



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa soluble
sobre la actividad de la metaloproteasa de matriz 2 en la
línea celular A549.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO ESPINA ORDOÑEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ**

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Espina
Ordoñez
Marco Antonio
57 97 08 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307179812
2. Datos del tutor
Dra
Lourdes María
Barrera
Ramírez
3. Datos del sinodal 1
Dra
Annie
Pardo
Cemo
4. Datos del sinodal 2
Dr
José Guadalupe
Cisneros
Lira
5. Datos del sinodal 3
Dra
María de Lourdes
Segura
Valdez
6. Datos del sinodal 4
M en C
Lilia Karina
Becerril
Berrocal
7. Datos del trabajo escrito.
Efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa soluble sobre la actividad de la metaloproteasa de matriz 2 en la línea celular A549.
58p
2014

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme los conocimientos que me servirán como base para desempeñarme como un buen Biólogo.

A mi mamá, a mi hermana, familia y amigos por apoyarme en todo momento de la carrera; en especial agradecer a mi mamá por todo el esfuerzo que ha realizado para darme la oportunidad de seguir estudiando.

A la Bióloga Rosalba Amaya Luna porque gracias a la dedicación a su trabajo y a la manera de transmitir su amor por la Biología con sus alumnos de la ENP 2 decidí estudiar la Licenciatura en Biología de la cual estoy muy orgulloso.

Al Dr José Guadalupe Cisneros Lira y a Alfredo Lozano por haberme enseñado las técnicas de cultivo y de biología molecular que me sirvieron de herramientas para la realización de este trabajo.

A mi tutora Dra Lourdes María Barrera Ramírez en primer lugar por darme las herramientas básicas para poder plantear por mí mismo un proyecto de investigación viable y en segundo lugar por haberme dado la confianza, la oportunidad y el apoyo económico para realizar el proyecto de investigación planteado.

A mis sinodales: Dra Annie Pardo, Dr José Cisneros, Dra Lourdes Segura y M en C Carina Becerril por sus valiosas correcciones a este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	12
1. Cáncer.....	12
1.1 Epidemiología del cáncer	12
2. Cáncer de pulmón.....	14
2.1 Clasificación del cáncer de pulmón de acuerdo a su localización anatómica ...	16
2.2 Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón	16
2.3 Estadificación y tratamiento	17
3. Familia de las guanilato ciclasas	18
3.1 Guanilato ciclasa particulada	19
3.2 Guanilato ciclasa soluble: estructura y activación	20
3.1 Descripción de la vía NO/sGC/cGMP.....	22
4. Matriz extracelular	23
4.1 Componentes de la matriz extracelular	24
5. Familia de las Metaloproteasas de Matriz	25
5.1 Clasificación	26
5.2 Estructura general.....	27
5.3 Regulación de las MMPs.....	29
6. Gelatinasas	30
6.1 Importancia en células tumorales.....	31
6.2 Papel de la vía NO/sGC/cGMP en la desregulación de gelatinasas.....	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos	37
MÉTODOS.....	38
1. Cultivo celular.....	38
2. Western Blot	38
3. Zimografía	39
4. Inhibición de la sGC.....	40
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

UICC	Unión Internacional contra el Cáncer
GTP	Guanosín trifosfato
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
MMP	Metaloproteasa de matriz
sGC	Guanilato ciclasa soluble
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización mundial de la salud
TC	Tomografía computarizada
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
MED	Mediastinoscopia
MEDTM	Mediastinotomía
MEDCE	Mediastinoscopia cervical extendida
CO	Monóxido de carbono
pGC	Guanilato ciclasa particulada
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
GMP	Guanosín monofosfato
PKG	Fosfodiesterasas dependientes de cGMP
AP-1	Proteína activadora 1
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
MEC	Matriz extracelular
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasa de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
EGF	Factor de crecimiento endotelial
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
EMMPRIN	Inductor de metaloproteasas de matriz extracelular
miRNA	micro Ácido ribonucleico
CREB	Elemento de unión en respuesta a cAMP
PEA3	Sitio activador de poliomavirus-A de unión a proteína -3
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
ATCC	American Type Culture Collection

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
NHLF	Fibroblastos Normales de Pulmón Humano
HRP	Peroxidasa ácida de rábano
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
DMSO	Dimetil sulfóxido
APMA	Acetato aminofenilmercurico
MT1-MMP	MMP transmembranal tipo 1
PI3K	Fosfatidilinositol trifosfato
AKT	Protein cinasa B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en el mundo para ambos sexos en 2012.....	14
Figura 2. Porcentaje de defunciones por tumores malignos en hombres y mujeres de México.	15
Figura 3. Dominios que conforman a la guanilato ciclasa particulada.	19
Figura 4. Dominios que conforman a la guanilato ciclasa soluble.	20
Figura 5. Vía de señalización mediada por la guanilato ciclasa soluble	21
Figura 6. Mecanismo de activación de las MMPs.....	28
Figura 7. Dominios estructurales de las metaloproteasas.	28
Figura 8. Papel de las MMPs en el proceso tumoral.	31
Figura 9. Expresión de las subunidades de la sGC en la línea celular A549.	41
Figura 10. Expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la sGC en la línea celular A549 cuando se expone a diversas concentraciones del inhibidor ODQ.	42
Figura 11. Expresión de la subunidad $\beta 1$ de la sGC en la línea celular A549 cuando se expone a diversas concentraciones del inhibidor ODQ.	43
Figura 12. A) Zimogramas que muestran la actividad de la pro-MMP-2 de medios condicionados de células A549 tratadas con ODQ. B) Efecto del ODQ sobre la actividad de la MMP-2	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las MMPs de acuerdo a la afinidad por su sustrato.....	26
--	----

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que representa la principal causa de mortalidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo desde el 2008 según datos de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC).

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más extendido en ambos sexos a nivel mundial. En México representa la segunda causa de muerte por cáncer y a pesar de los esfuerzos por detectarlo tempranamente se diagnostica con frecuencia en estadios avanzados, lo que hace difícil su tratamiento. A diferencia de otros tipos de cáncer, el de pulmón presenta un alto grado de invasión y metástasis en estadios avanzados.

Debido a esto, una de las prioridades en la investigación básica es la búsqueda de moléculas blanco que controlen el proceso de invasión y metástasis.

Las guanilato ciclasas forman una familia de enzimas que catalizan la conversión de guanosin trifosfato (GTP) a guanosin monofosfato cíclico (cGMP). Estas enzimas presentan dos tipos de isoformas, las ancladas a la membrana y las solubles. Las isoformas solubles junto con su ligando principal, el óxido nítrico, están involucrados en muchos procesos fisiológicos y patológicos como en el cáncer.

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), en especial las gelatinasas: MMP-2 y MMP-9 son proteasas que degradan componentes de la matriz extracelular como la colágena tipo IV y están implicadas en diferentes procesos tumorales como la invasión, metástasis y angiogénesis.

Este trabajo evalúa el efecto que tiene la inhibición de la guanilato ciclasa soluble (sGC) sobre la actividad de la MMP-2 liberada al medio extracelular en la línea celular tumoral de pulmón A549. Los resultados obtenidos muestran que la línea celular A549 presenta la mitad en expresión de las subunidades de la sGC respecto a los controles positivos usados. También se encontró que la inhibición de la sGC con el inhibidor ODQ a una concentración de 10 μ M aumenta significativamente la secreción de la pro-MMP-2 en células A549, mientras que a 40 μ M no se encontró cambio alguno sobre la pro-MMP-2.

Estos resultados sugieren que la sGC es responsable, al menos de manera parcial, de la secreción de la pro-MMP-2, ya que una inhibición en la actividad de la sGC induce un aumento en la cantidad de pro-MMP-2 secretada y en la actividad proteolítica de ésta isoforma.

Esta primera evidencia demuestra la importancia potencial del estudio de la vía óxido nítrico/sGC/cGMP en conjunto o alguno de sus componentes en concreto, los cuales pudieran representar un posible blanco terapéutico en cáncer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública mundial por el número de muertes que ocasiona y por los costos de la atención médica que demanda [1]. En el año 2008 se le atribuyeron 13% de las muertes mundiales [2], siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte por cáncer [3] [4].

Se estima que en México el 7.2% de los pacientes con cáncer tienen tumores malignos en los pulmones [5]. El cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte con el 14% de las muertes por tumores malignos, después del cáncer de próstata [6]. Estas frecuencias suelen cambiar, pero el cáncer de pulmón ocupa generalmente los primeros lugares tanto en defunciones como en nuevos casos.

El cáncer de pulmón se clasifica histopatológicamente en dos tipos: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico), éste último representa cerca del 80% de todos los casos de cáncer pulmonar [7].

Tan solo en México, el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas lo que hace que las estrategias terapéuticas sean poco efectivas.

El proceso neoplásico está caracterizado por una alteración tanto a nivel celular como a nivel molecular. Altera las señales de proliferación, induce un proceso de angiogénesis, hace a las células resistentes a la muerte celular programada, perpetúa su replicación, activa mecanismos de invasión y metástasis, genera microambientes hipóxicos, remodela el metabolismo energético y evade la destrucción inmune [8].

En la actualidad las investigaciones sobre el cáncer están dirigidas hacia la búsqueda de nuevas moléculas que regulen el proceso de metástasis y que permitan encontrar nuevos blancos terapéuticos.

Se han evaluado diversas cascadas de señalización para conocer el papel que tienen en el desarrollo tumoral y este trabajo tiene como objetivo evaluar la vía de señalización donde participa la guanilato ciclasa soluble sobre el proceso de metástasis. Se ha documentado que ésta vía de señalización tiene un papel dual en el desarrollo del cáncer [9] de acuerdo al tipo de cáncer y al proceso tumoral bajo el que se estudie la vía de señalización.

Existe evidencia importante de que en algunos tipos de cáncer ésta vía de señalización puede favorecer [10], [11], [12] ó impedir el desarrollo tumoral [13], [14].

Esta evidencia contradictoria hace necesario el estudio profundo de cómo las moléculas de la vía óxido nítrico/sGC/cGMP intervienen en el desarrollo tumoral lo cual ayudará a comprender la función que tienen en cada tipo de cáncer.

En este trabajo, estudiamos el papel de la sGC *in vitro* en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549 evaluando su influencia sobre la actividad de la metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2), enzima clave para el desarrollo de metástasis.

El proceso de metástasis es la diseminación física de células cancerosas del tumor primario a tejidos distantes [8] e implica diversos cambios tanto a nivel celular como molecular, siendo uno de éstos la degradación de la matriz extracelular.

La matriz extracelular es una red tridimensional compuesta de proteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos en donde están embebidas todas las células del organismo y en ellas se ejerce un profundo efecto en su desarrollo, migración, diferenciación, proliferación, etc [14].

En la matriz extracelular existe un equilibrio entre la síntesis y degradación de sus componentes, lo cual es regulado por las MMPs, sin embargo, en procesos patológicos como el cáncer, este equilibrio se rompe favoreciendo una mayor movilidad de las células que secretan estas proteasas.

Las MMPs forman una familia de proteasas dependientes de zinc y son las principales responsables de la degradación de la matriz extracelular. Se clasifican en diferentes subfamilias dependiendo de la estructura de sus dominios y en función de la afinidad del sustrato y éstas son: las colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrisilinas y las metaloproteasas tipo membrana [13].

El proceso tumoral es favorecido por algunas MMPs como la MMP-2 y MMP-9, mejor conocidas como gelatinasas, las cuales tienen gran afinidad por el colágeno tipo IV, componente principal de la membrana basal de los epitelios. Estas gelatinasas presentan estructuralmente tres dominios tipo II de fibronectina, lo que les confiere una alta afinidad de unión a gelatina y elastina [14].

La expresión de la MMP-9 es casi nula en tejidos normales y se secreta particularmente en procesos de reparación de heridas [15] por lo que su expresión no se considera constitutiva en condiciones normales. Sin embargo, en estadios avanzados de cáncer se encuentra sobreexpresada [16].

Por otro lado, la MMP-2 degrada principalmente colágeno tipo IV pero también es capaz de degradar colágenos fibrilares. Se expresa en condiciones normales por las células del estroma en la mayoría de los tejidos y se ha encontrado sobreexpresada en estadios tempranos del desarrollo tumoral [18].

La secreción elevada de ambas gelatinasas en diversos tipos de cáncer así como su alta expresión ha sido asociada con un pobre diagnóstico [19]. Esta evidencia revela la

importancia del estudio de éstas MMPs en la invasión tumoral y el control de su expresión o actividad pueden representar una posible alternativa terapéutica para el tratamiento contra el cáncer.

Una de las herramientas más empleadas en el estudio del adenocarcinoma pulmonar es el desarrollo de cultivos celulares de líneas tumorales como la A549. En este trabajo se evalúa el papel que tiene un miembro de la familia de las guanilato ciclasa perteneciente la vía NO/sGC/cGMP sobre la actividad de una proteasa clave en el proceso de metástasis, puesto que en los últimos años esta vía se ha relacionado con este proceso patológico [9].

ANTECEDENTES

1. Cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un grupo de enfermedades que afectan cualquier parte del organismo y tiene como característica principal la multiplicación rápida de células anormales que poseen el potencial de invadir distintas zonas del cuerpo, proceso conocido como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte en pacientes que presentan tumores malignos [2].

Se considera que el cáncer es la proliferación anormal de una sola célula que crece por miles, luego por millones y por billones, conformando una masa tumoral conocida como neoplasia, que tiene la capacidad de invadir tejidos vecinos. Esta capacidad de infiltrar poco a poco los tejidos y órganos vecinos, hasta diseminarse a sitios distantes del organismo puede ser el atributo biológico más relevante del cáncer, proceso denominado metástasis [20].

El cáncer también está caracterizado por detonar una desregulación celular y molecular y sus capacidades pueden resumirse bien en lo que hoy se conoce como “sellos” o “hallmarks” del cáncer [8]. Esta enfermedad puede lograr su desarrollo manteniendo la señalización proliferativa, la evasión de moléculas supresoras de crecimiento, la inducción de la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular, la replicación sin límite, la activación de invasión y metástasis, la generación de hipoxia, la remodelación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune.

Particularmente la metástasis ha sido de gran interés científico durante las últimas tres décadas. Pretendiendo alcanzar la comprensión funcional y el manejo terapéutico de las proteínas que participan en éste proceso para así contrarrestar el crecimiento y expansión del tumor primario a sitios anatómicos distantes.

1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es un problema de salud pública mundial por el número de muertes, por la alteración en el estilo de vida de los pacientes y por los costos de la atención médica que demanda [1]. El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo y se le atribuyen 7.6 millones de muertes en 2008 equivalente al 13% de todas las muertes ocurridas en ese año [2].

Los tipos de cáncer que causan más muertes cada año son el cáncer de mama con 458,000 muertes, de hígado con 695,000 muertes, de estómago con 736,000 muertes y en primer lugar el cáncer de pulmón con 1.37 millones de muertes anuales [21].

Los tumores malignos representan aproximadamente el 15% de las defunciones mundiales, correspondiendo a cerca de 8 millones de muertes por año, de las cuales más del 70% se registran en países en vías de desarrollo. La OMS prevé que entre 2007 y 2030 aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasara de 8 a más de 11 millones de defunciones por año [21].

En México mueren diariamente decenas de personas a causa del cáncer y muchas más reciben la noticia de que padecen esta enfermedad. Cada año se diagnostican en el país más de 100 mil nuevos casos, de los cuales aproximadamente dos tercios fallecen debido a una detección tardía o al fracaso del tratamiento.

Del total de defunciones en 2012, 13% se debieron a algún tumor y de éstas, 93.5% por neoplasias malignas. Así mismo, la principal causa de defunciones por tumores malignos es por el de órganos digestivos (33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil). Por sexo el comportamiento es diferente, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte, fallecen 15.38 de cada 100 mil [22].

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más extendidas en ambos sexos en países desarrollados y en vías de desarrollo (Figura 1). Para el sexo femenino también sobresalen el cáncer de mama y el cérvico-uterino. Mientras que en los hombres sobresale el cáncer de próstata y de colon. La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año [2].

En contexto con lo anterior, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que más muertes causa a nivel mundial debido a que presenta una mortalidad casi igual a su incidencia (Figura 1). De manera contradictoria éste tipo de cáncer se encuentra dentro del 30% de los cánceres más prevenibles [3].

En nuestro país el 60% de los casos de cáncer de pulmón están asociados al tabaquismo y el resto a inhalación de humo de leña y exposición a partículas orgánicas.

2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se define como el crecimiento incontrolado de células malignas en los pulmones y árbol traqueobronquial y su progresión produce disfunciones respiratorias. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento maligno deriva generalmente en invasión y metástasis hacia órganos como hueso, ganglios linfáticos e hígado, principalmente.

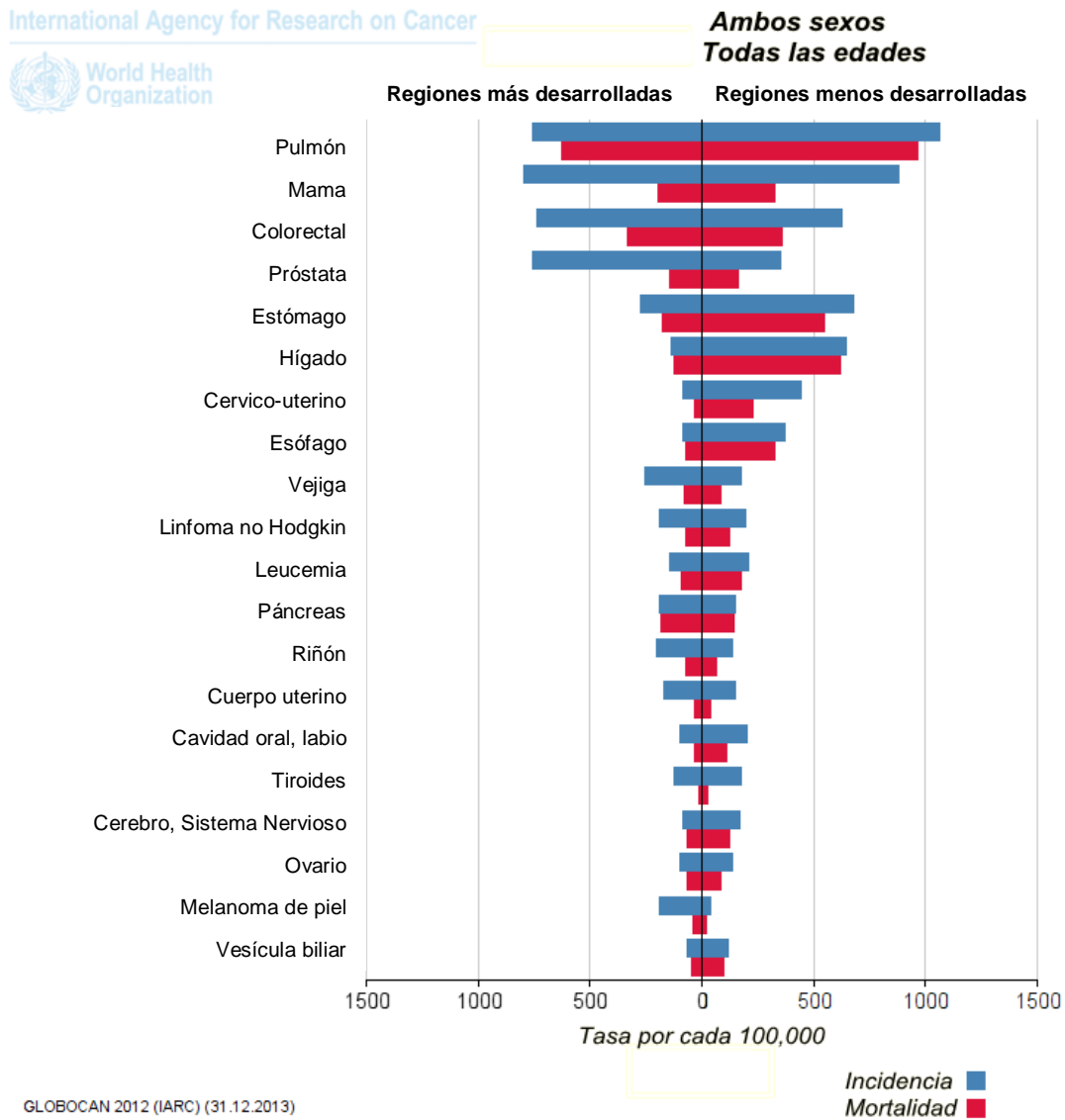


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en el mundo para ambos sexos en 2012. Modificado de *International Agency for Research on Cancer*. (Online analysis, www.globocan.iarc.fr)

El pulmón es un sitio anatómico común para la metástasis diseminada de tumores que comienzan en alguna otra parte del cuerpo. Los tumores más comunes que se propagan

a los pulmones son los provenientes del cáncer de vejiga, mama, colon, próstata, estómago, páncreas, riñón, hígado, melanoma y neuroblastomas [23]. Ambas situaciones se deben a que los pulmones reciben todo el flujo linfático y sanguíneo, conteniendo además la red capilar más densa de todo el organismo.

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en todo el mundo, equivalente al 23% de las muertes debidas al cáncer [24]. En cuanto a género, se estima que es el tipo de cáncer más común en hombres y el segundo más común en mujeres detrás del cáncer de mama.

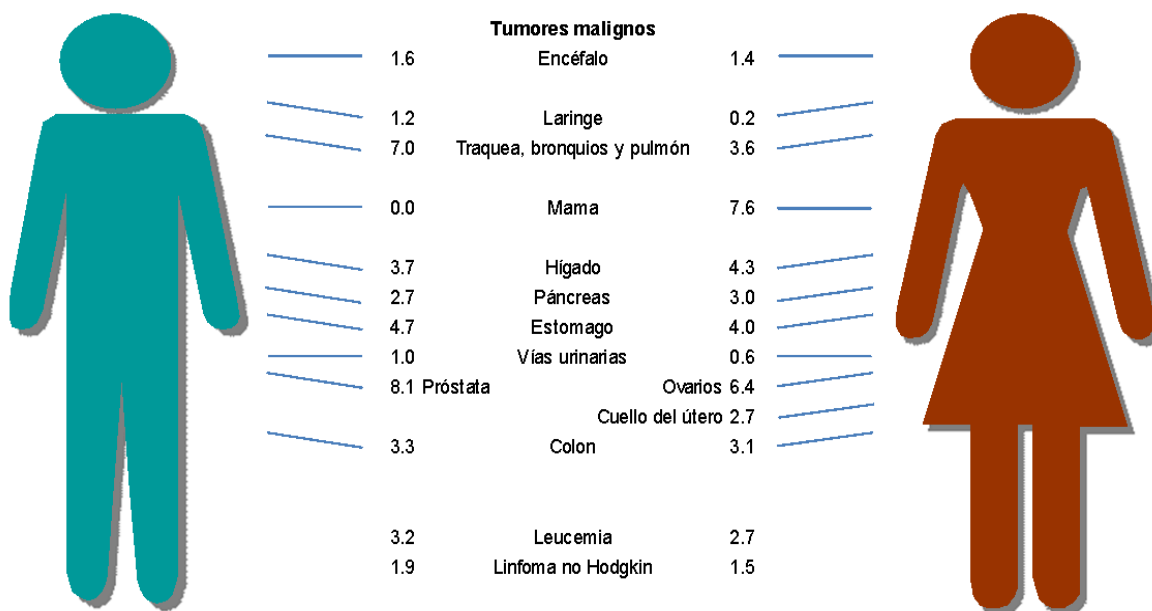


Figura 2. Porcentaje de defunciones por tumores malignos en hombres y mujeres de México. (Secretaría de Salud 2008).

De acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008 en México, el mayor porcentaje de lesiones malignas en los hombres fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%) y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4 por ciento), siendo el cáncer de pulmón, la tercera causa de defunciones (Figura 2).

La agresividad del cáncer de pulmón se debe, entre otros factores al desarrollo temprano de metástasis, especialmente en el carcinoma de células no pequeñas [25]. En este contexto se dice que el cáncer de pulmón es un grave problema de salud pública mundial.

2.1 Clasificación del cáncer de pulmón de acuerdo a su localización anatómica

Para el mejor diagnóstico y estudio del cáncer pulmonar se han generado principalmente dos sistemas de clasificación: de acuerdo a su localización anatómica y de acuerdo a su apariencia histopatológica.

Según su localización anatómica, el cáncer de pulmón puede dividirse en cáncer de pulmón central para aquellos tumores que aparecen a nivel de bronquios principales, lobares y segmentarios de la primera, segunda y tercera generación. Cerca del 75% de los casos en este tipo de cáncer incluye a los subtipos epidermoide y carcinoma indiferenciado de células pequeñas.

El cáncer de pulmón periférico, es aquel que aparece a partir de los bronquios de quinta generación, los cuales no son accesibles con el broncoscopio y principalmente se presentan en forma de adenocarcinoma. Este tipo de cáncer pulmonar rara vez llega a localizarse en áreas muy alejadas junto a la pleura.

2.2 Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón

La clasificación histopatológica es la más utilizada debido a que tiene implicaciones para el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad y divide al cáncer de pulmón en: cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico) [26].

El cáncer de pulmón de células pequeñas tiende a aparecer en vías aéreas de mayor calibre como en los bronquios primarios y secundarios, llegando a formar rápidamente un tumor de gran tamaño. Estos tumores malignos están constituidos por células pequeñas, con escaso citoplasma, cromatina finamente granular y con nucléolo pequeño o poco aparente. Tan sólo el 5% de este tipo de cáncer pulmonar es de carácter periférico [27].

El carcinoma microcítico puede presentarse como células con forma de hojuelas de avena que contienen gránulos neurosecretorios densos, es decir, vesículas con hormonas neuroendocrinas y que se asocian con un síndrome endocrino o paraneoplásico [28]. Este tipo de carcinoma se disemina más rápido respecto al siguiente tipo, pues al ser diagnosticado se encuentra diseminado en el 90% del árbol traqueobronquial y pulmones. Los carcinomas pulmonares de células no pequeñas son mucho más frecuentes, se agrupan en base a pronóstico y tratamiento similares y más del 80% de los cánceres de pulmón pertenecen este tipo histológico. Existen tres subtipos principales: el carcinoma de

células grandes (15% de los casos de forma global), carcinoma de células escamosas (25% de los casos de forma global) y el adenocarcinoma con el 38% de los casos de forma global.

El adenocarcinoma es el tipo de cáncer de pulmón más agresivo debido a que se disemina en todo el pulmón de manera gradual. Este tipo de cáncer de pulmón tiene una mayor incidencia en la población mundial con respecto a los demás tipos de cáncer [29], por lo que en el ámbito de la investigación básica han enfocado su atención en este tipo histológico.

2.3 Estadificación y tratamiento

El término estadificación se refiere el proceso de uso médico para determinar la extensión de una enfermedad en el organismo. El objetivo de la estadificación en cáncer es determinar el tipo y grado de avance de la enfermedad así como el grado de diseminación. La clasificación anatómica TNM-estadios permite una descripción estandarizada de los tumores pulmonares, una comparación de resultados entre distintos estudios clínicos y la ubicación de los pacientes en estadios clínicos específicos.

Este sistema determina el tamaño del tumor primario (componente T), la afectación de ganglios linfáticos (componente N) y la presencia de metástasis a distancia (componente M) [28].

Dentro de los procedimientos de estadificación no invasivos están, los síntomas y signos clínicos, la radiografía de tórax, la anamnesis y la exploración física que detalladas pueden aportar datos de gran valor sobre el grado de extensión de la enfermedad. Estos procedimientos permiten una simplificación sustancial de las pruebas a realizar posteriormente. Igualmente los síntomas neurológicos o el dolor óseo intenso y persistente deben hacer sospechar la existencia de metástasis a distancia, teniendo así, implicaciones pronósticas y terapéuticas relevantes.

La radiografía de tórax es habitualmente la primera prueba que permite sospechar con alta probabilidad la existencia de cáncer pulmonar. Esta prueba puede detectar derrame pleural y la destrucción de vértebras o costillas, lo que permite aproximar el grado de extensión de la enfermedad [29].

La tomografía computarizada (TC) de tórax después de la radiografía, suele ser la prueba de imagen que proporciona la información necesaria en el proceso de diagnóstico. En relación con el tumor primario, la TC sigue siendo el mejor método para el estudio anatómico global del tórax ya que permite obtener una información detallada sobre el

tamaño, la localización, las relaciones anatómicas con estructuras vecinas y puede detectar nódulos de tamaño muy pequeño, habitualmente no detectables mediante radiografía de tórax.

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET, por sus siglas en inglés) en su modalidad diagnóstica, se basa en la identificación de una mayor actividad metabólica, característica de las células neoplásicas, la cual aporta información relevante sobre la biología del tumor, pero su capacidad de resolución espacial es menor que la de la TC. El desarrollo de la PET/TC, que integra en una única exploración las imágenes de ambos procedimientos, mejora la eficacia diagnóstica [30].

Finalmente los procedimientos de diagnóstico mediante técnicas quirúrgicas incluyen la mediastinoscopia (MED), la mediastinotomía (MEDTM), la mediastinoscopia cervical extendida (MEDCE) y videotoracoscopia.

De manera general como tratamiento, los pacientes con cáncer de pulmón pueden recibir cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida o una combinación de tratamientos. La terapia contra el cáncer puede ser local, es decir, cirugía y/o radioterapia, en donde extirpan o destruyen el cáncer en el pecho. Cuando el cáncer de pulmón se ha diseminado a otras partes del cuerpo, la terapia local puede usarse para controlar la enfermedad en áreas específicas y debe acompañarse de terapia sistémica en donde se utiliza la quimioterapia y terapia dirigida.

La quimioterapia representa la medicación con fármacos potentes que circulan por todo el cuerpo para atacar a las células cancerosas. Estos fármacos pueden destruir cualquier célula de crecimiento rápido, entre ellas las células cancerígenas y algunas células sanas. Los agentes quimioterapéuticos se controlan minuciosamente tanto en las dosis como en la frecuencia, de modo que se destruyan las células tumorales con un mínimo de riesgo para las células sanas [29].

Es importante mencionar que los tratamientos sistémicos para todos los tipos de cáncer pulmonar a menudo causan daño a células y tejidos sanos. Los efectos secundarios dependen principalmente del tipo y extensión del tratamiento y pueden no ser los mismos para cada paciente y pueden cambiar durante el tratamiento que satisfaga las necesidades médicas y personales.

3. Familia de las guanilato ciclasas

Como se describió anteriormente, el cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más agresivos y letales. La búsqueda de nuevas moléculas en investigación básica que

controlen el progreso tumoral en cualquiera de sus procesos, manifiesta su futura implicación clínica pues pudieran ser empleadas como una posible alternativa terapéutica contra el cáncer.

Es sabido desde 1969, que las guanilato ciclasas existen tanto en la fracción soluble (en citoplasma) como en la fracción membranal (ancladas a la membrana celular) en la mayoría de los tejidos [31] desempeñando distintas funciones fisiológicas.

Las guanilato ciclasas conforman una familia de enzimas que se encargan de la síntesis de cGMP a GTP a partir de su unión con ligandos como el óxido nítrico, el monóxido de carbono (CO) o péptidos, los cuales causan un cambio conformacional que activa el dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal de la enzima [32].

3.1 Guanilato ciclasa particulada

Las guanilato ciclasas particuladas están asociadas a la membrana plasmática y reconocen diferentes péptidos natriuréticos, por lo que estas enzimas tienen importante participación en la regulación de funciones renales, humorales y cardiovasculares [33]. En la actualidad se han identificado 7 isoformas que se encuentran distribuidas en distintos órganos como cerebro, pulmón, hígado, intestino y músculo esquelético.

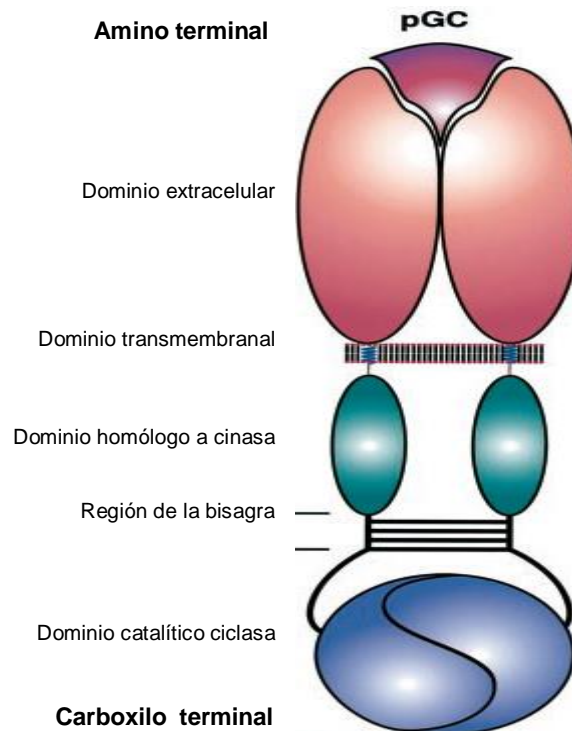


Figura 3. Dominios que conforman a la guanilato ciclasa particulada. Modificado de Lucas *et al.*, 2001 *Pharmacological Reviews*.

La guanilato ciclasa particulada (pGC) es un homodímero que presenta un dominio amino terminal extracelular que actúa como receptor, una región corta transmembranal que se ha propuesto como región reguladora y una región carboxilo terminal intracelular que tiene actividad ciclasa que genera cGMP a partir de GTP [34] (Figura 3).

Entre los ligandos más comunes para la pGC se encuentran los péptidos natriuréticos, la guanilina, enterotoxinas bacterianas y el péptido natriurético tipo C; existen isoformas de la pGC a las cuales no se les conoce su ligando por lo que se consideran receptores huérfanos. La unión de los ligandos a las diferentes isoformas culmina en distintas respuestas fisiológicas como vasorelajación, inhibición de la proliferación de las células musculares lisas o inhibición del crecimiento óseo, por mencionar algunas [32].

3.2 Guanilato ciclasa soluble: estructura y activación

La sGC es expresada en la mayoría de las células de mamífero y participa en diferentes procesos fisiológicos como la inhibición de la agregación plaquetaria, relajación de músculo liso, vasodilatación, señalización neuronal e inmunomodulación [35].

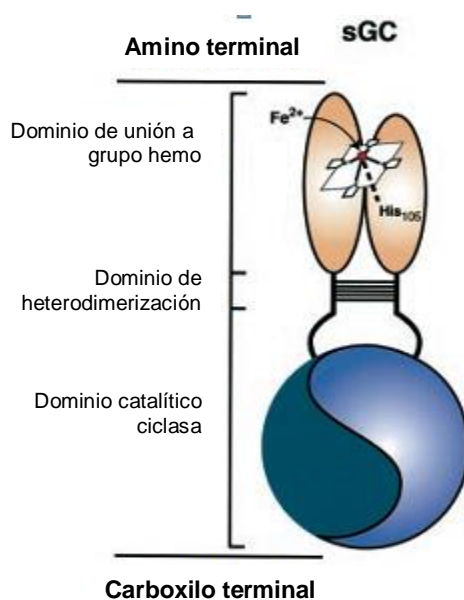


Figura 4. Dominios que conforman a la guanilato ciclasa soluble. Modificado de Lucas *et al.*, 2001 *Pharmacological Reviews*.

La sGC se encuentra en el citoplasma celular y es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad grande ó subunidad α (82 kDa) y la subunidad pequeña ó subunidad β (70kDa) [36], cada una con un dominio catalítico que contiene ferroprotoporfirina como grupo prostético.

Hasta la fecha sólo dos isoformas diferentes de las subunidades α y β han sido clonadas y caracterizadas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$) y cada una de ellas es codificada por genes diferentes. Las isoformas $\alpha 2$ (82kDa) y $\beta 2$ (76kDa) sólo se han identificado en cerebro fetal humano y en riñón de rata, respectivamente [37]. En los últimos años se ha aislado una nueva isoforma de la subunidad β ($\beta 3$) a partir del sistema nervioso de invertebrados, sin embargo no se ha reportado heterodimerización para poder presentar actividad catalítica [34].

Las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ son las más abundantes y más extendidas en cuanto a distribución en tejidos se refiere, siendo necesaria la expresión de ambas para que la sGC tenga actividad catalítica. Las dos subunidades de la sGC están formadas por 3 dominios en común: un dominio catalítico ciclasa en el extremo carboxilo terminal, un dominio central relacionado con la dimerización de las subunidades y un dominio amino terminal que constituye el dominio de unión al grupo hemo, el cual confiere a la enzima su alta sensibilidad por el NO, su ligando principal [31] (Figura 4).

La sGC puede ser activada básicamente por 2 moléculas, por el CO y por el NO siendo éste último, el ligando más común y más estudiado.

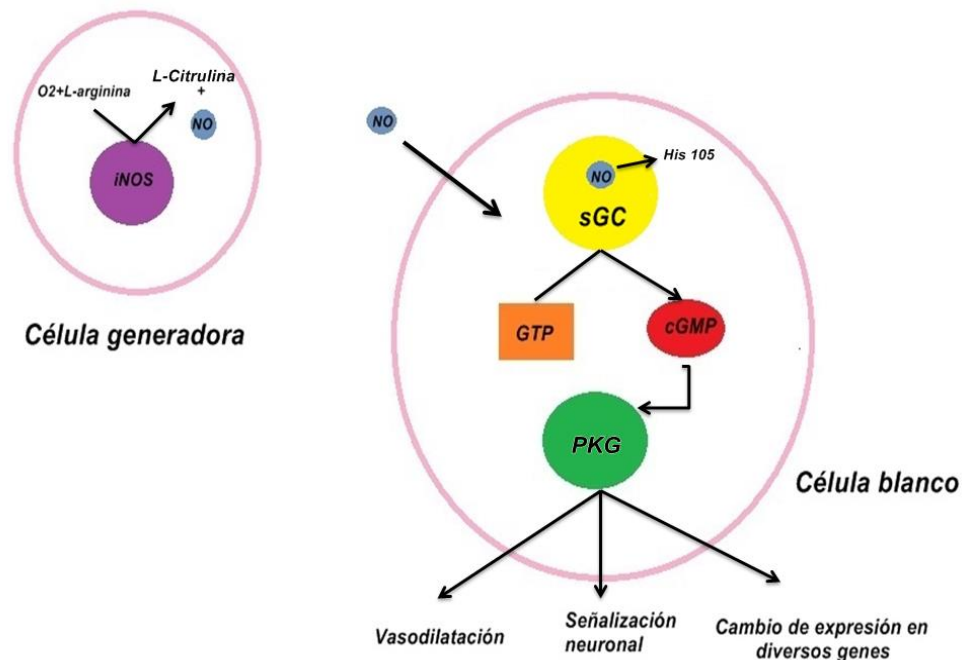


Figura 5. Vía de señalización mediada por la guanilato ciclasa soluble

Cuando el NO difunde al citoplasma, se une al ion ferroso del grupo hemo de la enzima, lo que ocasiona un cambio conformacional en la histidina 105 lo que activa a la sGC para que a partir de GTP genere GMPc, molécula que funciona como segundo mensajero de la vía de señalización (Figura 5).

El NO es una molécula pequeña considerada como radical libre; es sintetizado por las óxido nítrico sintasas y es generado en grandes cantidades por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células tumorales. Es sintetizado a partir de oxígeno molecular y L-arginina y como productos de la reacción se generan L-citrulina y NO, el principal ligando de la sGC (Figura 5).

El NO tiene distintas funciones dependiendo del lugar dónde se genere, si es a nivel vascular es un potente modulador del tono vascular, si es producido en el endotelio tiene un efecto final de relajación y si se genera masivamente en células mesenquimales por la iNOS suele tener un efecto citotóxico por la gran estimulación de la actividad de la sGC [36]. Con base en lo anterior el NO se considera que tiene efectos dicotómicos sobre la proliferación celular, apoptosis, migración, invasión y angiogénesis dependiendo de la concentración y del microambiente tumoral en el que se genere [38].

3.1 Descripción de la vía NO/sGC/cGMP

Como se mencionó previamente, la sGC forma parte de la vía conocida como NO/sGC/cGMP que media diversas respuestas fisiológicas; esta vía funciona por la activación de la sGC provocada por el NO que por ser un gas de difusión libre puede provenir de células vecinas y atravesar la membrana para ejercer acción sobre la sGC de la célula blanco, o bien generarse dentro de la célula por la iNOS. Una vez generado el NO éste se une al grupo hemo de la sGC lo que provoca un cambio conformacional en un residuo clave en la actividad de la sGC: el residuo de histidina 105, lo que activa a la sGC totalmente para que genere cGMP a partir de GTP lo que culmina en un aumento de cGMP intracelular, el cual se desempeña como segundo mensajero de la vía [39] (Figura 5).

La sGC interviene en varios procesos fisiológicos y por ende no es de extrañar que existan diferentes mecanismos que regulen su síntesis y actividad tanto en estados fisiológicos como patológicos. La regulación de la actividad de sGC puede realizarse a diferentes niveles: modificando la cantidad de sGC expresada, variando las isoformas de sGC que se expresan y regulando directamente la actividad de la sGC [36].

Sin embargo también la actividad de la vía se puede regular a nivel de cGMP por las enzimas fosfodiesterasas que linealizan el cGMP formando guanosin monofosfato (GMP) de esta manera se bloquea la activación de los diferentes factores de transcripción mediada por el cGMP. Hasta la fecha se han descrito 3 grandes dianas moleculares del cGMP: proteínas cinasas, canales iónicos y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos [34]. Las proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKG's) son el principal mediador intracelular de la vía de señalización del cGMP; estas PKG's activan diversos factores transcripcionales debido a que los fosforilan en residuos de serina y treonina lo que desencadena los diversos procesos fisiológicos que media la vía como la relajación muscular, la inhibición de la agregación plaquetaria o producir el cambio de expresión de diversos genes.

Entre los diversos genes que cambian su expresión debido a ésta vía están documentados los factores de transcripción, proteína activadora 1 (AP-1) [40] y el factor nuclear kappa B (NF-kB) [41] los cuales son capaces de estimular la transcripción de genes de algunas metaloproteasas de matriz extracelular así de como la de algunos de sus inhibidores endógenos como TIMP-2 [42], lo que sugiere que la vía pudiera tener un papel en la regulación de éstos genes y por ende un papel en la invasión y metástasis de células tumorales.

Las MMPs son una familia de proteasas que se encuentran implicadas principalmente en regular la integridad y composición de la matriz extracelular (MEC), mediante el procesamiento o degradación de numerosos componentes de la misma.

4. Matriz extracelular

La matriz extracelular es una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo y es el material que se encuentra entre los límites epitelial y endotelial en los organismos multicelulares.

Anteriormente se pensaba que la matriz extracelular funcionaba como un soporte inerte, pero actualmente se sabe que la matriz extracelular también desempeña un papel de activación y regulación de procesos básicos de las células que se encuentran en contacto con esta [15].

La matriz extracelular desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, da la forma de sus cuerpos y de sus órganos. La matriz extracelular desempeña un papel activo y complejo en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella, ejerciendo un

efecto profundo en su desarrollo, migración, proliferación, diferenciación, forma y funciones metabólicas [43].

4.1 Componentes de la matriz extracelular

La MEC está compuesta básicamente por 3 grandes grupos de moléculas: proteoglicanos, glucosaminoglicanos y proteínas fibrosas. Además existen moléculas de adhesión como las integrinas (Figura 6).

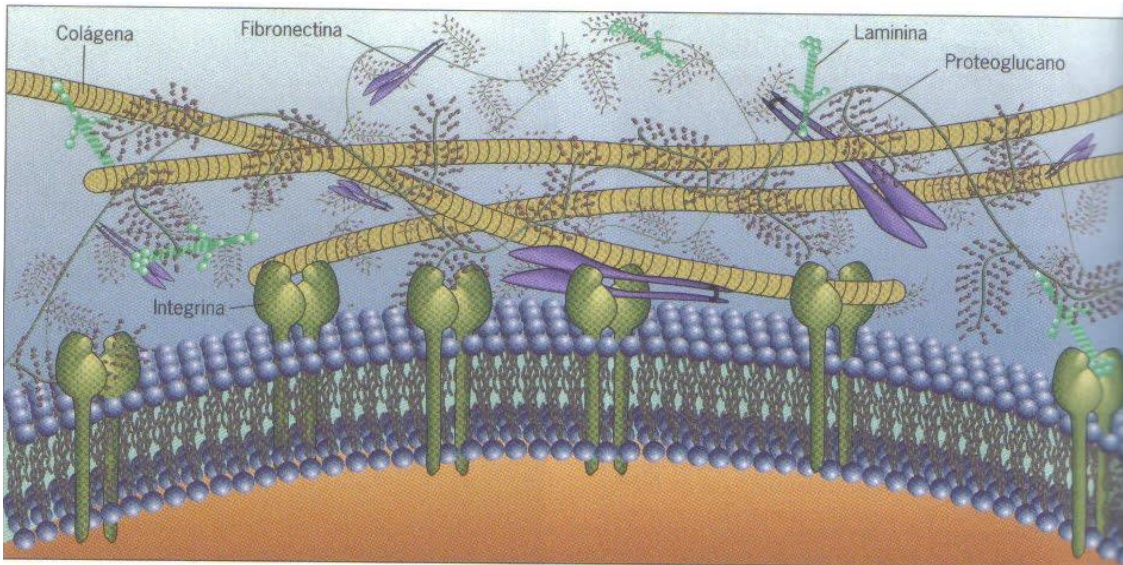


Figura 6. Arreglo de los componentes de la matriz extracelular. Modificado de Gilbert. S, 2003. Biología del Desarrollo. 7a ed. Editorial Médica Panamericana.

Los proteoglicanos son proteínas glicosiladas unidas covalentemente a proteínas de la matriz extracelular. Presentan una alta densidad de cargas negativas que atraen cationes como el sodio, que son activos osmóticamente y provocan que una gran cantidad de líquido pase a la matriz y así formar geles hidratados que ocupan un gran espacio, resisten fuerzas compresivas y permiten la rápida difusión de nutrientes. Ejemplos de estas moléculas son el betaglicano, heparina, agregano y el sindecano

Los glucosaminoglicanos son polisacáridos largos sin ramificaciones y contienen repeticiones de una unidad de disacáridos; ejemplos de estas moléculas son el dermatán sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato y el ácido hialurónico.

Dentro de las proteínas que se asocian a la MEC se encuentran las colágenas, fibronectina, laminina y elastina. Estas pueden dar estructura a la matriz extracelular, además de conectar la MEC con las células y regular su migración, proliferación, diferenciación, e incluso muerte celular. [44].

Las colágenas son la familia de proteínas más abundantes de los animales. Las colágenas fibrilares son secretadas por las células del tejido conectivo, como los fibroblastos (músculo liso en los vasos). Estas moléculas forman cadenas largas y gruesas en una estructura de polipéptidos en forma de triple hélice conocidos como cadena α .

Las colágenas pueden clasificarse en:

- a) Colágenas que forman fibras: I, II, III, V y XI.
- b) Colágenas asociados a fibras que se unen a los anteriores entre sí y a otros componentes de la ECM. Son los tipos IX y XII.
- c) Colágena que forma redes, es el tipo IV y es uno de los principales componentes de las membranas basales de los epitelios.
- d) Colágena de anclaje (tipo VII).

Las fibronectinas son proteínas adhesivas extracelulares que ayudan a las células a fijarse en la matriz.

La laminina cumple un papel de filtro, determina la polaridad de la célula, influye en el metabolismo celular, organiza las proteínas de las membranas plasmáticas adyacentes, induce la diferenciación celular y sirve como sendero para su migración.

La elastina da las características de flexibilidad y elasticidad a la MEC, por lo que es de suma importancia en vasos sanguíneos, pulmones, piel y ligamentos.

Las integrinas son proteínas que forman parte de las moléculas de adhesión; estas se agrupan en los sitios de contacto de las células con la matriz y pueden activar muchas vías de señalización intracelular [15]. Estos elementos de la MEC son secretados localmente y ensamblados dentro de una red organizada en estrecho contacto con las células que la producen, como se observa en la Figura 6.

En la matriz extracelular, tiene que existir un equilibrio entre la síntesis y degradación de sus componentes, el cual es llevado a cabo por las MMPs [15] por lo cual su expresión así como su actividad deben estar finamente reguladas sin embargo, en procesos patológicos este control se rompe lo que favorece la progresión de enfermedades como el cáncer.

5. Familia de las Metaloproteasas de Matriz

Con la caracterización de la colagenasa de la cola de renacuajo primera colagenasa de vertebrados, dio comienzo el estudio de esta familia de enzimas llamadas MMPs y el papel que pueden desarrollar en diversas patologías humanas, entre otros, en los procesos tumorales [45].

Las MMPs pertenecen a la superfamilia de las metzincinas que se caracterizan por tener altamente conservado un motivo de 3 histidinas **HEXXHXXGXXH** que coordinan un átomo de zinc dentro del dominio catalítico y una metionina conservada cercana al sitio catalítico [46]. Las MMPs son proteasas que degradan componentes de la matriz extracelular o modifican proteolíticamente citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión. Dependen del zinc (Zn) para su actividad catalítica. Se secretan como zimógenos (excepto las MMPs membranales) debido a la interacción que prevalece del Zn con un residuo de cisteína impidiendo de esta manera el reconocimiento de su sustrato [16] y son cruciales en la invasión, migración, metástasis y tumorigénesis.

5.1 Clasificación

En humano se han caracterizado hasta el momento 28 miembros de estas proteasas y se clasifican de acuerdo a la estructura de dominios y en función de la afinidad del sustrato que degradan teniendo así a las colagenasas (MMP-1,-8,-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) que degradan colágena tipo IV, estromelinas (MMP-3, -10, -11, -12) que degradan fibronectina y proteoglicanos, matrilisinas (MMP-7, -26) y de tipo membrana (MT-MMP) que participan en la activación de los zimógenos de otras MMPs [47] (Tabla 1). Por tal razón, la participación de las MMPs en la remodelación de la ECM representa una responsabilidad no sólo de la degradación, sino de participar en el procesamiento de diversos mediadores bioactivos que incluyen a factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas y receptores en superficies celulares modulando su actividad.

Tabla 1. **Clasificación de las MMPs de acuerdo a la afinidad por su sustrato. Modificado de Egeblad & Werb, *Nature Reviews* 2002.**

SUBFAMILIA	MMP	NOMBRE	SUSTRATO
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa de fibroblastos	Colágena I, II, III, VII, VIII y X, proteoglicanos, MMP-2, MMP-9
	MMP-8	Colagenasa de polimorfo nucleares	Colágena I, II, III, V, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos
	MMP-13	Colagenasa 3	Colágena I, II, III y IV, gelatina, proteoglicanos, PAI-2 (inhibidor del activador del plasminógeno)
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A	Gelatina, colágena I, IV, V, VII, X, XI y XIV, elastina
	MMP-9	Gelatinasa B	Gelatina, colágena IV, V, VII y X, elastina

Matrisilinas	MMP-7	Matrisilina 1	Colágena IV y X, gelatina, fibronectina, laminina
	MMP-26	Matrisilina 2	Colágena IV , fibronectina, fibrinógeno, gelatina
Estromelisininas	MMP-3	Estromelisina 1	Colágena III, IV, IX, X gelatina, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9
	MMP-10	Estromelisina 2	Colágena III, IV y V, gelatina, caseína, MMP-1, MMP-8
	MMP-11	Estromelisina 3	Desconocido
MT-MMPs (de membrana)	MMP-14	MT1-MMP	Colágena I, II, III, gelatina, MMP-2 y MMP-13
	MMP-15	MT2-MMP	MMP-2, gelatina
	MMP-16	MT3-MMP	MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	Desconocido
	MMP-24	MT5-MMP	
	MMP-25	MT6-MMP	
Otras	MMP-12		
	MMP-19		
	MMP-20		
	MMP-23		
	MMP-27		
	MMP-28		

5.2 Estructura general

La mayoría de las MMPs presentan una estructura común que se compone básicamente de cuatro dominios conservados: un péptido señal o predominio, situado en el extremo amino-terminal que se elimina en el retículo endoplasmático, el cual se encarga de determinar si la proteína va a ser secretada o anclada a la membrana.

Un propéptido o prodominio, de unos 80-90 aminoácidos que contienen una cisteína conservada que mantiene la enzima en estado latente. El grupo tiol de este residuo de cisteína forma un enlace coordinado con el átomo de zinc que ese encuentra en el dominio catalítico manteniendo de esta forma la latencia de la enzima. La activación de cualquier pro-MMP requiere el rompimiento de este enlace cisteína- Zn²⁺, a este mecanismo se le conoce coloquialmente como switch de cisteína (Figura 6).

El domino catalítico, de unos 160-170 aminoácidos contiene el sitio activo altamente conservado donde se encuentran las tres histidinas que se unen al zinc catalítico [48]. En esta región se determina la especificidad hacia los diferentes sustratos, mediante conformaciones específicas y regiones localizadas fuera del sitio activo.

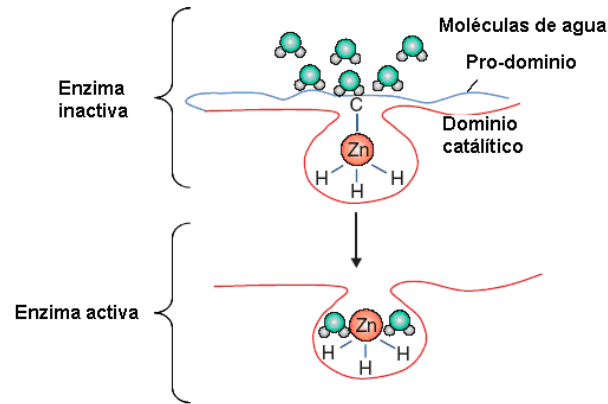


Figura 6. Mecanismo de activación de las MMPs. (Somerville R. *et al*, 2003).

Por último, todas las MMPs, excepto MMP-7, MMP-26 y MMP-23, presentan un dominio tipo hemopexina de aproximadamente 200 residuos que se conecta con el dominio catalítico a través de una región rica en prolinas (Figura 7) [49]. El dominio hemopexina regula la unión de la proteasa a distintos sustratos y a sus inhibidores endógenos; además este dominio interviene en la unión y activación de las MMPs en la membrana celular y dirige ciertas actividades proteolíticas [17].

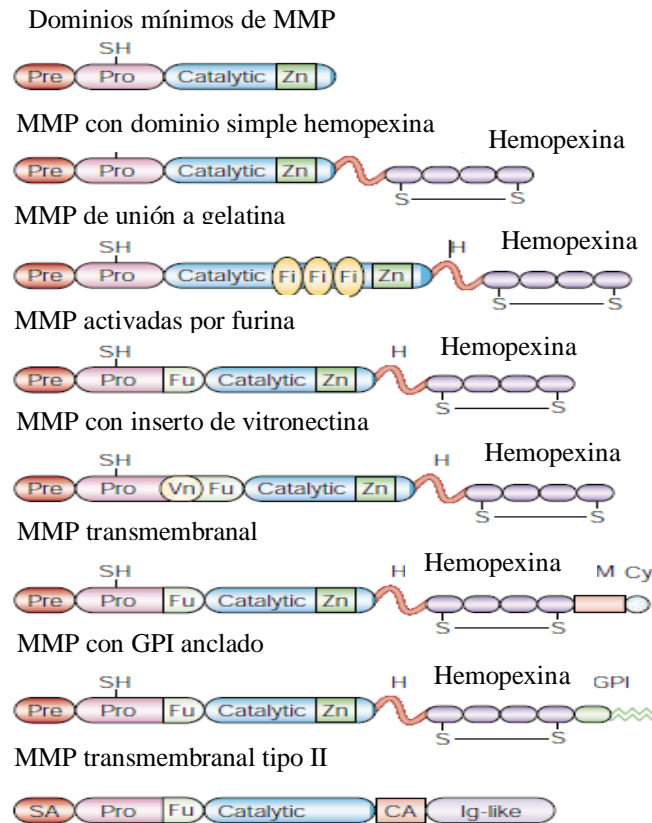


Figura 7. Dominios estructurales de las metaloproteasas. Modificado de Egeblad & Werb *Nature Reviews*, 2002.

Determinadas subfamilias de MMPs poseen otros dominios adicionales específicos. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 se diferencian del resto de MMPs al poseer tres dominios fibronectina (FN) tipo II dentro del extremo amino-terminal, que son necesarios para la unión y escisión de colágeno tipo IV y elastina [50] (Figura 7).

Las MT-MMPs (MMP-14, -15, -16 y -24) tienen un dominio transmembrana seguido de una corta cola citoplásmica de 20 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal [51]. Adicionalmente, MMP-17 y MMP-25 poseen una región hidrofóbica que actúa como señal de anclaje a MMPs de membrana de tipo glicofosfatidilinositol [52].

5.3 Regulación de las MMPs

Debido a las múltiples funciones fisiológicas en las cuales las MMPs actúan como interruptor dual activando o inactivando su función, es necesario que estas enzimas estén estrictamente reguladas a múltiples niveles moleculares, de forma que únicamente se expresen y sean activas en el tipo celular, momento y lugares adecuados [47]. En este sentido se han seguido hasta el momento varias estrategias encaminadas a bloquear la actividad proteolítica de estas enzimas basadas en los principales niveles de regulación que a continuación se mencionan.

Existen 5 niveles a los cuales las MMPs pueden ser reguladas: a nivel transcripcional, mediada por diversas citosinas o factores transcripción y crecimiento que inhiben o activan su transcripción, a excepción de la MMP-2, cuya expresión es constitutiva y se encuentra regulada principalmente por activación enzimática y por estabilidad de su ácido RNAm sin embargo está también regulada a nivel transcripcional por los factores AP-1, AP-2, NF- κ B, CREB y PEA3.

La expresión génica de las MMPs se encuentra regulada también por la señalización a través de integrinas y receptores celulares, estrés oxidativo, activación con ésteres de forbol y cambios en la fisonomía celular. Asimismo, varios factores solubles regulan también la transcripción génica de MMPs, como es el caso de citocinas y factores de crecimiento (EGF, VEGF, TNF- α , TGF- β), hormonas y el inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN) [51].

Otro mecanismo de regulación génica de las MMPs es la post-traducciona por medio de la estabilización o desestabilización del RNAm. Ciertos factores de crecimiento son capaces de estabilizar el ARN mensajero de algunas MMPs como el EGF que afecta la estabilidad de los mensajeros de MMP-1 y MMP-13 [16].

Como se ha mencionado, todas las MMPs son sintetizadas como zimógenos y para su activación enzimática es necesaria la ruptura del enlace cisteína-zinc mediante un cambio conformacional de la proteína (inducido por compuestos derivados del mercurio, urea, detergentes o especies reactivas de oxígeno) o la proteólisis del propéptido por plasmina u otras MMPs, lo cual describe el siguiente mecanismo de regulación de las MMPs.

La actividad de las MMPs también está regulada por una serie de inhibidores endógenos naturales que en conjunto forman a la familia de inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) [52].

Sus 4 miembros (TIMP-1 a -4) son proteínas de 21-30 kDa capaces de inactivar las MMPs a través de su unión directa y reversible al dominio catalítico de las MMPs [53].

TIMP-1 y TIMP-2 son capaces de inhibir un amplio espectro de MMPs, aunque con diferente efectividad dependiendo del tipo de proteasa que se trate, mientras que la especificidad de TIMP-3 y TIMP-4 es más restringida [53]. Recientemente, se han propuesto nuevas funciones para los TIMPs además de la inhibición de MMPs y que implicarían señalización intracelular [54].

Dada la selectividad y efectividad de los TIMPs para bloquear la actividad catalítica de las MMPs, se han utilizado como inhibidores de la migración tumoral sin embargo, los resultados obtenidos en el ámbito clínico con estos inhibidores no han tenido la eficacia esperada [55].

Un último y novedoso nivel de regulación de la expresión de las MMP es por mecanismos epigenéticos pues puede ocurrir desde a nivel de metilación de DNA hasta la participación de miRNAs. Por ejemplo se ha documentado que en cáncer de mama, tanto una hipermetilación de islas CpG en promotores de MMPs y modificaciones de histonas como la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 silencian el gen de MMP-2 [56].

Por otro lado se ha reportado que la expresión del gen de MMP-9 está regulado por un miRNA lo que sugiere una amplia modulación epigenética en la expresión de estas enzimas [57].

6. Gelatinasas

Esta subfamilia está formada por la MMP-2 o gelatinasa A con un peso molecular de 72kDa y por la MMP-9 o gelatinasa B con un peso molecular de 92kDa y se ha documentado que la sobre-expresión de una o ambas proteasas en células tumorales confieren un fenotipo invasivo.

Como se mencionó, las gelatinasas presentan estructuralmente un dominio tipo II de fibronectina dentro de su dominio catalítico, lo que resulta en una alta afinidad de unión a gelatina, colágeno tipo IV y elastina.

La MMP-2 se expresa constitutivamente en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, condrocitos y monocitos, mientras que la MMP-9 es expresada por macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares y osteoclastos [19].

La MMP-2 se secreta como zimógeno el cual es sometido a extensas glicosilaciones. La activación de la pro-MMP-2 es un proceso complejo pero de manera breve la pro-MMP-2 forma un complejo con TIMP-2 a través de su dominio C-terminal permitiendo así que el dominio inhibitorio N-terminal de TIMP-2 se una a MT1-MMP sobre la superficie celular. La pro-MMP-2 unida a la superficie celular es activada por la MT1-MMP libre de TIMP-2. Alternativamente, la MT1-MMP inhibida por TIMP-2 puede actuar como un receptor de la pro-MMP-2. El complejo MT1-MMP/TIMP-2/pro-MMP-2 se presenta a una MT1-MMP libre para su activación. El agrupamiento de MT1-MMP sobre la superficie celular a través del dominio hemopexina facilita este proceso de activación [58].

6.1 Importancia en células tumorales.

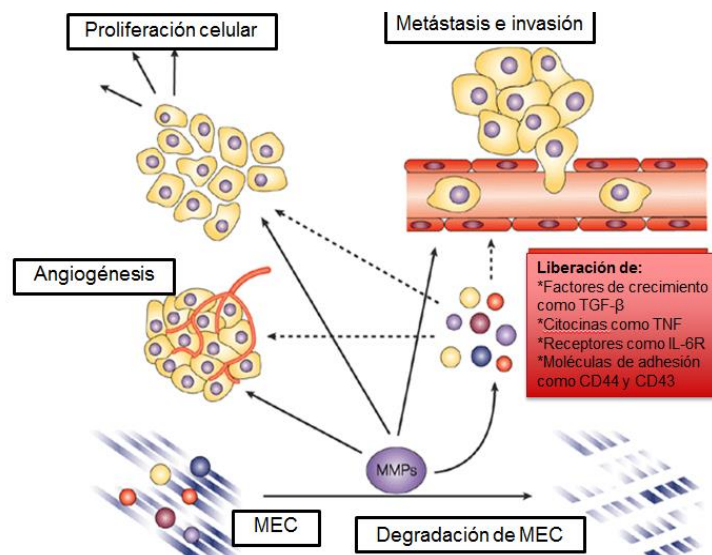


Figura 8. Papel de las MMPs en el proceso tumoral. Modificado de Rao, *Nature Reviews Cancer*, 2003.

Debido a su capacidad de degradar múltiples sustratos, las MMPs desempeñan un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos (morfogénesis tisular, invasión y migración celular, reparación de heridas, vasculogénesis o desarrollo del hueso) y

patológicos (cáncer, enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares, fibróticas y cerebrovasculares) [59]. En especial las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 desempeñan un papel fundamental en el cáncer [16].

Otra función celular fundamental de las MMPs es regular la angiogénesis. Las MMPs favorecen la migración celular y la formación de vasos sanguíneos, mediante el procesamiento de factores pro (VEGF, FGF, TGF- β) o antiangiogénicos (angiostatina y endostatina) [59] (Figura 8).

La migración de células tumorales requiere la remodelación tisular y la degradación parcial de la ECM, seguido de una migración posterior de la célula cancerosa a focos de metástasis.

La sobreexpresión de las gelatinasas se ha asociado con patologías como el cáncer debido a que favorecen la invasión tumoral y la metástasis.

Éstas proteasas son capaces de degradar la membrana basal del epitelio debido a que su sustrato principal es la colágena tipo IV, componente principal de las membranas basales, lo cual le permite a las células que las secretan penetrar hasta vasos sanguíneos o vasos linfáticos para migrar a otro sitio del organismo e iniciar el crecimiento de un nuevo tumor en un lugar anatómicamente distante al del tumor principal [16].

Las diversas líneas de investigación en la actualidad se enfocan en la búsqueda de vías de señalización que controlen la expresión de las MMPs, les impidan interactuar con moléculas que dirigen sus actividades enzimáticas o inhibir su actividad enzimática [59]. Por ende es importante entender los mecanismos moleculares que están involucrados en la sobreexpresión de gelatinasas así como de aumentar su actividad proteolítica lo que conlleva a la expansión de células tumorales debido a que confieren la capacidad de colonizar nuevos órganos en el individuo con cáncer.

6.2 *Papel de la vía NO/sGC/cGMP en la desregulación de gelatinasas.*

La vía NO/sGC/cGMP tiene un papel importante en procesos fisiológicos relacionados, en su mayoría con la homeostasis cardiovascular y endotelial. Sin embargo, existen componentes de la vía que han sido vinculados con el desarrollo de cáncer.

Se ha documentado una sobreexpresión de las subunidades de la sGC en diversas líneas celulares de cáncer de próstata, neuroblastoma y ovario [9], lo cual sugiere que la sGC puede desempeñar funciones diferentes a las que media en condiciones fisiológicas cuando está finamente regulada.

Existen antecedentes donde algún componente de la vía de señalización en estudio está implicado en el progreso tumoral en distintos tipos de cáncer.

La expresión de MMP-9 está íntimamente ligada a procesos de reparación aberrante de epitelios como el alveolar [60]. Su expresión se puede estimular *in vitro* como el Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) [61] por lo que su expresión no se considera constitutiva en la mayoría de los tejidos normales.

En base en lo anterior, existe evidencia de que componentes de la vía en estudio como el NO está íntimamente relacionado con la regulación de esta gelatinasa, pues se demostró que el NO puede atenuar la actividad y expresión de MMP-9 en células endoteliales de manera independiente de cGMP [62].

Por otro lado, la expresión de MMP-9 en músculo liso está aumentada en condiciones fisiológicas y dicho proceso es mediado por el NO y cGMP [60], mientras que en condiciones citotóxicas como concentraciones elevadas de NO inducidas por donadores externos como la espermina, concluyeron que el NO modula de manera inversa y de manera dependiente e independiente de sGC, la actividad de MMP-9 y los niveles de expresión de TIMP-1 en un modelo basado en una línea de macrófagos murinos [63].

Lo anterior sugiere que la vía puede mediar de manera dual la expresión de la gelatinasa B dependiendo de las condiciones fisiológicas y del tipo celular dónde se estudie.

Por otro lado también existe evidencia de que la sGC modula en parte la expresión de MMP-2.

En un modelo basado en células A549 se demostró que concentraciones externas de gas de NO aumentan la expresión de MMP-2, promoviendo de esta manera el desarrollo de un fenotipo invasivo dependiente de gas de NO el cual pudiera estar modulando el aumento de la expresión MMP-2 a través de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1 [64].

Lo anterior aporta evidencia de la participación de algunos componentes de la vía NO/sGC/cGMP en potenciar el fenotipo invasivo de células en condiciones que se presentan en patologías como el cáncer y que puede ser debido en parte a un aumento de la expresión de gelatinasas.

Sin embargo, no existe un estudio *in vitro* donde se analice como tal el papel que tiene la enzima central de esta vía: la sGC, en la actividad proteolítica de MMP-2 sobre el tipo de cáncer que está cobrando más vidas a nivel mundial en la actualidad como es el adenocarcinoma pulmonar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial. En general, las tasas de mortalidad debidas a esta enfermedad tienden a aumentar anualmente debido a que representa uno de los tipos de cáncer más invasivos y letales. En México, el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes entre hombres y mujeres.

A pesar de los intensos programas de concientización sobre el consumo del tabaco y de los constantes intentos por detectarlo en fases tempranas, esta enfermedad se diagnostica generalmente en estadios avanzados y con un mal pronóstico para el paciente.

Por otra parte, el reconocimiento de la extraordinaria complejidad del proceso neoplásico y de los constantes fracasos en el tratamiento de la enfermedad ponen de manifiesto la necesidad de incursionar en nuevas investigaciones que aporten elementos para la comprensión del proceso tumoral e incentiven el diseño de mejores y más eficaces esquemas terapéuticos.

En el contexto de los procesos característicos que dan origen y/o participan en el desarrollo neoplásico, el proceso de metástasis recibe especial atención puesto que es la fase terminal del cáncer y la búsqueda de nuevas moléculas que controlen la actividad de las enzimas participantes en este proceso representa una prioridad en la investigación básica.

La vía NO/sGC/cGMP se ha relacionado por favorecer diversos procesos que aceleran el progreso tumoral debido a que media la angiogénesis en células epiteliales [10], promueve la sobrevivencia tumoral en células de ovario [11] y regula positivamente la supervivencia de células endoteliales [12].

En contraste, también a esta vía se le han atribuido funciones que inhiben la progresión tumoral pues se ha reportado que una sobre-activación de la vía favorece vías apoptóticas en células de cáncer de colon [13] así como la inducción de la PKG inhibe la migración celular en células de cáncer colorectal [14].

Lo anterior sugiere que la vía NO/sGC/cGMP podría tener un papel dual en la progresión del cáncer dependiendo del tipo celular en que se estudie. Por lo anterior, es importante analizar el papel de ésta vía en la expresión de moléculas, como las metaloproteasas de matriz extracelular, que desempeñan un papel primordial en el desarrollo tumoral, sugiriendo de inmediato la posibilidad de poderla utilizar como alternativa terapéutica para el tratamiento contra el cáncer.

HIPÓTESIS

La inhibición de la guanilato ciclasa soluble con el inhibidor ODQ disminuye la actividad de la MMP-2 en la línea celular A549.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la inhibición de la guanilato ciclasa sobre la actividad de MMP-2 en células A549.

Objetivos específicos

- Inhibir a la guanilato ciclasa soluble y evaluar el efecto sobre la expresión de las subunidades de la guanilato ciclasa soluble por western blot en células A549.
- Inhibir a la guanilato ciclasa soluble y evaluar el efecto sobre la actividad de MMP-2 por zimografía en células A549.

MÉTODOS

1. Cultivo celular

El estudio se llevó a cabo en la línea celular A549, las cuales son células humanas epiteliales derivadas de adenocarcinoma pulmonar; esta línea celular fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) con número de catálogo CCL-185.

La línea celular fue crecida y mantenida en cajas de cultivo T25 (Corning Incorporated) con medio de cultivo Ham (F12) (Gibco, Life Technologies) suplementado con un coctel de antibióticos (penicilina, anfotericina y ampicilina) (Sigma-Aldrich) y 5% de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies) en incubadora a 37°C con una mezcla de 5% de CO₂/95% aire.

2. Western Blot

La presencia de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC fue evaluada por Western blot utilizando un buffer de lisis desnaturizante SoluLyse-M (Genlantis, Gene Therapy Systems, Inc) que contenía como inhibidor de proteasas PMSF (Boehringer Mannheim) 1mM para obtener un extracto celular al cual se le cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford utilizando el reactivo comercial BioRad Protein Assay (Bio-Rad). Se extrapolaron las absorbancias de las muestras en una curva estandarizada de albúmina sérica.

Se cargaron 20 μ g de proteína total mezclado con buffer muestra 4x (Tris-HCl 0.5M pH 6.8-SDS 3%-glicerol-azul de bromofenol 0.05%, β -mercaptoetanol) por muestra en un gel de SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras.

La transferencia semi-seca se realizó en una membrana de nitrocelulosa. Los sitios de posible pegado inespecífico fueron bloqueados con leche descremada al 5% en buffer PBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO, 2mM KHHPO, pH 8.0, y 0.05% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó, según fuera el caso, con el anticuerpo primario monoclonal toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos contra las subunidades de la sGC fueron usados en las siguientes concentraciones: anti-sGC $\alpha 1$ (1:500; Anti-Guanylyl Cyclase alpha 1 antibody [3G6B2] ab166699, Abcam) ó anti-sGC $\beta 1$ (1:1000; Anti-Guanylyl Cyclase beta 1 antibody [GC11] ab59169, Abcam); como control de carga se utilizó la proteína β -actina (1:1000; # Catalogo 643802 / Clona 2F1-1, Biolegend).

Como control positivo para la subunidad $\alpha 1$ se utilizó lisado de la línea celular Jurkat mientras que para la subunidad $\beta 1$ se utilizó lisado de la línea celular de NHLF. Transcurrida la incubación, la membrana se lavó 4 veces con PBS-T por 10 minutos.

Las proteínas de interés fueron detectadas por medio de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (1:1000; # catalogo HAF007 R&D Systems) después la membrana fue lavada 4 veces con PBS-T por 10 minutos.

La marca fue visualizada con el sistema de detección de quimioluminiscencia (West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo scientific) y la imagen fue capturada con el fotodocumentador Molecular Imager ChemiDoc XRS+BIO-RAD y posteriormente analizada por densitometría en el software Image J (V1.7) para obtener datos semicuantitativos de la intensidad del área de cada banda obtenida.

3. Zimografía

La actividad gelatinolítica de la MMP-2 fue evaluada por zimografía; esta técnica resuelve a las gelatinasas por su peso molecular y es apropiada para la detección de isoformas latentes y activas de las metaloproteasas, pues el uso del detergente SDS desnaturaliza las enzimas exponiendo así su sitio catalítico, lo que permite que isoformas latentes exhiban su actividad gelatinolítica después de una renaturalización parcial [19].

Los medios de las células A549 estimuladas se evaluó mediante la técnica de zimografía realizada en geles de acrilamida al 8% polimerizada en presencia de gelatina al 1% (Sigma-Aldrich) bajo condiciones no reductoras. Las muestras de medio fueron normalizadas por número de células cargando por muestra 20 μ l de medio mezclado buffer muestra 6x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, glicerol-azul de bromofenol 0.05%).

Seguido de correr los geles a 120V por 90minutos en frío, los geles fueron lavados dos veces durante 10 minutos con Tritón X-100 al 2.5% para remover el duodecil sulfato de sodio (SDS) de los geles. Los geles fueron incubados toda la noche en buffer de Glicina 0.1M, pH8, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ 50mM.

El gel se tiñó una hora con Azul de Coomasie R250 (BioRad) al 0.1% y se realizó una decoloración por 40 minutos con solución de ácido acético 10% / metanol 40%; dicha tinción dejó visualizar las zonas de actividad enzimática como bandas claras contra un fondo azul; la actividad de la gelatinasa fue identificada contrastando la banda obtenida con la perteneciente a la del medio de fibroblastos (control positivo).

Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría con el software Image J (V1.7) para obtener datos semicuantitativos de la intensidad del área de cada banda obtenida.

4. Inhibición de la sGC

El agente sintético que se utilizó para inhibir la actividad de la sGC fue el 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-uno (ODQ) (Sigma-Aldrich) el cual es un inhibidor irreversible de la sGC. Se usaron concentraciones de 10 μ M y 40 μ M de ODQ disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO).

Las células A549 fueron cultivadas en placas de 6 pozos con una densidad inicial de 500,000 células por pozo y crecidas hasta alcanzar una confluencia del 85-90%.

Las células fueron incubadas por 30 minutos con el inhibidor para después ser sustituido por medio F12 libre de suero por las siguientes 24 horas. EL medio se extrajo y se centrifugó a 1680rpm durante 10min a 4°C y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos en cada uno de los experimentos por cada condición fueron analizados mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk para saber si los datos obtenidos presentan una distribución normal. Seguido de esto se realizaron las pruebas estadísticas necesarias para encontrar significancia en los datos de acuerdo a la distribución de los datos obtenidos.

Si la distribución de los datos se ajustaba a una distribución normal se realizó la prueba paramétrica análisis de varianza (ANOVA) para conocer si al menos existía un grupo diferente al resto. Si la ANOVA presentaba diferencia significativa se realizó la prueba de Dunnet para conocer cuál de los grupos experimentales presentaba diferencias significativas respecto al grupo control.

Si la distribución de los datos no se ajustaba a una distribución normal se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para conocer si al menos existía un grupo diferente al resto. Si la prueba de Kruskal-Wallis presentaba diferencia significativa se realizó la prueba U de Mann-Whitney enfrentando el grupo control contra los grupos experimentales para conocer cuál de éstos grupos presentaba diferencias significativas.

Las diferencias fueron significativas cuando la $p \leq 0.05$. Se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism V.5.0.4 para el análisis de los datos obtenidos.

RESULTADOS

Debido a que no existe ningún trabajo que haya demostrado antes la presencia y nivel de expresión de las subunidades de la sGC en la línea celular A549, primero se evaluó su presencia y expresión por Western blot en lisados de células A549.

Lisados de células Jurkat (línea inmortalizada de linfocitos T humanos derivada de leucemia linfocítica aguda) y fibroblastos NHLF (línea comercial de fibroblastos normales humanos) fueron usados como controles positivos para la sGC- α 1 y sGC- β 1, respectivamente.

El análisis de Western Blot confirmó la presencia de las subunidades α 1 y β 1 en células A549 (Figura 9A y 9B). En condiciones basales, las células A549 mostraron una expresión casi de la mitad tanto para la α 1 como para la β 1 en comparación con los controles positivos usados: Jurkat y NHLF, respectivamente (Figura 9C y 9D, lo que sugiere que el heterodímero sGC no está sobre-expresado en este tipo de línea de adenocarcinoma.

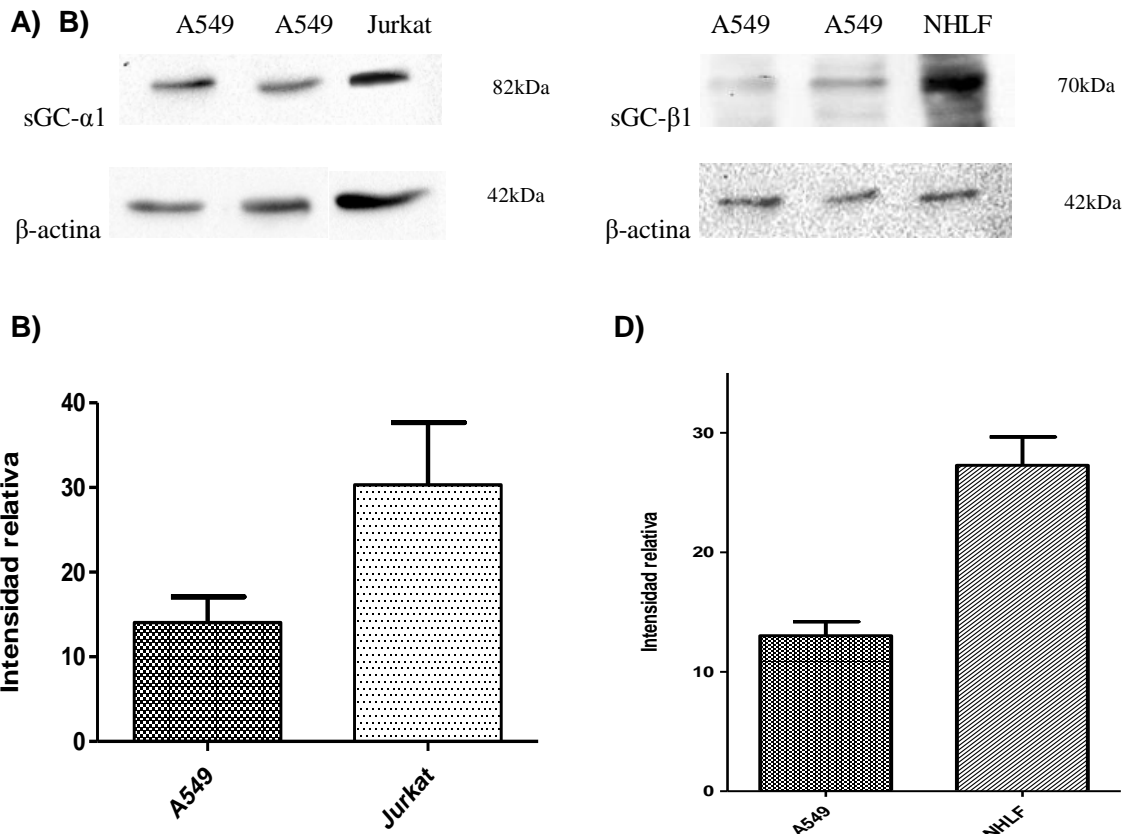
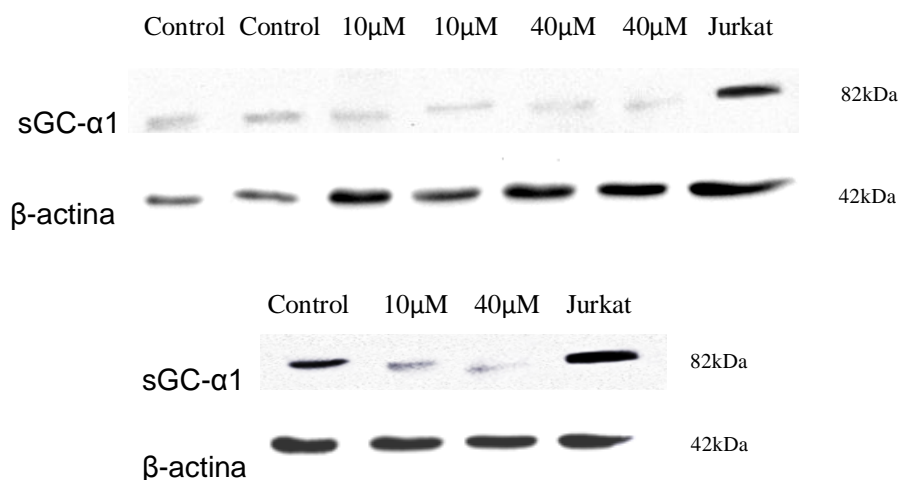


Figura 9. Expresión de las subunidades de la sGC en la línea celular A549. Expresión basal de la subunidad **A)** sGC α 1 y **B)** sGC β 1 en células A549. Gráfica de los datos densitométricos de la expresión de la subunidad **C)** sGC α 1 y **D)** sGC β 1. Los resultados se expresan con el promedio \pm la desviación estándar de (n=6) experimentos independientes: A549 (14.04 \pm 3.05), Jurkat (30.32 \pm 7.37); A549 (13.02 \pm 1.16) y NHLF (27.27 \pm 2.37).

Una vez confirmada la expresión de ambas subunidades en la línea celular A549, se procedió a evaluar la expresión de ambas subunidades por medio de Western Blot de lisados de células A549 expuestas a diferentes concentraciones del inhibidor ODQ.

Concentraciones elevadas de ODQ (mayores a 50 μ M) han mostrado producir la muerte de las células, por impedir la polimerización de microtúbulos [65]. Con base en lo anterior, las concentraciones usadas en este trabajo son las utilizadas con mayor frecuencia en la literatura, siendo 10 μ M [64] y 40 μ M [66] las evaluadas.

A)



B)

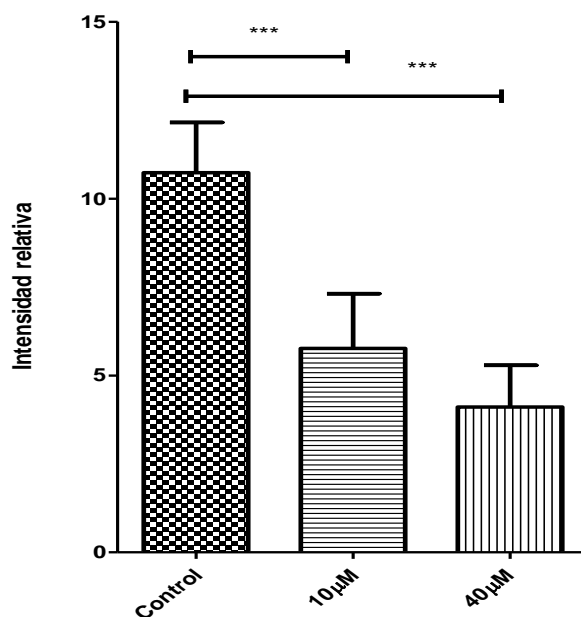


Figura 10. Expresión de la subunidad α 1 de la sGC en la línea celular A549 cuando se expone a diversas concentraciones del inhibidor ODQ. **A)** Membranas representativas de 3 experimentos independientes. **B)** Efecto del ODQ sobre la expresión de la subunidad α 1 en células A549, los resultados se expresan con el promedio \pm la desviación estándar de (n=7) experimentos independientes: Control (10.73 \pm 1.43), 10 μ M (5.76 \pm 1.54), 40 μ M (4.10 \pm 1.18). ANOVA $p < 0.0001$.

Los resultados mostrados de tres experimentos representativos del análisis por western blot para la subunidad $\alpha 1$ muestra que hay una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ cuando la línea celular A549 se expone a $10\mu\text{M}$ y $40\mu\text{M}$ del inhibidor ODQ con respecto al control tratado con el vehículo del inhibidor (Figura 10A).

Los datos densitométricos obtenidos de cada subunidad fueron analizados por la prueba de normalidad Shapiro-Wilk que arrojó que tanto los datos obtenidos de la subunidad $\alpha 1$ como los de la $\beta 1$ se aproximan a una distribución Gaussiana (datos no mostrados).

Con base en lo anterior, ambos conjuntos de datos fueron analizados por la prueba paramétrica ANOVA que arrojó que al menos existía un grupo diferente), por lo que se realizó la prueba de Dunnett para conocer cuáles grupos experimentales presentaban diferencias significativas respecto al control.

Como se muestra en la Figura 10B, el análisis por densitometría mostró que el uso del inhibidor ODQ a $10\mu\text{M}$ y $40\mu\text{M}$ disminuye significativamente la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la sGC.

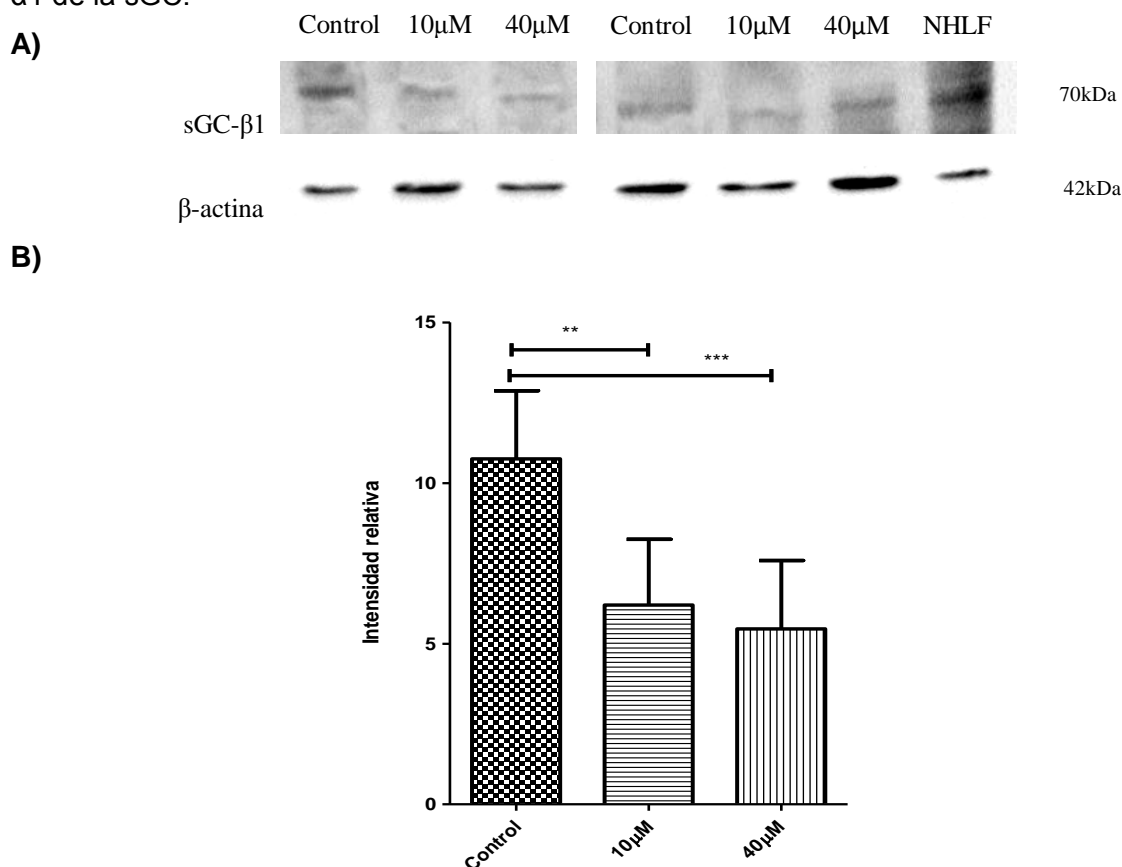


Figura 11. Expresión de la subunidad $\beta 1$ de la sGC en la línea celular A549 cuando se expone a diversas concentraciones del inhibidor ODQ. **A)** Membrana representativa de 2 experimentos independientes. **B)** Efecto del ODQ sobre la expresión de la subunidad $\beta 1$ en células A549, los resultados se expresan con el promedio \pm la desviación estándar de (n=6) experimentos independientes: Control (13.02 ± 1.16), $10\mu\text{M}$ (6.20 ± 2.12), $40\mu\text{M}$ (5.49 ± 2.12). ANOVA $P=0.0003$.

Como se observa en la Figura 11A la subunidad $\beta 1$ también disminuyó su expresión cuando las células fueron expuestas a ODQ, sin embargo esta disminución no fue de la misma magnitud a la disminución en la expresión observada en la subunidad $\alpha 1$.

De igual manera el análisis por densitometría mostró que el uso del inhibidor ODQ a $10\mu\text{M}$ y $40\mu\text{M}$ disminuye significativamente la expresión de la subunidad $\beta 1$ de la sGC en células A549 (Figura 11B).

Estos resultados observados en ambas subunidades demostraban que el agente ODQ tenía un efecto inhibitorio sobre la expresión del heterodímero de la sGC, por lo que se procedió a evaluar el efecto del ODQ sobre la actividad gelatinolítica de la MMP-2 liberada al medio extracelular de cultivos A549 por medio de zimografía.

En el caso de los valores densitométricos obtenidos para los zimogramas la “n” fue muy pequeña para que la prueba de normalidad Shapiro-Wilk fuera aplicada, por lo que se procedió a tratar los datos como no paramétricos. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para ver si existía al menos una diferencia entre grupos.

Los resultados arrojaron la existencia de al menos un grupo diferente por lo que se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para conocer entre qué grupos se presentaban diferencias significativas enfrentando los grupos experimentales contra el grupo control.

Como se puede notar en la Figura 12 el zimograma sólo pudo resolver una banda de actividad gelatinolítica de la MMP-2 y debido a que el medio de fibroblastos usado como control positivo no fue activado con un agente organomercurial como el acetato aminofenilmercurico (APMA) para que el zimograma resolviera las bandas de actividad de la isoforma latente y activa de la MMP-2, por lo que no se puede decir con total seguridad que la banda obtenida sea la del zimógeno de la MMP-2.

Con base en lo anterior, se observa que el estímulo con ODQ a células A549 mostró un aumento en la secreción y actividad de pro-MMP-2 a una concentración de $10\mu\text{M}$, sin embargo no se observó efecto alguno sobre la pro-MMP-2 a una concentración de $40\mu\text{M}$ (Figura 12A). El análisis densitométrico de los zimogramas muestra un aumento significativo sólo cuando se exponen células A549 a $10\mu\text{M}$ de ODQ, mientras que a $40\mu\text{M}$ no se observa diferencia alguna en la secreción y actividad de la pro-MMP-2 (Figura 12B). Esto sugiere que la línea celular A549 secreta una mayor cantidad de pro-MMP-2 en consecuencia al estímulo con ODQ a bajas concentraciones y estos niveles muestran una mayor actividad la cual fue detectada debido a las condiciones que se usan en el zimograma. Sin embargo, con esta técnica no se puede asegurar que también se esté afectando la expresión de la MMP-2 en consecuencia a la inhibición de la sGC.

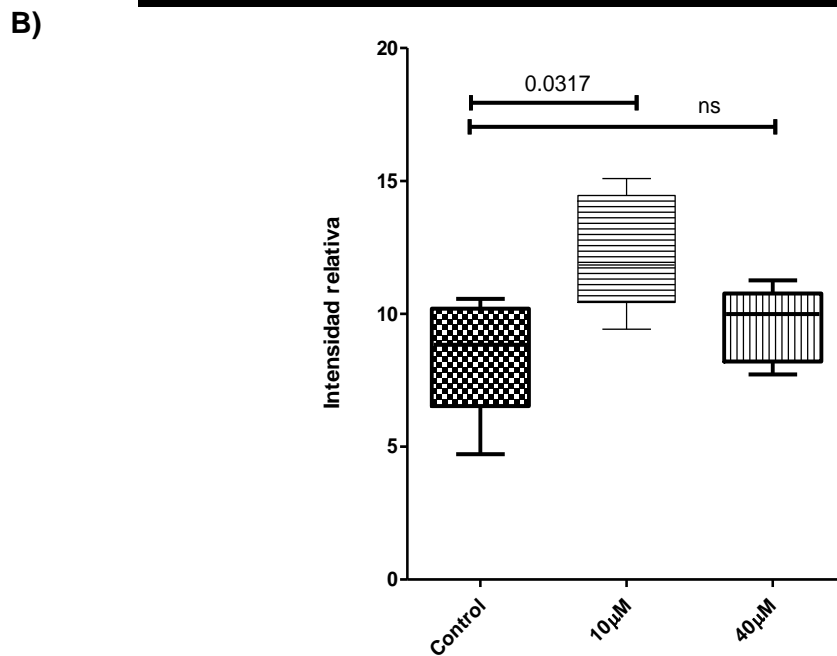
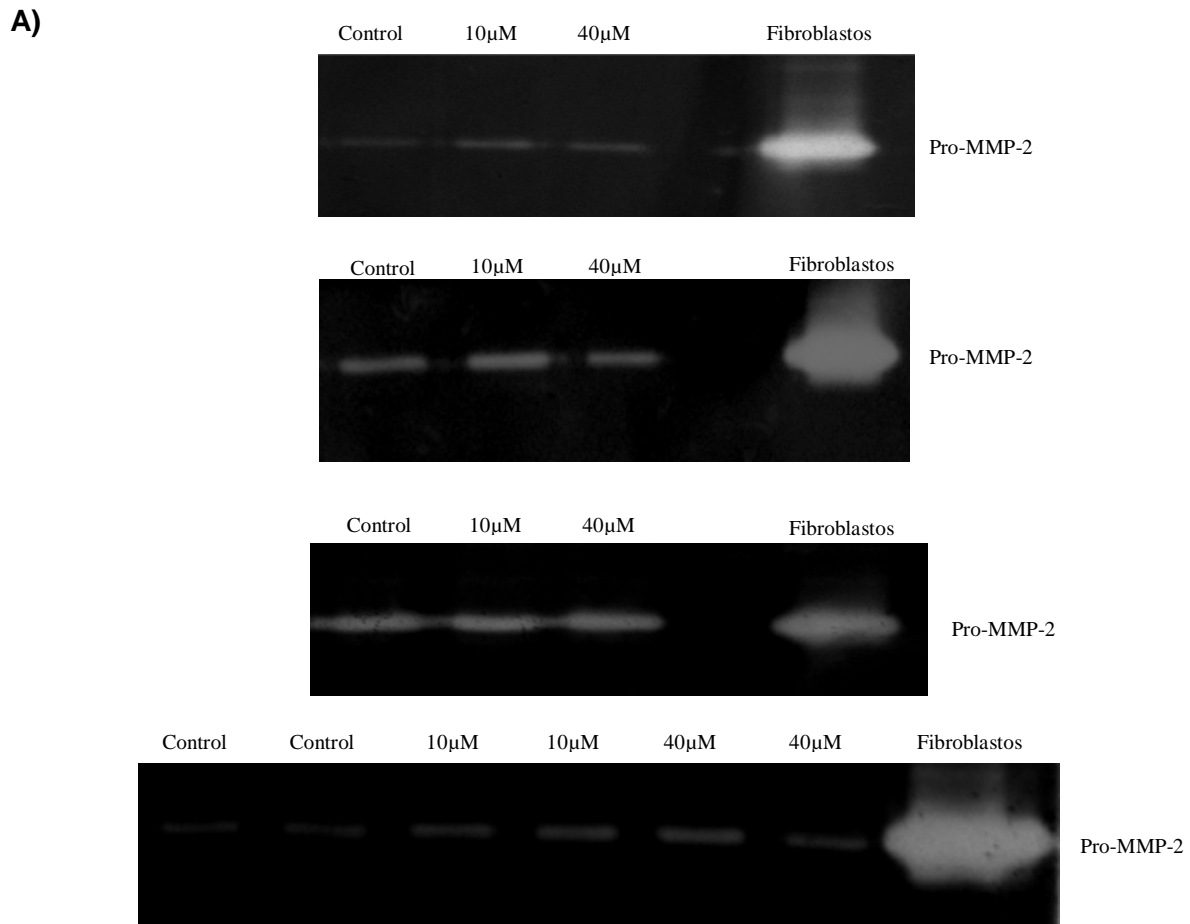


Figura 12. A) Zimogramas que muestran la actividad de la pro-MMP-2 de medios condicionados de células A549 tratadas con ODQ. **B)** Efecto del ODQ sobre la actividad de la MMP-2, los resultados se expresan con la mediana y rangos de (n=5) experimentos independientes. Como control positivo para MMP-2 se utilizó medio de fibroblastos. Kruskal-Wallis $p=0.0424$

DISCUSIÓN

La vía que media la guanilato ciclasa soluble es ampliamente estudiada en el mantenimiento de la homeostasis endotelial y vascular y ya es considerada como un blanco terapéutico en afecciones cardíacas [67].

En los últimos años algunos trabajos demostraron que esta vía está implicada en la regulación de la expresión de la MMP-9 [32] y de la MMP-2 [12] bajo distintas condiciones y en diferentes linajes celulares.

Con estos antecedentes nos planteamos profundizar en el estudio de la sGC con respecto a su posible papel sobre la actividad de la MMP-2 con el fin de establecer si esta vía promueve o inhibe el proceso de metástasis, así como analizar sus posibles implicaciones terapéuticas.

Estudios previos han demostrado que solo existen 2 agentes que inhiben la actividad catalítica de la sGC de manera directa, el ODQ y NS-2028 [68] pues el azul de metileno inhibe a la sGC de manera indirecta debido a la generación de aniones superóxido [69].

El mecanismo por el cual el ODQ inhibe a la sGC es por medio de la oxidación del ion ferroso de su grupo hemo provocando la degradación del heterodímero vía proteosoma [70], lo que explica lo observado en los resultados obtenidos por análisis de Western Blot para ambas subunidades, pues después del estímulo con el inhibidor ODQ en células A549 se observó una disminución significativa en la expresión de ambas subunidades.

Nuestro estudio reveló que no hay niveles elevados de las subunidades en la línea A549, pues se observó que expresan aproximadamente la mitad de las subunidades de la sGC con respecto a los controles positivos usados, lo que puede ser indicio de que las subunidades de la sGC no desempeñan otra función extra a la de heterodimerización en esta línea celular.

En líneas celulares de cáncer de próstata se ha encontrado sobre-expresada la subunidad $\alpha 1$, la cual secuestra del núcleo al citoplasma a p53, proceso que es independiente de su actividad de ciclasa y que resulta en una inactivación de p53 [71]. Sin embargo, no se puede descartar que alguna de las subunidades esté llevando a cabo alguna función intracelular o reguladora que no sea detectable sólo con evaluar la expresión de las mismas.

La metástasis y la invasión son las dos principales propiedades de varios tumores malignos que están asociadas con un pobre diagnóstico médico y es sabido que la MMP-2 participa en ambos procesos.

Se ha demostrado mediante la técnica de zimografía de medios condicionados de células A549 sólo se detecta una banda de actividad proteolítica que pertenece al zimógeno de la MMP-2.

De acuerdo al marcador de peso molecular, la banda de actividad no está ubicada dentro del área de los 72kDa, peso molecular del zimógeno de la MMP-2. Esto se puede deberse a que se ha reportado que los marcadores de peso molecular usados convencionalmente al no usarse en condiciones reductoras pueden indicar pesos moleculares diferentes [72].

Se encontró que la inhibición de la sGC provocó un aumento en la secreción de la pro-MMP-2 y por ende un aumento en su actividad proteolítica puesta de manifiesto por zimografía. Esta condición sólo fue encontrada a 10 μ M mientras que a 40 μ M no se encontraron diferencias.

Lo anterior puede tener posibles implicaciones en el proceso de invasión pues la pro-MMP-2 además de activarse en membrana, también se activa por procesos de autoproteólisis, cambios oxidativos en el medio o por cambios conformacionales no proteolíticos [48], los cuales no fueron evaluados en este trabajo y que pudieran modular la actividad proteolítica de esta gelatinasa bajo condiciones fisiológicas.

De acuerdo con los datos obtenidos en los zimogramas, sólo el tratamiento con ODQ a 10 μ M provocó un aumento significativo en la actividad de la pro-MMP-2, contrario a lo planteado en la hipótesis, pues no se observó una disminución de la actividad de MMP-2 probablemente a que las subunidades no muestran sobreexpresión en esta línea celular. Posiblemente lo anterior puede ser dependiente de cGMP sin embargo, se necesitan experimentos adicionales como estimular a las células con análogos de cGMP que permitan confirmar esta hipótesis.

La actividad de las MMPs se regula a cuatro niveles: transcripción del gen, activación post-transcripcional de los zimógenos, por la expresión endógena de los inhibidores tisulares de metaloproteasas [73] y por procesos epigenéticos como acetilación de histonas [74].

En contexto con lo anterior, el aumento en la secreción y actividad de pro-MMP-2 encontrado a 10 μ M puede deberse a un cambio de expresión en las moléculas que intervienen en la activación de la pro-MMP-2 como su inhibidor tisular TIMP-2 y la MMP transmembranal tipo 1 (MT1-MMP) provocado por el inhibidor ODQ ya que se ha reportado que el promotor del gen de TIMP-2 tiene sitios de unión al factor transcripcional AP-1 [42] el cual en parte es regulado por la vía en estudio.

Estas proteínas inhibidoras se unen a las MMPs en una relación estequiométrica 1:1 y directamente afectan el nivel de actividad de las MMPs y es conocido que TIMP-2 es el principal inhibidor de MMP-2 [75].

Esta molécula además de inhibidor también funciona como activador de MMP-2, lo que significa que a bajas concentraciones activa al zimógeno de MMP-2 pero inhibe a MMP-2 a altas concentraciones, sin embargo esta hipótesis deberá ponerse a prueba en futuros trabajos para poder establecer qué función tiene en diversas condiciones patológicas.

Por otra parte, es conocido que en diversos procesos fisiológicos existe redundancia molecular, es decir que diferentes vías de señalización regulan un mismo proceso.

Existe evidencia de que la señalización elevada de trombospondina1-CD47 inhibe la actividad de sGC [76]. Lo anterior ha sido observado en distintos estadios de diversas enfermedades como aterosclerosis, permaneciendo aún desconocido el mecanismo molecular por el cual ocurre esta inhibición de la actividad de la sGC y sería interesante evaluar si el aumento reportado de trombospondina 1 en cáncer de pulmón [77] está confiriendo una inhibición de la sGC que incida también sobre el aumento de la actividad de la MMP-2 como la reportada en este trabajo.

Existe evidencia de que la trombospondina 1 modula la actividad de TIMP-1 [72] por lo cual esta vía podría estar en parte, regulando la actividad de las gelatinasas por medio de sus inhibidores tisulares en el proceso de degradación de la matriz extracelular, proceso que es necesario en la metástasis y dónde el papel de la trombospondina aún es controversial.

Dado que la activación de MMP-2 requiere de un complejo ternario (pro-MMP-2, TIMP-2 y MT-MMP) que da como resultado un corte proteolítico en el N-terminal del zimógeno de MMP-2 lo que convierte a la pro-MMP-2 en MMP-2 activa la cual muestra una fuerte unión con la trombospondina 1 [78]. Lo anterior hace a la vía de señalización mediada por trombospondina-1 sea un posible mecanismo que pueda explicar y ampliar lo encontrado en este trabajo.

Es importante conocer de igual manera, el papel que tiene el NO en la regulación de las MMPs especialmente en concentraciones elevadas, pues éstas condiciones se presentan en diversas patologías como el cáncer donde existe un microambiente inflamatorio.

Bajo condiciones fisiológicas, se ha demostrado que el NO regula constitutivamente el balance MMP-9/TIMP-1 de dos maneras; de manera independiente mediante la S-nitrosilación de residuos de cisteína y dependiente de sGC vía cGMP [71]. Por otro lado,

de acuerdo con Chen *et al.*, 2008 el balance MMP-2/TIMP-2 inducido por NO exógeno es principalmente dependiente de iNOS.

El ODQ por sí solo presenta efectos anti-tumorales en líneas de cáncer de próstata promoviendo la muerte celular e inhibiendo el crecimiento tumoral y migración de una manera independiente a la inhibición de la actividad de la sGC [64], similar al efecto documentado del ODQ sobre líneas de cáncer de próstata, efecto que es independiente de cGMP [79]. En contraste, nuestros datos sugieren que el ODQ tiene un efecto pro-tumoral en esta línea celular de adenocarcinoma humano por potencialmente poder favorecer el proceso de invasión al aumentar la secreción de pro-MMP-2 pues dependiendo de las condiciones que rodeen a las células que la secretan pudiera activarse y poder ejercer su actividad proteolítica. Lo anterior sugiere que el ODQ pudiera tener una acción dual dependiendo del tipo de cáncer dónde actúe.

Es importante profundizar en el papel de la MMP-2 en la diversidad de procesos tumorales que caracterizan al cáncer pues se ha demostrado que la MMP-2, en cooperación con la integrina $\alpha 5\beta 3$, puede promover la angiogénesis por medio de la vía de señalización PI3K/AKT [80] lo que demuestra que la MMP-2 promueve procesos diferentes a la metástasis los cuales favorecen la proliferación tumoral.

Sin duda también es importante enfocar futuros estudios en aspectos epigenéticos, pues pueden proporcionar información valiosa acerca de la regulación de la actividad y expresión de MMP-2 a nivel de estructura de cromatina pues en tumores humanos ocurren cambios epigenéticos como una hipometilación global del DNA y modificación de histonas lo cual a su vez, puede modificar el patrón de expresión de diversas proteínas implicadas en el proceso tumoral [81].

Una de las principales limitaciones de este trabajo es que se trata de un estudio *in vitro* y el microambiente tumoral *in vivo* es determinante para la expresión diversos fenotipos y éste no puede ser ignorado.

El microambiente tumoral está principalmente compuesto por células estromales, fibroblastos activados, células del sistema inmune infiltradas [82], citosinas y factores de crecimiento. En ratones está bien caracterizada la presencia de células mieloides supresoras, las cuales favorecen la tumorigénesis a través de la activación y modificación de diversas vías de señalización.

La hipoxia también debe ser considerada como otro importante factor del microambiente tumoral pues altera los patrones de expresión de diversas proteínas. Modelos *in vitro* han

demostrado una sobreexpresión de MMP-2 mediada por el factor inducible por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés) en condiciones de privación de oxígeno [83].

Desde hace más de un siglo la sGC ha sido un blanco molecular en enfermedades vasculares y en los últimos años se ha estudiado por mediar diversos procesos tumorales. Estos resultados sugieren que la sGC puede ser usada como un posible blanco terapéutico para la prevención de la metástasis, pues se ha propuesto que una función normal de la vía de señalización sGC/cGMP sería un eje importante para la prevención y/o tratamiento de tumores malignos [84].

En diversos estudios se demostró que ésta vía contribuye a la estabilización y función de p53 [11] un importante regulador de la tumorigénesis y nuestros resultados sugieren que una función normal de la sGC mantiene una actividad controlada de la MMP-2.

El estudio de los procesos moleculares que regulen la expresión y activación de la MMP-2 puede ayudar a proponer nuevos blancos terapéuticos para controlar la metástasis, así como para el uso de nuevos agentes que bloqueen o controlen la expresión y activación de esta gelatinasa.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyen los siguientes puntos:

- 1) Las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC muestran una expresión menor, casi de la mitad en la línea celular A549 con respecto a los controles positivos usados.
- 2) La hipótesis planteada en este trabajo resultó errónea puesto que se encontró lo opuesto a lo que se esperaba, posiblemente a que las subunidades de la sGC no presentan niveles elevados de expresión en la línea celular A549.
- 3) El inhibidor ODQ provoca una disminución en los niveles de expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC en la línea celular A549.
- 4) El inhibidor ODQ potencialmente puede tener efectos pro-tumorales a bajas concentraciones (10 μ M) en la línea celular A549 debido a que produce un aumento en la secreción del zimógeno de la MMP-2.
- 5) Una inhibición de la actividad de la sGC con ODQ provoca un aumento en la secreción de la pro-MMP-2 sólo a 10 μ M, lo que sugiere que en parte, la sGC regula la secreción de la pro-MMP-2 en la línea celular A549, lo cual potencialmente puede favorecer el proceso de invasión.

Con base en lo anterior, es crucial entender el papel de diversas vías de señalización como la de NO/sGC/cGMP así como de otras vías que pueden modular la expresión de ambas gelatinasas que son conocidas por favorecer los procesos de invasión y metástasis en distintos grados en el cáncer [85]. De esta manera se podrán entender mejor los mecanismos que modulan procesos como la invasión y la metástasis y así tener mayores oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas que prevengan la expansión de células tumorales.

Es necesario por tanto, conocer el papel de las otras isoformas de la sGC que pueden hacer a la célula responder de manera diferente en diversas situaciones fisiológicas y la posibilidad de que exista una regulación cruzada de la MMP-2 con otras vías de señalización como las planteadas anteriormente.

REFERENCIAS

1. Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(12), 2893-2917.
2. World Health Organization. 2013. <http://www.who.int/es/> [Consulta: 30 de diciembre de 2013].
3. Sánchez de Cos J, Disdier C, Corral J, Riesco JA, Sojo MA, Masa JF. (2004). Supervivencia global a largo plazo en el cáncer de pulmón. Análisis de una serie de 610 pacientes no seleccionados. *Arch Bronconeumol*. 40:268–74.
4. Globocan 2012. 2013. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. [Consulta: 31 de Diciembre de 2013].
5. Taniguchi, Hanako. *Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos*, 2013, <http://mexico.cnn.com/salud/2013/02/04/cancer-de-pulmon> [Consulta: 20 de enero de 2014].
6. Organización Mundial de la Salud. 2013. *Cáncer. Nota descriptiva N° 297*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Consulta: 2 de enero de 2014]
7. Cerecedo-Zapata C, L.D., Gonzaga R, (2009). Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico: Parte I. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 22(43): p. 217-229.
8. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
9. Mujoo, K., Sharin, V. G., Martin, E., Choi, B.-K., Sloan, C., Nikonoff, L. E., Kots, A. Y., et al. (2010). Role of soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. *Nitric Oxide*, 22(1), 43-50. Elsevier Inc.
10. Pyriochou, A., Beis, D., Koika, V., Potytarchou, C., Papadimitriou, E., Zhou, Z., & Papapetropoulos, A. (2006). Soluble guanylyl cyclase activation promotes angiogenesis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 319(2), 663-671.
11. Fraser M, Chan SL, Chan SSL, Fiscus RR, Tsang BK (2005). Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 25: 2203–2212.
12. Chan SL, Fiscus RR (2003). Guanylyl cyclase inhibitors NS2028 and ODQ and protein kinase G (PKG) inhibitor KT5823 trigger apoptotic DNA fragmentation in immortalized uterine epithelial cells: anti-apoptotic effects of basal cGMP/PKG. *Mol Hum Reprod* 9:775–783
13. Gao, J, X. Liu, B. Rigas, (2005). Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 17207–17222.

14. Deguchi, A, W.J. Thompson, I.B. Weinstein. (2004) Activation of protein kinase G is sufficient to induce apoptosis and inhibit cell migration in colon cancer cells, *Cancer Res.* 64 3966–3973.
15. Pardo, A & Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of The American Thoracic Society.* Vol 3. pp 383-388.
16. Cascales, M & Álvarez, A. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 76 (1): 59-84.
17. Benavides, J. (2008). Cutaneous wound healing. *Rev Asoc Col Dermatol.* Vo16, Num1, 29-35.
18. Têtu, B., Brisson, J., Wang, C. S., Lapointe, H., Beaudry, G., Blanchette, C., & Trudel, D. (2006). The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast cancer research : BCR*, 8(3), R28.
19. Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology Reports*, 21(5), 1323-1333.
20. Kumar V, C.R., Robbins SL. (2005). *Patología Estructural y Funcional.* Séptima Edición ed. McGraw-Hill Interamericana
21. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. [Consulta: 30 de diciembre de 2013].
22. Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. (2013). *Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos* <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>. [Consulta: 10 de enero de 2014].
23. Brambilla, E., Travis, W. D., Colby, T. V., Corrin, B., & Shimosato, Y. (2001). The new World Health Organization classification of lung tumours. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 18(6), 1059-1068.
24. Halmos B, Boiselle PM, Karp DD. (2003). Lung cancer. *Prim Care Update Ob Gyns*;10:87–94.
25. Gauthier, N., Lohm, S., Touzery, C., Chantôme, A., Perette, B., Reveneau, S., Brunotte, F., et al. (2004). Tumour-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs. *Carcinogenesis*, 25(9), 1559-1565.
26. Kerr, K. M. (2012). Classification of Lung Cancer: Proposals for Change? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*.
27. Travis WD, B.E., Müller-Hermelink HK, Harris CC. (2004). *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, ed. E.W.H.O.C.o. Tumours. Press: Lyon: IARC.

28. Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D. J., Groome, P. A., Rami-Porta, R., Postmus, P. E., et al. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2(8), 706-714.
29. Parente I, Abal J, Fírvida, J. (2012). Terapias dirigidas en el cáncer de pulmón: ¿una nueva esperanza?. Elsevier. *Archivos de bronconeumología*. España.
30. Tournoy, K.G., et al., (2007). Integrated FDG-PET/CT does not make invasive staging of the intrathoracic lymph nodes in non-small cell lung cancer redundant: a prospective study. *Thorax*, 62(8): p. 696-701.
31. Hardman JG, Davis JW, Sutherland EW. (1969). Effects of some hormonal and other factors on the excretion of guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate in rat urine. *Journal of Biological Chemistry* 244(23):6354-62
32. Rivero-Vilches F, De Frutos S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D & Saura M. (2001). Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPc. *Nefrología* Vol. XXI. Número 3.
33. Fry, BG; Wickramaratana, JC; Lemme, S; Beuve, A; Garbers, D; Hodgson, WC; Alewood, P. (2005). Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterisation. *Biochem Biophys Res Commun.*;327:1011–1015.
34. Lucas K , Pitari G, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*.
35. Collier J and Vallance P (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci.* 10:427–431.
36. Pyriochou, A., & Papapetropoulos, A. (2005). Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cellular Signalling*, 17(4), 407-413.
37. Krumenacker, J. S., Hanafy, K. A., & Murad, F. (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin*, 62(6), 505-515.
38. Burke, A. J., Sullivan, F. J., Giles, F. J., & Glynn, S. a. (2013). The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, 34(3), 503-12.
39. García-Saiz, J.A. (2012). Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de cultura económica. 4ta edición. 115pp.
40. Babykutty, S., Suboj, P., Srinivas, P., Nair, A. S., Chandramohan, K., & Gopala, S. (2012). Insidious role of nitric oxide in migration/invasion of colon cancer cells by upregulating MMP-2/9 via activation of cGMP-PKG-ERK signaling pathways. *Clinical experimental metastasis*, 29(5), 471-92.
41. Portugal, C. C., Da Encarnação, T. G., Socodato, R., Moreira, S. R., Brudzewsky, D., Ambrósio, A. F., & Paes-de-Carvalho, R. (2012). Nitric oxide modulates sodium vitamin C

- transporter 2 (SVCT-2) protein expression via protein kinase G (PKG) and nuclear factor- κ B (NF- κ B). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 3860-72.
42. De Clerck, Y. A., Darville, M. I., Eeckhout, Y., & Rousseau, G. G. (1994). Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene*, 139(2), 185-191.
 43. Pardo A. (2008). Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXII .
 44. Erijman M. & Litovsky S. (2007). Aspectos fisiopatológicos y moleculares en la remodelación de la matriz extracelular vascular. Revista argentina de cardiología. Vol 75 N° 2.
 45. Gross, J., and Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48, 1014-1022.
 46. Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.
 47. Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
 48. Nagase, H & Woessner , F. (1999). Matrix Metalloproteinases. *The journal of biological chemistry* Vol. 274, No. 31, Issue of July 30, pp. 21491–21494.
 49. Jones, C. B., Sane, D. C., & Herrington, D. M. (2003). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*, 59(4), 812-823.
 50. Overall, C. M., & López-Otín, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature reviews. Cancer*, 2(9), 657-672.
 51. Overall, C. M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151, 79-120.
 52. Baker, A.H., Edwards, D., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J cell Sci* 115, 3719-3727.
 53. Brew, K., Dinakarandian, D., & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1477(1-2), 267-283.
 54. D'Alessio, S., Ferrari, G., Cinnante, K., Scheerer, W., Galloway, A. C., Roses, D. F., Rozanov, D. V., et al. (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 283(1), 87-99
 55. Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2006). Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer metastasis reviews*, 25(1), 115-136.
 56. Chernov, A. V., Sounni, N. E., Remacle, A. G., & Strongin, A. Y. (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(19), 12727-12734.

57. Surgucheva, I., Chidambaram, K., Willoughby, D. A., & Surguchov, A. (2010). Matrix metalloproteinase 9 expression: new regulatory elements. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*, 3(2), 41-52.
58. Wang, Z., Juttermann, R., & Soloway, P. D. (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 275(34), 26411-26415.
59. Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-174. Nature Publishing Group.
60. Bove, P. F., Wesley, U. V., Greul, A.-K., Hristova, M., Dostmann, W. R., & Van Der Vliet, A. (2007). Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(2), 138-146. American Thoracic Society.
61. Meschiari, C., Izidoro-Toledo, T., Gerlach, R & Tanus-Santos, J. (2013). Nitric oxide attenuates matrix metalloproteinase-9 production by endothelial cells independent of cGMP- or NFκB-mediated mechanisms. *Mol cel Biochem*. 1602 (1).
62. Marcet-Palacios, M., Graham, K., Cass, C., Befus, A. D., Mayers, I., & Radomski, M. W. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(1), 429-436.
63. Ridnour, L. A., Windhausen, A. N., Isenberg, J. S., Yeung, N., Thomas, D. D., Vitek, M. P., Roberts, D. D., et al. (2007). Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16898-16903. National Academy of Sciences.
64. Chen, J.-H., Lin, H.-H., Chiang, T.-A., Hsu, J.-D., Ho, H.-H., Lee, Y.-C., & Wang, C.-J. (2008). Gaseous nitrogen oxide promotes human lung cancer cell line A549 migration, invasion, and metastasis via iNOS-mediated MMP-2 production. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, 106(2), 364-375.
65. Kim SY., An JM., Lee HG., Du SK., Cheong CU & Seo JT. (2011). 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells by preventing microtubule polymerization. *Biochem Biophys Res Commun*. 408(2):287-92
66. Haramis, G., Zhou, Z., Pyriochou, A., Koutsilieris, M., Roussos, C., & Papapetropoulos, A. (2008). cGMP-independent anti-tumour actions of the inhibitor of soluble guanylyl cyclase, ODQ, in prostate cancer cell lines. *British journal of pharmacology*, 155(6), 804-813.
67. Greene, J., Gheorghide, M., Borlaug, BA., Vaduganatha, M., Burnett JC., Roessig, L., Stasch, JP., Solomon, SD., Paulus, WJ., Butler, J (2013). The cGMP signaling pathway as a therapeutic target in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc*. 11;2(6)

68. Olesen S-P, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE et al. (1998). Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 123: 299–309
69. Marczin N, Ryan US, Catravas JD (1992). Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 170–179.
70. Meurer S, Pioch S, Pabst T, Opitz N, Schmidt PM, et al. (2009) Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circ Res* 105: 33–41.
71. Cai, C., Hsieh, C.-L., Gao, S., Kannan, A., Bhansali, M., Govardhan, K., Dutta, R., et al. (2012). Soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ and p53 cytoplasmic sequestration and down-regulation in prostate cancer. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(2), 292-307.
72. Snoek-van Beurden, P. A. M., & Von den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38(1), 73-83.
73. John, A. S., Hu, X., Rothman, V. L., & Tuszynski, G. P. (2009). Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Experimental and Molecular Pathology*, 87(3), 184-188. Elsevier Inc.
74. Kim MK, Shin JM, Eun HC, Chung JH. (2009). The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PLoS One* 4(3): e4864.
75. Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Onisto, M., Levy, A. T., & Liotta, L. A. (1990). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem*, 265(23), 13933-13938.
76. Miller, T. W., Isenberg, J. S., & Roberts, D. D. (2010). Thrombospondin-1 is an inhibitor of pharmacological activation of soluble guanylate cyclase. *British journal of pharmacology*, 159(7), 1542-1547. Blackwell Publishing Ltd.
77. Baek KH, Bhang D, Zaslavsky A, Wang LC, Vachani A, Kim CF, Albelda SM, Evan GI & Ryeom S. (2013). Thrombospondin-1 mediates oncogenic Ras-induced senescence in premalignant lung tumors. *J Clin Invest*. 123(10):4375-4389.
78. Lee, T., Esemuede, N., Sumpio, B. E., & Gahtan, V. (2003). Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 38(1), 147-154.
79. Lodygin, D., Menssen, A., & Hermeking, H. (2002). Induction of the Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. *The Journal of clinical investigation*, 110(11), 1717-1727.

80. Chetty, C., Lakka, S. S., Bhoopathi, P., & Rao, J. S. (2010). MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *International journal of cancer Journal internationale du cancer*, 127(5), 1081-1095.
81. Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 biology reports*, 3, 9.
82. Mbeunkui, F., & Johann, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(4), 571-582.
83. Jing, S.-W., Wang, Y.-D., Chen, L.-Q., Sang, M.-X., Zheng, M.-M., Sun, G.-G., Liu, Q., et al. (2012). Hypoxia suppresses E-cadherin and enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation. *Diseases of the Esophagus Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus ISDE*.
84. Bian, K., Ghassemi, F., Sotolongo, A., Siu, A., Shauger, L., Kots, A., & Murad, F. (2012). NOS-2 signaling and cancer therapy. *Iubmb Life*, 64(8), 676-683.
85. Wang, M., Wang, T., Liu, S., Yoshida, D. and Teramoto, A. (2003). The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* 20, 65-72.