no es capaz de regular a Ras como GTPasa, ya que específicamente controla a Rad; pero si es capaz de favorecer el intercambio de Ras-GDP por Ras-GTP, como una proteína GEF, por transfosforilación (Zhu et al., 2000). Esta asociación funcional específica entre Nm23 y Rad, sugiere que quizás Ras no participa o interacciona de manera directa con Nm23. No obstante, no queda claro el posible papel *in vivo* entre estas dos proteínas.

Cabe señalar, finalmente, que los estudios *in vitro* empleados para caracterizar el probable comportamiento *in vivo*, sólo son una herramienta más para tratar de afrontar el estudio y caracterización del proceso tumoral. A pesar que los modelos *in vitro* son sólo una aproximación al fenómeno *in vivo*, abre la posibilidad de poder tomar más factores en cuenta para el estudio del fenómeno y que no es posible analizar en los pacientes, por las múltiples variables que están involucradas en el desarrollo neoplásico. Nm23 es una proteína multifuncional dentro de la célula, por lo que su papel durante el desarrollo tumoral probablemente es así de diverso y complejo.

Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) La transfección del gen mutado (val 12) transforman las células NIH 3T3, lo que se ve reflejado en un aumento en la secreción de proteasas y en la capacidad de invasión tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 2) Las clonas con *ras* mutado presentan un comportamiento biológicamente agresivo, en comparación con las clonas transfectadas con *ras* normal o con el plásmido testigo (pSV2neo). Esto se ve reflejado en que los tumores generados por las mismas presentan un mayor volumen tumoral, menor tiempo de aparición, e histopatológicamente un mayor número de mitosis y mayor capacidad angiogénica.
- 3) La expresión del gen *nm23* aumenta con la presencia de *ras*, tanto *in vitro*, en las células transfectadas; así como en los tumores subdérmicos generados por éstas. Sin embargo, la proteína Nm23 disminuye con la formación de metástasis, por lo que la expresión de ese gen es inverso a la capacidad metastásica celular.
- 4) La presencia de Nm23 en las metástasis se ve disminuida sin importar el tipo de gen *ras* transfectado. Ello sugiere que las células que generan la metástasis en el pulmón son aquellas que no expresan a NM23, cuando menos en una concentración que sea apreciable inmunohistoquímicamente.
- 5) No se pudo observar diferencias en la expresión de p21^{91y12} en las células transfectadas con *ras* normal con respecto a las silvestres. Sin embargo, una de las clonas transfectada con *ras* normal, presento un comportamiento más agresivo a éstas últimas.

6) No se pudo diferenciar la participación de los dos genes de la familia de nm23: H1 y H2 en el comportamiento tumorigénico. Sin embargo, la inmunotinción citosólica sugiere que *nm23-H1*, el cual posee sitios AP1, correlaciona con la expresión de *ras*. Sin embargo, en las células metastásicas no se observa la presencia de Nm23, lo que sugiere que solo se seleccionan aquellas células que por alguna razón expresan una baja, si no es que nula concentración de Nm23.

Bibliografía.

- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman H, Martin G, Aaronson S, Kozlowski J, McEwan R. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Res** 1987; 47: 3239-3245.
- Anciaux K, Van Dommelen K, Willems R, Roymans D, Slegers H. Inhibition of nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) by cAMP analogues. **FEBS Lett** 1997; 400: 75-79.
- Arai T, Watanabe M, Onodera M, Yamashita T, Masunaga A, Itoyama S, Itoh K, Sugawara I. Reduced *nm23-H1* messenger RNA expression in metastatic lymph nodes from patients with papillary carcinoma of the thyroid. **Am J Pathol** 1993; 142(6): 1938-1944.
- Arends M, McGregor A, Toft N, Brown E, Wyllie A. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by *c-myc* and mutated *Ha-ras* oncogenes and is associated with endonuclease availability. **Br J Cancer** 1993; 68: 1127-1133.
- Baker A, Zaltsman A, George S, Newby A. Divergent effects of tissue inhibitor metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death *in vitro*. **J Clin Invest** 1998; 101(6): 1478-1487.
- Ballin M, Macklay A, Hartzler J, Nason A, Pelina M, Thorgeirson U. *Ras* levels and metalloproteinase activity in normal and versus neoplastic rat mammary tissues. **Clin Expl. Metastasis** 1991; 9(2): 179-189.
- Berberich S, Postel E. PuF/Nm23/NDPK-B transactivates a human *c-myc* promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element. **Oncogene** 1995; 10: 2343-2347.
- Bevilacqua G, Sobel M, Liotta L, Steeg P. Association of low *nm23* levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. **Cancer Res** 1989; 49: 5185-5190.
- Biggs J, Hersperger E, Steeg P. A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. **Cell** 1990; 63: 935-940.
- Bishop J. Molecular themes in oncogenesis. **Cell** 1991; 64: 235-248.
- Bominaar A, Molijn A, Pestel M, Veron M, Van Haastert P. Activation of G-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium*. **EMBOJ** 1993; 12(6): 2275-2279.
- Bominaar A, Tepper A, Véron M. Autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase on non-histidine residues. **FEBS Lett** 1994; 353: 5-8.
- Bonfil D, Vinyals A, Bustuocabad O, Llorens A, Benavides F, González-Garrigues M, Fabra A. Stimulation of angiogenesis as an explanation of matrigel-enhanced tumorigenicity. **Int J Cancer** 1994; 58: 233-239.

- Bonni A, Brunet A, Westa A, Datta S, Takasu M, Greenberg M. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. **Science** 1999;286: 1358-1362.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-254.
- Bradley M, Kraynak A, Storer R, Gibbs J. Experimental metastasis in nude mice of NIH 3T3 cells containing various *ras* genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83: 5277-5281.
- Buckley I. Tumorigenesis: A malignant scenario. **Cell Biol Int Rep** 1991; 15(7):545-549.
- Caligo M, Cipollini G, Cope Di Valromita A, Bistocchi M, Bevilacqua G. Decreasing expression of *NM23* gene in metastatic murine mammary tumors of viral etiology (MMTV). **Anticancer Res** 1992; 12: 969-974.
- Caligo M, Cipollini G, Fiore L, Calvo S, Basolo F, Collecchi P, Ciardiello F, Pepe S, Petrini M, Bevilacqua G. *Nm23* gene expression correlates with cell growth rate and S-phase. **Int J Cancer** 1995; 60: 837-842.
- Cantley L, Auger K, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. **Cell** 1991; 64: 281-302.
- Casciari J, Chin L, Livesey J, Boyles D, Steen G, Rasey. Growth rate, labeling index, and radiation survival of cells grown in the matrigel thread *in vitro* tumor model. **In Vitro Cell Dev Biol** 1995; 31: 582-589.
- Cohn K, Wang F, DeSoto-LaPaix F, Solomon W, Patterson L, Aenold M, Weimar J, Feldman J, Lavy A, Leona A, Steeg P. Association of *nm23-H1* allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. **The Lancet** 1991; 338: 722-724.
- Cooper G. (1995). **Oncogenes**. Jones & Bartlett. E.U.A. 3-80, 222-241 pp.
- Chambers A, Tuck A. *Ras*- responsive genes and tumor metastasis. **Crit Rev Oncogen** 1993a; 4(2): 95-114.
- Chambers A, Hota C, Prince C. Adhesion of metastatic, *ras*-transformed NIH 3T3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. **Cancer Res** 1993b; 53: 701-706.
- Chardin P, Camonis J, Gale N, Van Aelst L, Schlessinger J, Wigler M, Bar-Sagi D. Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. **Science** 1993; 260: 1338-1342.
- De La Rosa A, Williams R, Steeg P. Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. **BioEssays** 1995; 17(1): 53-62.
- De La Rosa A, Mikhak B, Steeg P. Identification and Characterization of the promoter for the human metastasis suppressor gene *nm23-H1*. **Arch Med Res** 1996; 27(3): 395-401.
- Dong J-T, Lamb P, Rinker-Schaeffer C, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs J, Barrett J. *Kai1*, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. **Science** 1995; 268: 884-886.

- Downward J. Cell cycle: Routine role for Ras. **Curr Biol** 1997; 7: R258-R260.
- Eccles, S. Differentiation and neoplasia. Invasion and metastasis: experimental systems. **J Pathol.** 1983; 141: 333-353.
- Egan S, Weinberg R. The pathway to signal achievement. **Nature** 1993; 365: 781-783.
- Engel M, Theisinger B, Seib T, Seitz G, Huwer H, Zang K, Welter C, Doodley S. High levels of Nm23-H1 and Nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. **Int J Cancer** 1993; 55: 375-379.
- Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seyfert U, Welter C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase A. **J Biol Chem** 1998; 273(32): 20058-20065.
- Evans C. A genetic Basis for metastasis. **Cell Biol Int Rep** 1991; 15 (12): 1175-1181.
- Feldman M, Eisenbach L. What makes a tumor cell metastatic?. **Sci Amer** 1988; 259 (4):40-47.
- Fenton R, Hixon J, Wright P, Brooks A, Sayers T. Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras. **Cancer Res** 1998; 58: 3391-3400.
- Fishman J, Gumerlock P, Meyers F, Whita R. Quantitation of Nm23 expression in human prostate tissues. **J Urol** 1994; 152: 202-207.
- Flørenes V, Aamndal S, Myklebost O, Maelandsmo G, Bruland Ø, Fodstad Ø. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. **Cancer Res** 1992; 52 (21): 6088-6091.
- Fodstad Ø, Kjønniksen I. Microenvironment revisited: Some reprisal of some prevailing concepts of cancer metastasis. **J Cell Biochem** 1994; 56: 23-28
- Fridman R, Sweeney T, Zain M, Martin G, Kleinman H. Malignant transformation of NIH-3T3 cells after subcutaneous co-injection with a reconstituted basement membrane (matrigel). **Int J Cancer** 1992; 51: 740-744.
- Freije J, McDonald N, Steeg P. (1996) Differential gene expression in tumor metastasis: Nm23. **Attempts to Understand Metastasis Formation II. Regulatory Factors.** U. Günthert and Birchmeier W. Eds. Springer. EUA. pp 215-232.
- Freije J, Blay P, MacDonald N, Manrow R, Steeg P. Site-directed mutation of Nm23-H1. **J Biol Chem** 1997; 272(9): 5525-5532.
- Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, Di Francesco C, Caenazzo C, Onisto M, Micela M, Stetler-Stevenson W, Liotta L. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. **Cancer Res** 1992; 52: 4548-4549
- Gelman E, Thompson E, Sommers C. Invasive and metastatic properties of MCF-7 cells and *ras^H*-transfected MCF-7 cell lines. **Int J Cancer** 1992; 50: 665-669.
- Gilles A-M, Presecan E, Vonica A, Lascu I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. **J Biol Chem** 1991; 266: 8784-8789.

- Graff J, Boghaert E, De Benedetti A, Tudor D, Zimmer C, Chan S, Zimmer S. Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of *ras*-transformed cloned rat embryo fibroblasts. **Int J Cancer** 1995;60:255-263.
- Greene D, Taylor S, Aihara M, Yoshida K, Egaea S, Park S, Timme T, Yang G, Scardino P, Thompson T. DNA ploidy and clonal selection in *ras* + *myc*-induced mouse prostate cancer. **Int J Cancer** 1995; 60; 395-399.
- Greig R, Koestler T, Trainer D, Corwing S, Miles L, Kline T, Sweet R, Yokoyama S, Poste G. Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and *ras*-transfected NIH/3T3 cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985; 82: 3698-3701.
- Guido M, Zamorano R, Garrido-Guerrero E, Gariglio P, García-Carrancá A. Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. **J Gen Virol** 1992; 73: 1395-1400.
- Hackestein JH. The lethal prune/killer of prune interaction of *Drosophila* causes a syndrome resembling human neurofibromatosis (NF1). **Eur J Cell Biol** 1992; 58 (2): 429-444.
- Hajnal A, Klemenz R, Schäfer R. Up-regulation of lysyl-oxidase in spontaneous revertants of H-*ras*-transformed rat fibroblast. **Cancer Res** 1993; 53: 4670-4675.
- Hähnel E, Dawkins H, Robbins P, Hähnel R. Expression of stromelysin-3 and nm23 in breast carcinoma and related tissues. **Int J Cancer** 1994; 58: 157-160.
- Haut M, Stegg P, Willson J, Markowitz S. Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83: 712-716.
- Henderson B. Expression of the *nm23-2/NDP kinase α* gene in rat mammary and oral carcinoma cells of varying metastatic potential. **Br J Cancer** 1993; 68(5): 874-878.
- Hennesy C, Henry J, May F, Westley B, Angus B, 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.
- Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H, Kodama K, Nakamori S, Tateishi R, Kimura N. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. **Cancer Res** 1992; 66 (3): 533-536.
- Hildebrandt M, Lacombe M-L., Mesnildrey S, Véron M. A human NDP-kinase B specifically binds single-stranded poly-pyrimidine sequences. **Nucleic Acids Res** 1995; 23(19): 3858-3864.
- Hill S, Wilson S, Chambers F. Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-*ras*-transformed NIH 3T3 cells. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80: 484-490.
- Hirayama R, Sawai S, Tagaki Y, Mishima Y, Kimura N, Shimada N, Esaki Y, Kurashima C, 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.

- Hofmann M, Rudy W, Günther U, Zimmer S, Zawadzki V, Zöller M, Lichtener R, Herrlich P, Ponta H. A link between *ras* and metastatic behaviour of tumor cells: *ras* induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. **Cancer Res** 1993; 53(7-8): 1516-1521.
- Honoki K, Tsutsumi M, Miyauchi Y, Mii Y, Tsujiuchi T, Morishita T, Miura S, Aoki M, Kobayashi E, Tamai S, Konishi Y. Increased expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 and c-Ha-ras mRNA is associated with spontaneous lung metastasis in rat-transplantable osteosarcomas. **Cancer Res** 1993; 53(20): 5038-5042.
- Hughes P, Renshaw M, Pfaff M, Forsyth J, Keivens V, Schwartz M, Ginsberg M. Suppression of Integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase Pathway. **Cell** 1977; 88: 521-530.
- Hume C, Accolla R, Lee J. Defective HLA class II expression in a regulatory mutant is partially complemented by activated *ras* oncogenes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84: 8603-8607.
- Hunter T. Oncoprotein networks. **Cell** 1997; 88: 333-346.
- Husain Z, Fei Y, Roy S, Solt D, Polverini P., Biswas D. Secuencial expression and cooperative interaction of c-Ha-ras and c-erbB in *in vivo* chemical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86: 1264-1268.
- Igawa M, Rukstalis D, Tanabe T, Chodak G. High levels of *nm23* expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. **Cancer Res** 1994; 54: 1313-1318.
- Ji L, Arcinas M, Boxer L. The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. **J Biol Chem** 1995; 272(2): 13392-13398.
- Jiang W, Hiscox S, Bryce R, Horrobin D, Mansel R. The effects of n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of *nm-23* in human cancer cells. **Br J Cancer** 1998; 77(5): 731-738.
- Jiménez B, Arends M, Esteve P, Perona R, Sánchez R, Ramon and Cajal S, Williye A, Lacal J. Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpressioe of *rho*-p21, a GTPase protein of the *ras* superfamily. **Oncogene** 1995; 10: 811-816.
- Kantor J, McCormick B, Steeg P, Zetter B. Inhibition of cell motility after *nm23* transfection of human and murine tumor cells. **Cancer Res** 1993; 53: 1971-1973.
- Kaprianou N, Isaacs J. Relationship between metastatic ability and H-ras oncogene expression in rat mammary cancer cells transfected with v-H-ras oncogene. **Cancer Res** 1990; 50: 1449-1454.
- Kimura N, Johnson G. Increased membrane-associated nucleoside diphosphate kinase activity as a possible basis for enhanced guanine nucleotide-dependent adenylate cyclase activity induced by picolinic acid treatment of simian virus 40-transformed normal rat kidney cells. **J Biol Chem** 1983; 258(20): 12609-12617.
- Kimura N, Shimada N. Membrane-associated nucleoside diphosphate kinase from rat liver. **J Biol Chem** 1988; 263(10): 4647-4653.

- Kimura N, Shimada N, Nomura K, Watanabe K. Isolation and characterization of cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. **J Biol Chem** 1990; 265(26): 15744-15749.
- Kiss, Z, Crilly K. Ha-Ras stimulates uptake and phosphorylation of ethanolamine: inhibition by wortmannin. **FEBS lett** 1995; 357: 279-282.
- Kjønniksen I, Storeng R, Phil A, McLemore T, Fodstad Ø. A human tumor lung metastasis model in athymic nude rats. **Cancer Res** 1989; 49: 5148-5152.
- Kodera Y, Isobe K, Yamaguchi M, Kondoh K, Kimura N, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I, Takagi H. Expression of *nm23* H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. **Cancer** 1994; 73(2): 259-265.
- Kolkhorst V, Stürzebecher J, Wiederanders B. Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. **J Cancer Res Clin Oncol** 1998; 124: 598-606.
- Koong A, Chen E, Mivechi N, Denko N, Stambrook P, Giaccia A. Hypoxic activation of nuclear factor- κ B is mediated by *ras* and *Raf* signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). **Cancer Res** 1994; 54: 5273-5279.
- Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. **Cancer Res** 1992; 52: 5046.
- Kraeft S-K, Traincart F, Mesnildrev S, Bourdais J, Véron M, Bo Chen L. Nuclear localization of nucleoside diphosphate kinase type B (*nm23-H2*) in cultured cells. **Exp Cell Res** 1996; 227: 63-69.
- Kramer R, Bensch K, Wong J. Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. **Cancer Res** 1986; 46: 1980-1989.
- Kristensen G, Holm R, Abeler V, 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.
- Lacombe M-L, Sastre-Garau X, Lascu I, Vonica A, Wallet V, Thierry J, Véron M. Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (Nm23) in solid tumours. **Eur J Cancer** 1991; 27 (10): 1302-1307.
- Laird A, Shalloway D. Oncoprotein signalling and mitosis. **Cell Signal**. 1997;9(3/4): 249-255.
- Leone A, McBride O, Weston A, Wang M, Anglard P, Croop C, Goepel J, Lidereau R, Callahan R, Lineham W, Rees R, Harris C, Liotta L, Steeg P. Somatic allelic deletion of *nm23* in human cancer. **Cancer Res** 1991a; 51 (9): 2490-2493.
- Leone A, Fiatow U, King R, Sandeen M., Margulies I, Liotta L, Steeg P. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of *nm23*-transfected melanoma cells. **Cell**. 1991b; 65: 25-35.
- Leung S-M, Hightower L. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperonin and is identified as a member of the Nm23/Nucleoside diphosphate kinase family. **J Biol Chem** 1977; 272(5): 2607-2614.

- Levine, A. (1992) **Tumour suppressor genes, the cell cycle and cancer**. Cold Spring Harbor Lab Press. E.U.A. pp 5-42.
- Liotta L, Rao C, Barsky S. Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab Invest** 1983; 49(6): 636-649.
- Liotta, L. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. **AJP** 1984; 117(3): 339-348.
- Liotta, L. Tumor invasion and metastases-role of the basement membrane: roads Memorial Award Lecture. **Cancer Res** 1986; 46: 1-7.
- Liotta L, Stettler-Stevenson W. Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. Cap. 7 de DeVita V (1989). **Cancer. Principles e Practice of Oncology**. Lippcott. E.U.A.. pp 98-112.
- Liotta L, 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.
- Lokeshwar B, Selzer M, Block N, Gunja-Smith Z. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. **Cancer Res** 1993; 53: 4493-4498.
- Lowy D, Zhang K, DeClue J., Willumsen B. Regulation of p21^{ras} activity. **TIG** 1991; 7(11-12): 346-351
- Lowy D, Willumsen B. Function and regulation of Ras. **Annu Rev Biochem** 1993; 52: 851-891.
- Lu X, Park S, Thompson T, Lane D. *ras*- induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated *ras* and *myc* together can induce carcinoma without p53 mutation. **Cell** 1992; 70: 153-161.
- Luo W, Matsuo K, Nagayama Y, Urano T, Furukawa K, Takeshita A, Nakayama T, Yokoyama N, Yamashita S, Izumi M, Shiku H, Nagataki S. Immunohistochemical analysis of expression of *nm23*/Nucleoside diphosphate kinase in human thyroid carcinomas: Lack of correlation between its expression and lymph node metastasis. **Thyroid** 1993; 3(2): 105-109.
- Macara I, Lounsbury K, Richards S, McKiernan R, Bar-Sagi D. The superfamily of GTPases. **FASEB J** 1996; 10: 625-630.
- MacDonald N, De La Rosa A, Benedict M, Freije J, Krutsch H, 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.
- MacDonald N, Freije J, Stracke M, Marrow R, Steeg P. Site-directed mutagenesis of *nm23-H1*. **J Biol Chem** 1996; 271(41): 25107-25116.

- Maher J, Baker D, Manning M, Dibb N, Roberts I. Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-*ras*. **Oncogene** 1995; 11: 1639-1647.
- Malumbres M, Pellicer A. Ras signaling in cell cycle regulation in its role in tumor development. **Rev Oncologia** 1999; 1:66-76.
- Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, Iacovella S, Leone A, Mancuso S. **Br J Cancer** 1996; 74: 1063-1068.
- Marshall C. How does p21^{ras} transform cells? **TIG** 1991a; 7(3) 91-95.
- Marshall C. Tumor suppressor genes. **Cell** 1991b; 64: 313-326.
- Marshall C. Ras effectors. **Curr Op Cell Biol** 1996; 8: 197-204.
- Martinez R, Venturelli D, Perroti D, Veronese M, Kastury K, Druck T, Huebner K, Calabretta B. Gene structure, promoter activity, and chromosomal localization of the *Dr-nm23* gene, a related member of the *nm23* gene family. **Cancer Res** 1997; 57: 1180-1187.
- Maruta H, Burgess A. Regulation of the Ras signalling Network. **Bioessays** 1994; 16(7): 489-495
- Matrisian L. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **TIG** 1990; :121-125.
- Matrisian L M, Bowden G T. Stromelysin/transin and tumor progression. **Semin Cancer Biol** 1990b; 1: 107.
- Matrisian L. The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays** 1992; 14(7): 455-463.
- Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. **J Cell Biochem** 1993; 53: 288-295.
- McCawley L, Matrisian L. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Mol Med Today** 2000;6:149-156.
- Meade-Tollin L, Boukamp P, Fusening N, Bowen C, Tsang T, Bowden G. Differential expression of matrix metalloproteinases in activated c-rasHa-transfected immortalized human keratinocytes. **Br J Cancer** 1998; 77(5): 724-730.
- Mendai M, Konishi I, Koshiyama M, Mori T, Arai S, Tashiro H, Okamura H, Nomura H, Hiai H, 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: 1825-1830.
- Miller A, Samid D. Tumor resistance to oxidative stress: association with *ras* oncogene expression and reversal by lovastatin, an inhibitor of p21 *ras* isoprenylation. **Int J Cancer** 1995; 60: 249-254.
- Milon L, Rousseau-Merck M-F, Munier A, Erent M, Lasco I, Capeau J, Lacombe M-L. *nm23-H4*, a new member of the family of human *nm23*/ nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. **Hum Gen** 1997; 99: 550-557.

- Miranda E, Santana C, Rojas E, Hernández S, Ostrosky-Wegman P, García-Carrancá A. Induced mitotic death of Hela cells by abnormal expression of c-H-ras. **Mut Res** 1996; 349: 173-182.
- Montgomery A, DeClerck Y, Langley K, Reisfeld R, Mueller B. Melanoma mediated dissolution of extracellular matrix: Contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways. **Cancer Res** 1993; 53: 693-700.
- Moodie S, Willumsen B, Weber M, Wolfman A. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. **Science** 1993; 260: 1658-1661.
- Moodie S, Wolfman A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. **TIG** 1994; 10(2): 44-48.
- Moses M, Wiederschain D, Loughlin K, Zurakowski D, Lamb C, Freeman M. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. **Cancer Res** 1998; 58: 1395-1399.
- Müller R, Mumberg D, Lucibello F. Signals and genes in the control of cell-cycle progression. **Biochim Biophys Acta** 1993; 11(55): 151-179.
- Munier A, Feral C, Milon L, Pinon V, Gyapay G, Capeau J, Guellaen G, Lacombe M. A new human *nm23* homologue (*nm23H5*) specifically expressed in testis germinal cells. **FEBS Lett** 1998; 434(3): 289-294.
- Murphy G, Murphy G, Reynolds J. The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. **FEBS** 1991; 289(1): 4-7.
- Muschel R, Williams J, Lowy D, et al. Harvey ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. **AJP** 1985; 121: 1-8.
- Muskin R, Soreq H. Sensitive autoradiographic quantification of electrophoretically separated proteases. **Annal Biochem** 1981; 118: 252.
- Myeroff I, 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.
- Nebrada A, Gavin A-C. Cell survival demands some Rsk. **Science** 1999;286: 1309-1610.
- Needham D. Possible role of cell cycle-dependent morphology, geometry, and mechanical properties in tumor cell metastasis. **Cell Biophys** 1991; 18(2): 99-121.
- Nicolson G. Metástasis cancerosas. **Invest. Ciencia** 1979; 32: 22-33.
- Nicolson, L, Porte, G. (1982). **Current problems in cancer: Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis; properties of metastatic cells.** vol. 7, No. 6. Ed. Year Book Medical Publishers. pp 83.
- Nicolson G. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. **Cancer Res** 1987; 47: 1473-1487.

- Noël A, Callé A, Emonard H, Nusgens B, Simar L, Foidart J, Lapiere C, Foidart J-M. Invasion of reconstituted basement membrane matrix is not correlated to the malignant metastatic cell phenotype. **Cancer Res** 1991; 51: 405-414.
- Nosaka K, Kawahara M, Masuda M, Satomi Y, Nishino H. Association of nucleoside diphosphate kinase *nm23-H2* with human telomeres. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 243: 342-348.
- Ochieng J, Basolo F, Albin A, Watanabe H, Russo J. Increased invasive, chemotactic and locomotive abilities of c-Ha-ras-transformed human breast epithelial cells. **Invasion Metastasis** 1991; 11: 38-47.
- Ohneda K, Fukuda M, Shimada N, Ishikawa N, Ichou T, Kaji K, Toyota T, Klmura N. Increased expression on nucleoside diphosphate kinases/nm23 in human diploid fibroblast transformed by SV40 large T antigen or 60Co irradiation. **FEBS Lett** 1994; 348: 273-277.
- Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hayashi M, Henzel W, Hozumi M. Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with nm23/nucleoside diphosphate kinase. **Biochem Biophys Res Commun** 1992; 182(3): 987-994.
- Okabe-Kado J, Kasukabe T, Hozumi M, Honma Y, Kimura N, Baba H, Urano T, Shiku H. A new function of Nm23/NDP kinase as a differentiation inhibitory factor, which does not require it's kinase activity. **FEBS Lett** 1995; 363: 311-315.
- Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodovar M, Pedraza V. MCF-7 Breast cancer cells grown as multicellular spheroids *in vitro*, effect of 17 β -estradiol. **Int J Cancer** 1992; 50: 112-117.
- Olivier J, Raabe T, Henkemeyer T, Dickson B, Mbamalu G, Margolis B, Schlessinger J, Hafen E, Pawson T. A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. **Cell** 1993; 73: 179-191.
- Ossowski L, Reich E. Experimental model for quantitative study of metastasis. **Cancer Res.** 1980; 40: 2300-2309.
- Parhar R, Shi Y, Zou M, Farid N, Ernst P, Al-Sedairy S. Effects of cytokine-mediated modulation of Nm23 expression on the invasion and metastatic behaviour of B16F10 melanoma cells. **Int J Cancer** 1995; 60: 204-210.
- Parish C, Jakobsen K, Coombe D. A basement-membrane permeability assay which correlates with the metastatic potential of tumour cells. **Int J Cancer** 1992; 52: 378-383.
- Patterson H. Approaches to proto-oncogene and tumour suppressor gene identification. **Eur J Cancer** 1992; 28 (1): 258-263.
- Pawson T. SH2 and SH3 domains in signal transduction. **Adv Cancer Res** 1994; 64: 87-110.
- Postel E, Flint S, Kessler D, Hogan M. Evidence that a triplex-forming oligodeoxiribonucleotide binds to the *c-myc* promoter in ea cells, thereby reducing *c-myc* mRNA levels. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88: 8227-8231.

- Postel E, Ferrone C. Nucleoside diphosphate kinase enzyme activity of Nm23-H2/Puf is not required for its DNA binding and *in vitro* transcriptional functions. **J Biol Chem** 1994; 269(12): 8627-8630.
- Postel E, Weiss V, Beneken J, 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** 1996a; 93: 6892-6897.
- Postel E. (1996b) Nm23/nucleoside diphosphate kinase as a transcriptional activator of *c-myc*. **Attempts to Understand Metastasis Formation II. Regulatory Factors**. U. Günthert and Birchmeier W. Eds. Springer. EUA. pp 233-252.
- Powel W, Matrisian L. (1996) Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. **Attempts to Understand Metastasis Formation I. Metastasis-related molecules**. U. Günthert and Birchmeier W. Eds. Springer. EUA. pp 1-21.
- Price J. Analyzing the metastatic phenotype. **J Cell Biochem** 1994; 56: 16-22.
- Ray J, Stettler-Stevenson W. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. **Eur Respir J** 1994; 7: 2062-2072.
- Roberts R, Mösch H-U, Fink G. 14-3-3 proteins are essential for Ras/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. **Cell** 1997; 89:1055-1065.
- Rodgers W. Matrix Metalloproteinases and carcinogenesis. **Hum Pathol** 1999; 30(4): 363-364.
- Rosengard A, Krutzsch H, Shearn A, Biggs J, Barker E, Margulies I, King R, Liotta L, Steeg P. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. **Nature** 1989; 342: 177-180.
- Ruoslahti E. How cancer spread. **Sci Amer** 1996; 275(3): 42-47.
- Sastre-Garau X, Lacombe M, Jouve M, Verón M, Magdelénat H. Nucleoside diphosphate kinase/NM23 expression in breast cancer: lack of correlation with lymph-node metastasis. **Int J Cancer** 1992; 50: 533-538.
- Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. **Oncogene** 1993; 8: 395-405.
- Satoh T, Fantl W, Escobedo J, Williams L, Kasiro Y. Platelet-derived growth factor receptor mediates activation of Ras through different signaling pathways in different cell types. **Mol Cell Biol** 1993; 13(6): 3706-3713.
- Sawan A, Lascu I, Veron M, Anderson J, Wright C, Horne C, Angus B. NDP-K/nm23 expression in human breast cancer in relation to relapse, survival, and other prognostic factors: an immunohistochemical study. **J Pathol** 1994; 172: 27-34.
- Seiki M, Sato H, Liotta L, Schiffmann E. Comparison of autocrine mechanisms promoting motility in two metastatic cell lines: Human melanoma and *ras*-transfected NIH3T3 cells. **Int J Cancer** 1991; 49: 717-720.

- Seiki M. (1996) Membrane type-matrix metalloproteinase and tumor invasion. **Attempts to Understand Metastasis Formation I. Metastasis-related molecules.** U. Günthert and Birchmeier W. Eds. Springer. EUA. pp 23-32.
- Serrano M, Lin A, McCurrach M, Beach D, Lowe S. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 ink4a. **Cell** 1997; 88: 593-602.
- Shi Y, Parhar R, Zou M, Al-Seidairy S, Farid N. Differential *nm23* gene expression at the fetal-maternal interface. **Br J Cancer** 1994; 70: 440-444.
- Shing, R, Fidler I. (1996). Regulation of tumor angiogenesis by organ-specific Cytokines. **Attempts to Understand Metastasis Formation II. Regulatory Factors.** U. Günthert and Birchmeier W. Eds. Springer. EUA. pp 1-11.
- Siegel G, Wang M-H, Rinehart C, Kennedy J, Goodly L, Miller Y, Kaufman D, Singh R. Development of a novel human extracellular matrix for quantitation of the invasiveness of human cells. **Cancer Lett** 1993; 69: 123-132.
- Sjölander A, Yamamoto K, Huber B, Lapetina E. Association of p21^{ras} with phosphatidylinositol 3-kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88: 7908-7912.
- Slack J, Parker M, Robinson V, Bornstein P. Regulation of collagen I gene expression by *ras*. **Mol Cell Biol** 1992; 12(10): 4714-4723.
- Slamon D. Expression of the *nm23* gene and breast cancer prognosis. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83 (4):229-231.
- Sobel M. Metastasis suppressor genes. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82(4): 267-276.
- Sorscher S, Stegg P, Feramisco J, Buckmaster C, Boss G, Meinkoth J. Microinjection of an *Nm23* specific antibody inhibits cell division in rat embryo fibroblast. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 195(1): 336-345.
- Spinucci C, Zucker S, Wieman J, Lysik R, Imhof B, Ramamurthy N, Liotta L, Hideaki N. Purification of a gelatin-degrading type IV collagenase secreted by *ras* oncogene-transformed fibroblast. **J Natl Cancer Inst** 1988; 80: 1416-1420.
- Sreenath T, Matrisian L, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti R. Expression of matrix metalloproteinases genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. **Cancer Res** 1992; 52: 4942-4947.
- Stahl J, Leone A, Rosengard A, Porter L, King R, Steeg P. Identification of a second human *nm23* gene, *nm23-2*. **Cancer Res** 1991; 51: 445-449.
- Stegg P, Bevilacqua G, Kopper L. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. **J Natl Cancer Inst.** 1988a; 80: 200-204.
- Stegg P, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta L, Sobel M. Altered expression of *NM23*, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus *E21a* inhibition of experimental metastasis. **Cancer Res.** 1988b; 48: 6550-6554.
- Stegg p, Cohon K, Leone Alvaro. Tumor metastasis and *nm23*: current concepts. **Cancer Cells** 1991a; 3(7): 257-262.

- Steed P, Bevilacqua G, Sobel M, Liotta L. Identification and characterization of differentially expressed genes in tumor metastasis: the *nm23* gene. **Basic Life Sci** 1991b; 57: 355-356.
- Su Z-Z, Austin V, Zimmer S, Fisher P. Defining the critical gene expression changes associated with expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-*ras*-transformed cloned embryo fibroblast cells. **Oncogene** 1993, 8: 1211-1219.
- Sugiura Y, Shimada H, Seeger R, Laug W, DeClerck Y. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. **Cancer Res** 1998; 58: 2209-2216.
- Tsuiji H, Nitta M, Furuya A, Hanai N, Fujiwara T, Inagaki M, Kochi M, Ushio Y, Saya H, Nakamura H. A novel human nucleoside diphosphate (NDP) kinase, Nm23-H6, localizes in mitochondria and affects cytokinesis. **J Cell Biochem** 1999 Dec;76(2):254-69.
- Théret N, Musso O, Campion J, Turlin B, Loréal O, L'Helgoualc'h A, Clément B. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in liver from patients with gastrointestinal adenocarcinoma and no detectable metastasis. **Int J Cancer** 1997; 74: 426-432.
- Thorgeirsson U, Turpeenniemi-Hujanen T, Williams J, Westin E, Heilman C, Talmadge J, Liotta L. NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated *ras* oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice. **Mol Cell Biol** 1985; 5(1): 259-262.
- Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. **Curr Opin Cell Biol** 1996; 8: 205-215.
- Troll H, Winckler T, Lascu I, Müller N, Saurin W, Véron M, Mutzel R. Separate Nuclear genes encode cytosolic and mitochondrial nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium discoideum*. **J Biol Chem** 1993; 268(34): 25469-25475.
- Tuck A, Wilson S, Khokha R, Chambers A. Different patterns of gene expression in ras-resistant and ras-sensitive cells. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83(7): 485-491.
- Utrera-Barillas D, Salcedo-Vargas M, Gariglio-Vidal P, Hernández-Hernández D, Gutiérrez-Delgado F, Benítez-Bribiesca L. H-*ras* and Nm23-H1 gene expression and proteolytic activity in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Arch Med Res** 2000; 31: 172-181.
- Varesco L, Caligo M, Simi P, Black D, Nardini V, Casarino L, Rocchi M, Ferrara G, Solomon E, Bevilacqua G. The *nm23* gene maps to human chromosome band 17q22 and shows a restriction fragment length polymorphism with Bg/II. **Genes Chrom Cancer** 1992; 4: 84-88.
- Vendettis E, Fasano O. Energetic aspects of intramolecular coupling between the nucleotide binding site and the distal switch II region of the yeast RAS2 protein. **FEBS Lett** 1994; 347: 133-136.

- Vukicevic S, Kleinman H, Luyten F, Roberts A, Roche N, Reddi A. Identification of multiple active growth factors in basement membrane matriges suggest caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. **Exp Cell Res** 1992; 202: 1-8.
- Wagner P, Steeg P, Vu N-D. Two-component kinase-like activity of *nm23* correlates with its motility-suppressing activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94: 9000-9005.
- Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe M-L. *Dyctiostelium* nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development. **J Natl Cancer Inst** 1990; 82:01199-1202.
- Wang L, Patel U, Ghosh L, Chan H-C, Banerjee S. Mutation in the *nm23* gene is associated with metastasis in colorectal cancer. **Cancer Res** 1993; 53 (4): 717-720.
- Weinberg R. How cancer arises. **Sci Amer** 1996; 275(3): 32-40.
- Weterman M, Ajubi N, Van Dinter I, Degen W, Van Muijen G, Ruiter D, Bloemers H. *nmb*, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. **Int J Cancer** 1995; 60: 73-81.
- Wewer U, Taraboletti G, Sobel M, Albrechtsen R, Liotta L. Role of laminin receptor in tumor cell migration. **Cancer Res** 1987; 47: 5691-5698.
- White M, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, Karin M, Wingler M. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. **Cell** 1995; 80: 533-541.
- Woessner J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J** 1991; 5:2145-2154.
- Woessner J. The family of matrix metalloproteinases. **Ann NY Acad Sci USA** 1994; 732: 11-16.
- Woodruff M, Ansell J, Hodson B, Potts R. Oligoclonal tumors. **Int J Cancer** 1986;38:747-751.
- Xing H, Kornfeld K, Muslin A. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. **Curr Biol** 1997; 7: 294-300.
- Yamaguchi A, Urano T, Fushida S, Furukawa K, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I, Nakagawara G, Shiku H. Inverse association of *nm23-H1* expression by colorectal cancer with liver metastasis. **Br J Cancer** 1993;68(3): 1020-1024
- Zhang J-Y, Schultz R. Fibroblast transformed by different *ras* oncogenes show dissimilar patterns of protease gene expression and regulation. **Cancer Res** 1992; : 6682-6689.
- Zheng X, Ling Z, Tang Z, Liu Y, Feng L, Zhuang W. The abundance of NM23-H1 mRNA is related with *in situ* microenvironment and intrahepatic metastasis in hepatocellular carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 1998; 17(3): 337-341.

Zhu J, Tseng Y-H, Kantor J, Rhodes C, Zetter B, Moyers J, Kahn R. Interaction of the Ras-related protein associated with diabetes Rad and the putative tumor metastasis suppressor NM23 provides a novel mechanism of GTPase regulation. **PNAS** 1999; 96(26): 14911-14918.

Zou M, Shi Y, Al-Sedairy S, Farid N. High levels of Nm23 gene expression in advanced state of thyroid carcinomas. **Br J Cancer** 1993;68:385-388.