

0308/1  
F  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**- SEDE INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR -**

**Actividad proteolítica del tejido cervical en  
pacientes con carcinoma del cervix uterino y su  
efecto en la respuesta inmune celular *in vitro*.**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Investigación  
Biomédica Básica (Orientación Bioquímica)**

**PRESENTA**

**Adrián Daneri Navarro**

**México, D.F., Junio de 1995**

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DIRECTOR, ASESORIAS Y LUGAR DE REALIZACION DEL TRABAJO DE TESIS**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort, en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco el apoyo técnico de la Bióloga Nallely Cabrera y de María Lourdes Palmer, en el Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los experimentos de proliferación celular se realizaron en el laboratorio de Biología de los Tumores, en el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, con la asesoría del Dr. Alejandro Bravo Cuellar.

## **DEDICATORIAS**

**A MI ESPOSA: Andrea América por su genuino amor, su comprensión y constante apoyo**

**A MIS HIJOS: Adrián y Giácomo por ser la alegría de vivir**

**A MIS PADRES: Por la fortuna de su presencia**

**AL DR. RUY PEREZ MONTFORT: Por su enseñanza, su fina gentileza y respeto humano**

**AL DR. ALEJANDRO BRAVO CUELLAR: Por su genuina amistad**

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -2-m	alfa-2-macroglobulina
Aprot	aprotinina
Apt	activador del plasminógeno tipo tisular
Apu	activador del plasminógeno tipo urocinasa
Ca Inv	carcinoma invasor
CD	Grupos de moléculas de diferenciación en leucocitos
CLE	cultivo de linfocitos estimulados
CLNE	cultivo de linfocitos no estimulados
DNP-peptido-III	N-2, 4-dinitrofenil-L-prolil-L-glutaminilglicil- L-isoleucil- L-alanilglicil- L-glutaminil- D- arginina
E-64	trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FHA	fitohemaglutinina
Fosfon	fosforamidón
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IAP-1	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
IAP-2	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2
IFN-gama	interferón gama
IL-3	interleucina-3
IL-4	interleucina-4
LIEGB	lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo
LIEGA	lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto
MTT	3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
N	normales
PHMB	p-hidroximercuribenzoato
Pep-A	pepstatina A
PBS	solución balanceada de fosfatos
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	virus del papiloma humano
1-10-fen	1-10-fenantrolina

## INDICE

<b><u>SECCION</u></b>	<b><u>PAGINA</u></b>
Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes	3-17
Objetivos	18
Material y Métodos	19-25
Resultados	26-36
Discusión	37-40
Perspectivas y sugerencias para estudios posteriores	41
Referencias Bibliográficas	42-48
Anexos	49

## RESUMEN

El cáncer del cervix uterino es una neoplasia maligna de etiología multifactorial, asociada a la infección con el virus del papiloma humano y que en nuestro país representa un problema de salud pública. Se desconoce el papel de las diferentes proteinasas en la historia natural del cáncer cervical y su efecto en la respuesta inmune del hospedero. El propósito de este trabajo de tesis, fue estudiar sistemáticamente la actividad proteolítica en muestras de tejidos representativos de las diferentes etapas de la historia natural del cáncer cervical, así como el efecto de estas enzimas en la respuesta inmune celular *in vitro*. Para tal efecto, se obtuvieron extractos a partir 120 muestras cervicales de: a) tejidos normales , b) lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo, c) lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto y d) carcinomas invasores. En los extractos se cuantificó la actividad proteolítica con 3 substratos diferentes y la clase catalítica predominante. Así mismo se valoró la masa molecular aproximada de las proteinasas mediante electroforesis en gel/substrato y se evaluó su efecto sobre la actividad proliferativa de linfocitos normales estimulados con fitohemaglutinina. Los resultados mostraron un incremento en la actividad proteolítica con los 3 substratos que correlaciona con la historia natural de este tumor. La actividad proteolítica correspondió a las 4 clases catalíticas de proteinasas, con un predominio de metaloproteiniasas. Los zimogramas mostraron un número mayor de bandas en los tumores invasores, seguidos por las lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto, en relación a las de grado bajo y tejidos normales. Por su parte, los zimogramas de los extractos de tumores invasores, revelaron la presencia exclusiva de bandas con un peso molecular aproximado 52 kDa y 72 kDa, y otra de 150 kDa que también se observó en las lesiones de grado alto. Los resultados de los experimentos de proliferación de linfocitos normales, mostraron que los extractos de los tumores invasores y de las lesiones precursoras ocasionaron una inhibición mayor de la respuesta proliferativa en relación a los extractos de tejidos normales, este efecto fue parcialmente revertido por inhibidores de proteasas. En su conjunto los resultados sugieren un papel importante de las proteinasas en la historia natural del cáncer del cervix uterino. Sin embargo, se requieren otros estudios para contestar las interrogantes surgidas en este trabajo acerca de la identificación y función concreta de las proteasas implicadas en las diferentes etapas de este tumor y su probable efecto en la respuesta inmune *in vivo* del hospedero.

## ABSTRACT

The cervical cancer is a malignant neoplasm with a multifactorial etiology but closely related to the human papilloma virus and represents a public health problem in our country. The role of the different proteinases in the natural history of the cervix uterine cancer and their effects on the host's immune response are unknown. The aim of the present thesis work was to systematically study the proteolytic activity of representative tissue samples in the different stages of the natural history of the cervical cancer as well as the effects of these enzymes in the *in vitro* cellular immune response. Thus, extracts from 120 cervical samples of: a) normal tissues, b) low-grade squamous intraepithelial lesions, c) high-grade squamous intraepithelial lesions and d) invasive carcinoma were taken. The proteolytic activity with three different substrates and the predominant catalytic class were quantified in the extracts. Also, the proteinases approximate molecular mass was valued in a substrate/gel electrophoresis and its effect over the phytohemagglutinin-stimulated normal lymphocytes proliferative activity were evaluated. The results showed an increment on the proteolytic activity with the three substrates related to the natural history of this tumor. The proteolytic activity was found in the four classes of catalytic proteinases, specially metalloproteinases. Zymograms showed a higher number of bands in the invasive tumors, followed by the high-grade squamous intraepithelial lesions in comparison with the low-grade ones and the normal tissues. Zymograms of the invasive tumor extracts themselves revealed the exclusive presence of bands with a 52 kDa and 72 kDa approximate molecular weight and another of 150 kDa that was also observed in high-grade lesions. The normal lymphocytes proliferative experiments results showed that the invasive tumors and the precursor lesions extracts cause a higher inhibition of the proliferative activity in relation with the normal tissues extracts, this effect was partially reverted by proteinases inhibitors. All in all, the results suggest an important role of the proteinases in the cervical uterine cancer's natural history. However, other studies are necessary to answer the questions revealed in this work about the identification and function of the proteinases involved in the different stages of this tumor and its possible effect in the host's immune response *in vivo*.



## **ANTECEDENTES**

**Antecedentes generales del carcinoma del cervix uterino.** El carcinoma del cervix uterino representa en nuestro país casi la tercera parte de los tumores malignos que ocurren en la mujer, en especial en la etapa más productiva de la vida, donde la incidencia global anual llega a 1 caso por cada 1000 mujeres. Desafortunadamente, con frecuencia el diagnóstico se realiza en forma tardía, lo que condiciona una mortalidad elevada (1).

Los carcinomas escamosos del cervix evolucionan a partir de lesiones intraepiteliales escamosas, en particular las clasificadas como grado alto por el sistema Bethesda, en un periodo variable de tiempo (2).

La diversidad de factores de riesgo que se ha asociado al cáncer del cervix uterino y las evidencias experimentales en torno al mismo, sugieren una etiología multifactorial (2, 3). Al respecto, sobresale la asociación de variables del comportamiento sexual que facilitan la transmisión de agentes infecciosos (4); tales como los virus del papiloma humano tipo 16 y en menor grado los tipos 18, 31, 33 y 35, que se involucran en las lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto, caracterizadas por una deficiencia en la maduración epitelial y por un riesgo elevado de progresar a cáncer invasor (2, 5, 6). El genoma viral de los tipos 16 y 18, se ha identificado en el 70% de los carcinomas escamosos invasores del cervix (7). Se ha observado también su integración en el genoma de las células provenientes de tumores invasores y de líneas de estirpe cervical (8). Además se ha reportado que los genes E6 y E7 de estos virus, son capaces de transformar queratinocitos humanos y de inactivar a genes supresores (anti-oncogenes), tales como el p53 y el gen supresor que se inactiva en los retinoblastomas (9, 10). Sin embargo se ha señalado, que a pesar de que la infección con los virus del papiloma humano es un factor importante, es insuficiente por si mismo en el desarrollo del carcinoma invasor del cervix uterino (2). En este sentido, se ha implicado a otros factores de riesgo, tales como el inicio de la actividad sexual en edad temprana, tabaquismo (11), uso de anticonceptivos orales (12), deficiencia en las vitaminas A (13) o C (14) y en el ácido fólico (15), y finalmente estados de inmunodeficiencia, adquirida ya sea por tratamiento inmunosupresor o infección por VIH (16, 17), lo cual nuevamente refuerza una etiología multifactorial.

**Implicaciones clínicas de los procesos de invasión y metástasis en Oncología.** Se considera que un tumor es invasor cuando traspasa la membrana que divide el epitelio del estroma subyacente (carcinomas) o cuando cruza la membrana de basamento del tejido donde se originó el tumor estromal (tumores mesenquimatosos). Cuando un tumor se vuelve invasor, se inician una serie de eventos que ocasionan fenómenos de compresión y respuestas del hospedero, que se manifiestan como síntomas y signos en el enfermo con cáncer. Los tumores pueden infiltrar a otros tejidos por invasión local, vía linfática o por vía sanguínea. Las metástasis ocasionan los efectos más graves que se observan en un paciente con cáncer. Se ha reportado que el 30% de los pacientes con un diagnóstico reciente de cáncer (excluyendo a los tumores malignos de la piel que no son melanomas), presentan metástasis clínicas al momento del diagnóstico; además la mitad del restante 70%, tienen micrometástasis ocultas que se van a manifestar tarde o temprano en forma clínica. La formación de colonias metastásicas es un evento temprano que ocurre a partir del tumor primario, una vez iniciada la vascularización y en ocasiones con tumores menores de 0.125 cm. La frecuencia de las metástasis es mayor conforme el crecimiento y evolución del tumor. Sin embargo, se conoce que la capacidad de invadir y producir metástasis, depende de la agresividad intrínseca de una fracción celular y de la variedad histológica del tumor. Finalmente, los enfermos mueren debido a la compresión ejercida por las metástasis sobre tejidos u órganos vitales o por las complicaciones asociadas al tratamiento contra las mismas (18).

**Como invaden y producen metástasis las células malignas.** Anteriormente se consideraba que los procesos de invasión y metástasis eran una consecuencia directa de la proliferación celular del tumor primario que permitía el desplazamiento mecánico de las células malignas, a través de los cordones celulares con menor resistencia. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que son procesos activos que involucran la adhesión de la célula tumoral a la membrana de basamento o a la matriz extracelular, la actividad proteolítica de las células tumorales sobre estos componentes y la motilidad celular para desplazarse hacia los sitios invadidos. Estos procesos requieren una coordinación exacta que permita por ejemplo degradar selectivamente la matriz extracelular en el frente de la célula tumoral, mientras que en el extremo opuesto la célula permanece adherida. También interactúan diferentes mecanismos de regulación positiva que facilitan la invasión y las metástasis, o mecanismos de control negativo, tales como inhibidores de la adhesión,

migración celular o de la actividad proteolítica (19). El desarrollo de las metástasis implica un proceso más complicado y selectivo, que depende de la interacción de las células malignas con factores del hospedero. El fenotipo de las células que producen metástasis, implica una serie de características como la adhesividad, motilidad, producción de enzimas, tales como algunas proteinasas, cambios en la expresión o modificación de moléculas de superficie que en general les permiten interactuar con las células del hospedero y por ello producir metástasis, si sobreviven a todas las etapas del proceso (20). Experimentos de transfección con el oncogén *ras*, han demostrado que este oncogén tiene la capacidad de inducir metástasis en algunas células, y que acompañando a este fenómeno se presenta un incremento en la expresión de algunas enzimas degradativas, tales como las colagenasas tipo IV y las proteinasas de cisteína. También existe una disminución en la expresión o función de sus respectivos inhibidores endógenos, así como un incremento en la expresión de la calciclina (proteína citoplasmática que une calcio) y de la osteopontina (proteína de secreción que une de calcio con función de adhesión celular). Sin embargo, un número importante de tumores y líneas celulares con capacidad de producir metástasis, no presentan alteraciones o cambios en la expresión del oncogén *ras*, lo cual sugiere que existen diferentes vías o caminos para llegar a este fenotipo de célula productora de metástasis (21). Por otro lado, se han descrito algunos productos de genes con la capacidad de inhibir las metástasis, como es el caso del Nm23, cuya disminución se asocia a metástasis y comportamiento agresivo en tumores de mama, colon, estómago y ovario entre otros (22, 23). La capacidad del Nm23 para inhibir las metástasis, parece estar dada por su actividad de fosforilasa de serina, que pudiera afectar los sistemas de transducción celular de la célula tumoral, y no necesariamente por la función de difosfato nucleótido cinasa (24). La alteración en las moléculas de histocompatibilidad clase I, es un fenómeno frecuente en los tumores, principalmente en asociación a metástasis y progresión tumoral. Dada la importancia de la expresión de estas moléculas de superficie para que las células tumorales puedan ser reconocidas por los linfocitos T, se sugiere que esta alteración tiene que ver con los fenómenos de escape o evasión a la respuesta inmune (25).

**Etapas de las metástasis.** Las metástasis son el resultado de una serie de secuencias organizadas que no son debidas al azar, y que implican una selectividad por determinados órganos o tejidos, dependiendo de la

estirpe del tumor. Estos eventos son gobernados por un grupo de moléculas que incluyen enzimas degradativas, factores de motilidad celular, factores de crecimiento, adhesinas y otras moléculas de superficie. Este grupo de factores biológicos determina si las células de un tumor primario progresan a metástasis o se mantienen a nivel local. En acuerdo a lo publicado por Fidler en 1982, menos del 0.01% de las células tumorales que se encuentran en la circulación sanguínea, van a formar una colonia metastásica, en un ambiente de competencia selectiva que favorece a una fracción de células pre-existente en la heterogeneidad celular del tumor primario. Estas células deben ser capaces de salir del tumor primario, invadir los tejidos locales y entrar en la circulación general; en seguida, las células en el torrente circulatorio, deben sobrevivir al trauma mecánico impuesto por la corriente sanguínea y sus elementos formes; después, se requiere un arresto en un lecho vascular particular, donde desempeñan un papel fundamental las adhesinas. Finalmente, las células adheridas deben extravasarse al interior de los tejidos del órgano blanco, para proliferar en lo que será la colonia tumoral (26).

**Características de las membranas basales y de la matriz extracelular.** Las membranas de basamento corresponden a matrices extracelulares especializadas con funciones de soporte, barrera y regulación celular. Estas estructuras se encuentran prácticamente en todas las especies de animales multicelulares. Se sabe que son producidas por células epiteliales, endoteliales y del mesénquima. Las membranas funcionan como filtros pasivos y selectivos tanto para moléculas como para células entre los compartimentos tisulares. Sin embargo, permiten el paso de células inflamatorias, mediante mecanismos específicos que involucran la expresión de adhesinas y la degradación local de estas membranas por proteinasas. Una fracción de las células tumorales presenta un fenotipo particular que les permite atravesar las membranas basales de epitelios, vasos sanguíneos y de otros tejidos. Además, las membranas de basamento funcionan como reguladoras de la adherencia, crecimiento y diferenciación celular. La morfología típica de una membrana de basamento, tales como las que se localizan bajo los epitelios y endotelios, corresponde a una estructura delgada entre la capa celular y una capa gruesa de estroma que contiene los elementos celulares, moleculares y fibrilares característicos de estos tejidos. En el caso de los epitelios, esta membrana se encuentra conectada al estroma mediante fibrillas de anclaje. Por su parte el músculo esquelético esta rodeado por una membrana

de basamento que forma paquetes diferenciados en la unión neuromuscular. La estructura molecular de las membranas basales, se conforma por la interacción específica entre glucoproteínas y protómeros de proteoglicanos, formando ensamblajes supramoleculares. El colágeno tipo IV, laminina, entactina-nidógeno y varios proteoglicanos son los principales componentes que participan en las interacciones mencionadas. Las cadenas de colágeno tipo IV forman una red poligonal a través de la unión de los grupos NH<sub>2</sub> terminal, COOH terminal y asociaciones laterales. La laminina por su parte forma una segunda red de polímeros que se enlaza con el colágeno tipo IV a través del complejo entactina-nidógeno. Por su parte, el proteoglicano sulfato de heparán se encuentra firmemente anclado en la membrana de basamento, formando dímeros y oligómeros entre sí, e interaccionando con el colágeno tipo IV y la laminina. Este proteoglicano, desempeña una función importante en la exclusión de moléculas en base a la carga eléctrica. Finalmente, se ha observado una heterogeneidad en la estructura y función de las membranas de basamento en los diferentes tejidos y especies de animales que además se puede modificar en respuesta a las necesidades fisiológicas del tejido (27, 28).

**Importancia de la vascularización del tumor y sus colonias.** Se ha señalado en la literatura que el crecimiento y las metástasis tumorales, dependen en gran medida de la neovascularización. La angiogénesis tumoral se refiere al desarrollo y crecimiento de vasos sanguíneos nuevos, tanto dentro como alrededor del tumor. En realidad un tumor sin neovascularización no alcanza 2 mm de diámetro. Además, para que las células tumorales puedan producir metástasis, se requiere que tengan un acceso a la circulación sanguínea, para localizarse en los órganos blanco, donde también se requiere una neovascularización. Incluso, se ha publicado que existe una correlación entre la densidad de la microvasculatura en el tumor primario y la incidencia de metástasis en carcinomas de mama, próstata, cabeza y cuello, y carcinoma de células no pequeñas de pulmón (29). El proceso de la angiogénesis requiere de la liberación de factores solubles que estimulan el crecimiento de los vasos sanguíneos. El primer evento implica la disolución de la membrana de basamento en las vénulas más cercanas a la fuente de los factores angiogénicos, seguida de la migración de las células endoteliales hacia estos factores, infiltrando los tejidos a su paso. A medida que las células endoteliales de avanzada penetran entre los tejidos, las células que las siguen se dividen y ocupan el espacio

dejado por las primeras, formando un cordón celular. Esta serie de pasos se repiten hasta que eventualmente llegan al sitio donde crece el tumor. En este sentido, la angiogénesis se puede considerar como un proceso de invasión controlado, donde en forma similar a la invasión tumoral, son importantes las enzimas proteolíticas para la disolución de la membrana basal y procesos de invasión. Se ha descrito que algunos factores angiogénicos aislados de placentas o tumores humanos similares a los factores de crecimiento de fibroblastos, tienen la capacidad de estimular a los activadores del plasminógeno (tipo tisular y urocinasa) y metaloproteinasas, en cultivo de células endoteliales. Además de esta función, los factores básico y ácido de crecimiento de fibroblastos, son agentes quimiotácticos y mitogénicos en las células endoteliales. En general la angiogénesis se ve afectada por otros factores que de manera indirecta fomentan la neovascularización, como el Factor de Necrosis Tumoral-Alfa, el Factor de Crecimiento Tumoral-Beta, el Factor de Crecimiento Epidérmico y la angiogenina. Por otro lado los inhibidores endógenos de los activadores del plasminógeno (PAI-1) y de las metaloproteinasas (TIMP), parecen tener un efecto opuesto que limita la actividad angiogénica. Finalmente, se ha mencionado que los vasos sanguíneos neoformados en los tumores, son con frecuencia defectuosos y más susceptibles a los procesos de invasión que su contraparte en los tejidos normales (30).

**Adherencia y motilidad de las células tumorales en los procesos de invasión y metástasis.** Los avances recientes en el campo de la biología de los tumores, ha permitido la identificación de una amplia variedad de moléculas que son importantes desde las primeras etapas de los procesos de invasión y metástasis y que tienen que ver con la adherencia o la motilidad de las células tumorales. Dentro de la primera categoría sobresalen las integrinas, las selectinas, las caderinas, anexinas y las adhesinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las integrinas forman parte de una familia de receptores de adhesión celular. Se han descrito 20 heterodímeros diferentes que forman parte de esta familia, involucrados en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Las integrinas participan en el anclaje de las células, pero además envían señales de regulación que pueden afectar el crecimiento, la diferenciación y el fenotipo celular. Se sabe que las integrinas son fundamentales en los procesos de reparación tisular, de inflamación, de invasión y de metástasis (31). Se ha señalado que se requiere una actividad de fosforilación de tirosina, para que las

integrinas puedan llevar a cabo sus funciones de transducción al interior celular (32). Por otro lado, se ha reportado que los niveles de expresión de las integrinas beta 1 en los tumores, pueden afectar el crecimiento tumoral dependiente del anclaje celular, las señales de transducción celular, la organización del citoesqueleto, la organización de la matriz extracelular, la presentación de factores de crecimiento unidos a la matriz y la actividad de las células del sistema inmune contra el tumor (33). Para entender mejor el fenómeno de las metástasis, se debe comprender: ¿ cómo es que las células tumorales se separan de los tumores primarios?. En este sentido, se ha apreciado que las caderinas desempeñan un papel fundamental en las uniones celulares, y que la perturbación o disminución de estas moléculas facilita la disgregación de las células tumorales y por ende las metástasis (34). Otro factor importante en los procesos de invasión y metástasis es la motilidad de las células tumorales. Se ha descrito que el medio condicionado de cultivo de fibroblastos que se emplea en los estudios de invasión *in vitro*, contiene factores quimioattractantes para las células tumorales, entre ellos la fibronectina y el colágeno. Así mismo, se ha establecido que las células tumorales emplean para desplazarse un mecanismo haptotático que consiste en una migración direccional en respuesta a la unión a un substrato sólido, como la fibronectina, laminina, colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. En células de melanomas metastásicos, se ha encontrado que la fibronectina presenta diferentes regiones que promueven la motilidad y por otro lado la adhesión a las células tumorales (35). El receptor de la laminina en las células tumorales, parece ser también un factor importante en la migración de las mismas, ya que anticuerpos contra el mismo son capaces de inhibir la haptotaxis mediada por laminina, pero no la promovida por fibronectina (36).

**Las proteinasas en la invasión y metástasis.** Las proteinasas son un elemento fundamental en la invasión y metástasis a diferentes niveles, ya que promueven la angiogénesis, desagregación y motilidad celular, degradando los componentes de la matriz extracelular, membranas de basamento, láminas basales y estroma intersticial. Los elementos que conforman las membranas de basamento y matrices extracelular, como los colágenos, laminina, fibronectina, entactina, nidógeno, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, requieren de enzimas específicas para ser degradados. Es por tal motivo que para degradar estas estructuras en su conjunto, se necesita un grupo complejo de enzimas proteolíticas (37). Enzimas de las cuatro clases

catalíticas de proteinasas se han correlacionado con procesos de invasión y metástasis: 1) proteasas de serina (activadores del plasminógeno tipo urocinasa, guanidinobenzoatasa, plasmina y la enzima tipo tripsina de los tumores), 2) proteasas de cisteína (catepsina B y catepsina L), 3) metaloproteinasas (colagenasas, gelatinasa y estromelisinias), 4) proteinasas de aspártico (catepsina D) (38). Los datos iniciales acerca del papel de las proteinasas en las metástasis, se basaron en suposiciones indirectas en modelos animales, sin embargo, en los últimos años el empleo de inhibidores específicos y anticuerpos contra las enzimas para bloquear su efecto, ha proporcionado evidencias directas del papel de ciertas proteinasas en la diseminación de las células cancerosas. Además, se ha comprobado mediante estudios de transfección con los genes que codifican para algunas proteasas, que el comportamiento maligno de las células receptoras aumenta conforme a la expresión de estos genes (39).

**Activadores del plasminógeno, su receptor y sus inhibidores.** Los activadores del plasminógeno son proteasas de serina que catalizan la conversión del plasminógeno en plasmina, enzima de amplio espectro, importante en los procesos de la fibrinólisis. Los activadores del plasminógeno existen en dos formas estructuralmente relacionadas: a) activador del plasminógeno tipo tisular (APt), b) activador del plasminógeno tipo urocinasa (APu). La conversión de las células normales a malignas, con frecuencia se acompaña de un incremento en el APu. Se sabe que el APu se encuentra involucrado en forma directa en los procesos de invasión y metástasis (40, 41). El APu, desempeña un papel central en los procesos de invasión y metástasis, ya que además tiene la capacidad de activar en forma directa o indirecta a otras enzimas proteolíticas como son las metaloproteinasas (37). Recientemente, se ha reportado una correlación entre la expresión y actividad del APu y los inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo 1 y 2 (IAP-1 y IAP-2) con un comportamiento de agresividad y metástasis de células de melanomas humanos. Al juzgar por la distribución de esta enzima, su receptor y sus inhibidores en muestras frescas tanto de lesiones precursoras de melanomas, como en melanomas incipientes y avanzados, la activación de estos componentes ocurre en forma tardía, tanto en el frente invasor como en células del estroma o matriz extracelular (42). Las evidencias mostradas en otro trabajo donde también se emplearon células de melanoma humano, apuntan a una contribución inicial del APu, seguida de una activación independiente de las colagenasas tipos IV de 72



kda y 92 kda y de la estromelina (43). Por su parte en carcinomas y adenocarcinomas de pulmón, se ha encontrado niveles más elevados de APu y de los IAP-1 y 2 (44, 45). Sin embargo, también se ha reportado que en los tumores de pulmón de pacientes con un pronóstico clínico reservado, las células malignas exhiben una menor concentración de IAP- 1 y 2 (46). Por su parte, se ha reportado que las pacientes con cáncer de mama y niveles elevados de la actividad y concentración antigénica del APu tienen una recurrencia más rápida y una sobrevida menor que las pacientes con niveles menores de estos marcadores (47). Janicke y colaboradores, comunicaron que niveles del APu superiores a 2.97 ng/mg de proteína o niveles del IAP-1 superiores a 2.18 ng/mg de proteína en extractos de tumores malignos de mama, se asocian a una recaída y una mayor mortalidad. Al analizarse los resultados en pruebas multivariadas, los niveles de APu mostraron ser un factor pronóstico independiente con un impacto semejante al status de los ganglios linfáticos. Las pacientes que no tiene tomados los ganglios linfáticos se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a las variables de concentración de APu y IAP-1, de tal suerte que las pacientes con niveles bajos tienen un pronóstico de sobrevida mayor de 93% a 3 años, contra 55% si se encuentran elevados, lo cual pudiera ser una herramienta útil en la decisión de tratamiento (48). Otros autores, han estudiado también en extractos citosólicos carcinomas ductales de mama y otras variedades histológicas de este tumor, tanto en mujeres en pre-menopausia como en post-menopausia, con resultados similares a los reportados por Janicke y colaboradores (49, 50, 51). Por otro lado, las neoplasias malignas del sistema nervioso central, también se han asociado con niveles elevados del APu y IAP-1 en extractos tumorales, lo que sugiere que este sistema enzimático es importante en la la patogenia de diferentes entidades malignas (52, 53).

**Otras proteasas de serina que se han asociado a procesos de invasión y metástasis.** Se ha localizado en la superficie de las células epiteliales una enzima peculiar denominada guanidinbenzoatasa, que comparte algunas características con la tripsina y con el activador del plasminógeno. En el citoplasma de estas células se ha identificado también a un inhibidor específico de esta enzima. Este complejo enzima-inhibidor se ha estudiado mediante microscopía de fluorescencia en tejidos de carcinomas del colon y carcinomas escamosos orales, donde se ha observado que esta enzima tiene una asociación con los procesos de invasión y metástasis (54, 55). La guanidinbenzoatasa purificada a partir de carcinomas renales humanos, indica que se trata de

una enzima diferente a los activadores del plasminógeno al juzgar por su actividad en diferentes sustratos, sensibilidad a inhibidores y falta de reconocimiento por anticuerpos monoclonales específicos contra activadores del plasminógeno. Al parecer se trata de una enzima con un peso molecular de 80.000 daltons asociada en forma débil a la membrana celular y que no se detecta en tejidos normales de riñón (56). Inicialmente se había descrito en líquido de tumores mucinosos del ovario una enzima tipo tripsina que se le llamó tripsina asociada a los tumores. Se han descrito 2 isoenzimas, idénticas a la tripsina en peso molecular, inmunoreactividad y secuencia de aminoácidos amino-terminales, pero que difieren en especificidad por el sustrato, estabilidad y patrón de elución en cromatografía de intercambio iónico. Actualmente no queda claro si se trata de enzimas codificadas por otros genes o una modificación de la tripsina propia de los tejidos estudiados. La isoenzima número dos, abreviada en inglés TAT-2, se ha reconocido en varias líneas tumorales, tales como COLO 205 (carcinoma de colon), K-562 (eritroleucemia), CAPAN-1 (carcinoma de páncreas) y HT 1080 (fibrosarcoma), donde parece desempeñar un papel importante en la degradación de la matriz extracelular. Así mismo, se ha identificado un inhibidor endógeno de esta enzima, denominado inhibidor de la tripsina asociada a los tumores (57).

**Metaloproteinasas y sus inhibidores.** Las metaloproteinasas son un grupo de enzimas con un centro activo que contiene al metal zinc. Se han descrito por lo menos 7 miembros de esta familia, con un rango de peso molecular de 28,000 a 92,000 daltons. Este importante grupo de enzimas, conocidas también como matricinas, puede degradar algunos componentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno y los proteoglicanos, durante el desarrollo embrionario, remodelación tisular y en estados patológicos como la artritis, periodontitis, osteoporosis y en forma notable en el cáncer. Estas enzimas son secretadas como zimógenos inactivos que requieren la eliminación de un segmento de aproximadamente 10,000 daltons para activarse, al dejar libre el sitio activo de la enzima (58). Los modelos experimentales de invasión y los estudios en muestras de tumores humanos han aportado una información importante acerca del rol de las diferentes metaloproteinasas que se han implicado en los procesos de invasión y metástasis tumoral, principalmente las colagenasas tipo-IV de 72.000 y 92.000 daltons, y las estromelisin (59, 60, 61). Existe cierta controversia, en relación a las células que expresan estas enzimas, por ejemplo, se ha reportado en

adenocarcinomas de próstata provenientes de humanos, un incremento en la expresión del ARN mensajero correspondiente a la colagenasa tipo-IV de 72.000 daltons y de la propia enzima, al parecer producidos directamente por las células tumorales (62). En cambio en muestras de cáncer de mama, se ha observado que son los fibroblastos los encargados de producir esta enzima, en respuesta a un estímulo soluble de las células tumorales (63). Por su parte, se ha visto que el tejido necrótico de los tumores, es una fuente importante de colagenasas, principalmente tipo-IV de 92.000 daltons, como está descrito en tumores mamarios murinos (64). A la fecha, todavía se desconocen muchos aspectos de los mecanismos de regulación de las metaloproteinasas, principalmente en lo que se refiere al control de la transcripción, tanto en las células tumorales, como los tejidos circundantes o del estroma. Sin embargo, se conoce que su expresión es modulada por citocinas, expresión diferencial de integrinas y factores de crecimiento, e involucra los productos de los genes Fos y Jun de la familia de oncogenes. Se sabe que después de la activación de las metaloproteinasas a nivel celular o pericelular, la actividad de estas enzimas puede controlarse por inhibidores endógenos y específicos de estas enzimas, lo que procura en condiciones normales un equilibrio que permite la acción de las enzimas sin ocasionar un daño tisular grave. Sin embargo, en condiciones patológicas, un exceso de las enzimas o de sus inhibidores puede ocasionar, como en el caso del cáncer, un daño a los tejidos y facilitar la diseminación tumoral (65, 66, 67). Originalmente se habían descrito dos inhibidores tisulares de las metaloproteasas que en idioma inglés se abrevian TIMP-1 y TIMP-2, los cuales tienen la capacidad de inhibir todas las metaloproteinasas que se ha estudiado hasta la fecha (colagenasas intersticiales, colagenasas tipo-IV, estromelisin). Cada uno de estos inhibidores tiene un sitio de unión específico a cada enzima, diferente al centro activo. Estos inhibidores, controlan la activación de las pro-enzimas y en algunos tumores, tienen un efecto anti-metastásico (68). Además se ha descrito que el TIMP-2, tiene la capacidad de inhibir la angiogénesis y la proliferación endotelial estimulada por el factor de crecimiento de fibroblatos beta, lo que sugiere otra forma alternativa de control de los tumores (69). Recientemente se ha descrito un tercer miembro de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP-3), el cual se ha identificado en tejidos de placenta, útero y en todos los carcinomas de mama que se han estudiado. Este inhibidor no se ha detectado en otros tejidos como el hígado y el ovario (70).

**Proteasas de cisteína y sus inhibidores.** Se ha demostrado que algunas proteasas de la clase catalítica de cisteína, tales como las catepsinas B, L y tipo B tienen la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular a pH neutro, como se ha demostrado en cápsulas de cristalino bovino, donde se obtienen fragmentos de degradación del colágeno tipo IV, laminina y fibronectina con las tres enzimas, lo que sugiere su probable participación en los procesos de invasión por las células tumorales (71). Ensayos con los inhibidores naturales de las proteasas de cisteína, la stefinas y el inhibidor sintético E-64, sugieren que las proteasas de esta clase catalítica participan en la motilidad celular, como se ha demostrado con células de melanoma humano y del sarcoma W256 (72). Se ha descrito una correlación significativa entre la expresión de la catepsina B y los estadios clínicos en pacientes con carcinoma de la vejiga urinaria, lo que sugiere la participación de esta enzima en los procesos de invasión relacionados con este tumor (73). Estudios *in vitro* con líneas celulares de carcinoma de células transicionales de vejiga, sugieren que la capacidad de invadir es el resultado de una redistribución de la catepsina B en la membrana plasmática de las células tumorales y que cuando esta enzima es inhibida por el E-64 se disminuye la capacidad de invasión y la motilidad de las células tumorales (74). La catepsina B secretada por gliomas humanos, parece desempeñar un papel importante en los procesos de invasión, como lo señalan algunos estudios *in vitro*, donde se ha demostrado que esta enzima se secreta como una proenzima de 42 kDa que requiere la activación por enzimas proteolíticas que generan la forma activa de 29 kDa (75). Resultados similares se han encontrado en el líquido secretado por melanomas en cultivos *in vitro*, donde además se han identificado inhibidores naturales de 12 kDa de peso molecular (76). También se ha sugerido que la catepsina B participa en la activación del pro-activador del plasminógeno tipo urocinasa unido a su receptor en células de cáncer de ovario (77).

**Proteasas ácidas y sus inhibidores.** La catepsina D es una enzima ácida presente en todas las células que presentan lisosomas. Esta enzima se encuentra aumentada en el citosol de las células cancerosas de mama, tanto estrógeno positivas como en las negativas. Al parecer su incremento se debe a una sobreexpresión del gen que codifica para la enzima, a una alteración en su maduración y a una mayor secreción. Originalmente se describió una correlación entre los niveles citoplasmáticos de la enzima con un riesgo mayor de

metástasis (78, 79). Incluso se señaló que los niveles de esta enzima se asocian a invasión en los vasos sanguíneos peritumorales (80). Sin embargo otros estudios sugieren que el aumento en la secreción de esta enzima no se asocia a una mayor invasividad. El inhibidor de proteasas ácidas, pepstatina A, tampoco afecta el comportamiento de invasión en estudios *in vitro*. Estos resultados sugieren que el pronóstico malo que se observa en pacientes con niveles elevados de esta enzima es un fenómeno que acompaña al comportamiento agresivo, pero no su causa (81). En otro estudio realizado por Seshadri y colaboradores se concluye que los niveles elevados de la catepsina D total en pacientes con cáncer de mama con ganglios axilares negativos, se asocia a un periodo de supervivencia más corto que con frecuencia se acompaña de una amplificación del oncogen HER-2/neu. Se ha especulado que esta asociación pudiera tener alguna relación con la diseminación de las metástasis que ocurren en estas pacientes (82).

**Cáncer del cervix uterino y proteasas.** Al revisar la literatura, se aprecia que son muy escasos los estudios relativos al cáncer del cervix uterino en relación a las proteinasas en los procesos de invasión de este tumor. En 1980, el grupo de Benítez-Bribiesca reportó un incremento en de la catepsina B en el suero y líquido vaginal de pacientes con carcinoma invasor del cervix uterino al compararlo con los correspondientes de mujeres normales (83). Sin embargo, este estudio se basó exclusivamente en el empleo de un sustrato, N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-naftilamida (BANA) que se asumió que era específico para esta enzima. Sin embargo, se ha demostrado en repetidas ocasiones la ambigüedad de esta suposición, tal como se ha comprobado con enzimas como la tripsina (84). Además, en el trabajo realizado por Benítez-Bribiesca, no se realizó un estudio sistemático con los inhibidores de las clases catalíticas de proteinasas. En resumen, se puede afirmar que se desconoce el papel de las proteinasas en la historia natural del cáncer del cervix uterino.

**Respuesta inmune y cáncer.** A pesar de que los tumores se originan a partir de tejidos del propio organismo, el proceso de transformación maligna puede implicar la expresión de antígenos tumorales que pueden inducir una respuesta inmune contra las células tumorales. Estos antígenos pueden ser reconocidos por anticuerpos, producidos mediante la inmunización con células tumorales en otra especie, y tratarse de proteínas, glucoproteínas o glucolípidos, sin embargo estas moléculas no necesariamente estimulan una

respuesta en el propio hospedero. En cambio, los antígenos tumorales pueden también identificarse con linfocitos T e incluso, en algunos modelos experimentales se ha demostrado la capacidad que tienen estos antígenos de originar un rechazo del tumor en animales inmunizados. Los linfocitos T, reconocen a los antígenos tumorales en una forma que requiere ser procesada y presentada en conjunto con las moléculas de histocompatibilidad, clase I (linfocitos CD8+) o clase II (linfocitos CD4+). En el primer caso, los antígenos deben localizarse en el citoplasma de la célula tumoral, ser degradados a péptidos, localizarse en el retículo endoplásmico donde se unen a moléculas pesadas de histocompatibilidad clase I, recientemente sintetizadas y posteriormente a la  $\beta$ -2-microglobulina. Entonces siguen un camino exocítico a la membrana celular, donde son reconocidos por las células CD8+. En el segundo caso, el proceso se inicia con la unión del antígeno nativo a la célula auxiliar (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y células de Langerhans entre otras), en seguida se efectúa la internalización del antígeno (fagocitosis, endocitosis en vesículas cubiertas de clatrina, o por pinocitosis) y se localiza en endosomas o lisosomas, donde el antígeno es procesado mediante proteasas a fragmentos peptídicos que se unen a la hendidura de las moléculas de histocompatibilidad clase II, y siguen una ruta a la superficie de la membrana celular, donde son reconocidos por las células CD4+. Precisamente, mediante linfocitos T del hospedero, se han reconocido numerosos antígenos tumorales, por ejemplo, productos de oncogenes activados por mutaciones o rearrreglos de los genes normales (proteína *ras*), mutaciones puntuales en otros genes celulares, productos de la transformación por virus (moléculas E6 y E7 del virus del papiloma humano, genes asociados a la infección por el virus de Epstein-Barr) o de genes silentes (MAGE-1) no expresados fuera del periodo embrionario (85). Las evidencias experimentales sugieren que los mecanismos efectores más importantes contra los tumores son: a) células T citotóxicas, b) células T productoras de citocinas, c) células asesinas naturales, d) células activadas por linfocinas (citocinas), e) macrófagos y f) anticuerpos, sobresaliendo los primeros cuatro mecanismos efectores (86). A pesar de que los tumores pueden expresar antígenos tumorales que son reconocidos por el hospedero y que el sistema inmune de éste, puede limitar el crecimiento de algunos tumores, se sabe que las células tumorales tienen la capacidad de evadir al sistema inmunológico, a través de mecanismos tales como: a) modificación en la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I en las células tumorales, b) falta de moléculas coestimuladoras en las células tumorales, como el B7, c) productos

tumorales con actividad inmunosupresora, d) tolerancia inmunológica, e) selección de clones no inmunogénicas, f) modulación antigénica, g) antígenos tumorales solubles y complejos inmunes y h) enmascaramiento antigénico (87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94). Mc Coy y colaboradores reportaron una proteasa ácida (precursora de la catepsina L) secretada por fibroblastos murinos transformados, que interfiere con el procesamiento antigénico que normalmente realizan las células accesorias del sistema inmune (95). Sin embargo, se desconoce si las proteinasas secretadas o presentadas a nivel de membrana de las células tumorales, afectan la respuesta inmune del hospedero.

## **OBJETIVOS**

El cáncer del cervix uterino es un problema de salud pública en nuestro país, y ocasiona un gasto alto en las campañas de prevención, tratamiento y rehabilitación de las pacientes. En contraste, no se ha estudiado en forma sistemática en este tumor, el papel de las proteinasas en los procesos de desarrollo, invasión, metástasis y respuesta inmune del hospedero. Con base en lo anterior y con el apoyo de lo publicado en otros tumores, se planteó la propuesta de que durante el desarrollo oncogénico de los tumores escamosos del cervix uterino, se incrementa progresivamente la actividad de las proteinasas, favoreciendo los procesos de invasión y metástasis e interfiriendo de manera negativa con la respuesta inmune celular del hospedero. Para contrastar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- 1. Comparar la actividad proteolítica, clases catalíticas de endopeptidasas y peso molecular aproximado de las proteinasas presentes en extractos de muestras de tejidos normales, LIEGB, LIEGA y tumores invasores del cervix uterino.**
- 2. Evaluar si las proteinasas presentes en los extractos de muestras de tejidos normales, LIEGB, LIEGA y tumores invasores del cervix uterino, afectan la respuesta inmune celular *in vitro* de linfocitos normales estimulados con fitohemaglutinina.**



## MATERIALES Y METODOS

**Tipo de Diseño de Estudio.** Por un lado se trató de un estudio con diseño de tipo analítico en cuanto a la asociación entre la actividad proteolítica y las etapas de la historia natural del cáncer del cervix uterino, y por otro lado y experimental respecto al efecto de la actividad proteolítica en la respuesta inmune celular *in vitro*. Transversal, debido a que la valoración se realizó en un tiempo específico único.

**Unidad de observación.** Muestras de tejido cervical.

**Universo de trabajo.** Mujeres con el diagnóstico citológico e histopatológico de : a) cervix normal, b) lesión intraepitelial escamosa de grado bajo (LIEGB), c) lesión intraepitelial escamosa de grado alto (LIEGA), d) carcinoma invasor del cervix uterino (Ca Inv)

**Características y Criterios de inclusión de los sujetos de estudio.** El estudio se realizó en un total de 120 pacientes de los servicios de Ginecología del Hospital Civil de Guadalajara, y del Instituto Jalisciense de Cancerología, con un rango de edad de 30 a 65 años, condición socioeconómica baja y residencia en el occidente del país en los últimos 10 años. 30 pacientes con el diagnóstico de LIEGB, 30 con LIEGA, 30 con Ca Inv de células Escamosas y 30 con citología e histopatología normal en acuerdo al Sistema Bethesda, 1988 para el reporte citológico de anomalías en las células escamosas del cervix uterino (2).

**Criterios de exclusión.** Se excluyeron de la investigación a las pacientes que recibieron quimioterapia, radioterapia, drogas inmunosupresoras y/o datos clínicos, de laboratorio o de gabinete que sugirieron otras neoplasias, enfermedades autoinmunes, estados de inmunodeficiencia e infecciones cervico-vaginales.

**Tamaño de la muestra.** Se estudiaron muestras de 30 sujetos de cada grupo.

**Definición de variables del estudio:**

**VARIABLES INDEPENDIENTES:** a) muestras de tejido cervical de pacientes con el diagnóstico de LIEGB, LIEGA y carcinoma invasor, b) muestras de tejido cervical de mujeres sin patología cervical.

**VARIABLE INTERVINIENTE:** inhibidores de las clases catalíticas de endopeptidasas.

**VARIABLES DEPENDIENTES:** a) actividad proteolítica general, b) inhibición de la actividad proteolítica, c) bandas zimográficas con actividad proteolítica, d) supresión de la respuesta proliferativa de linfocitos normales.

**CONSIDERACIONES ÉTICAS.** El trabajo se sujetó a lo señalado por el Reglamento de la Ley General de Salud, en Materia de Investigación para la Salud vigente en nuestro país, y siguiendo las recomendaciones del Acuerdo de Helsinki. A las integrantes del estudio se les informó con anticipación y detalle, los motivos de la investigación y en que iba a consistir su participación. Previa aprobación por escrito, se les tomó las muestras, que en todos los casos fué parte del procedimiento rutinario de diagnóstico y/o terapéutico realizado en los servicios de Ginecología del Hospital Civil de Guadalajara o del Instituto Jalisciense de Cancerología.

**Tipo de muestras y sus características:**

**a) Muestras para la citología exfoliativa y estudios microbiológicos.** En todos los casos las muestras se tomaron en mujeres en etapa no menstrual, con una espátula de nylon (Cyto-Brush) a partir de la unión escamo-columnar, canal endocervical y fondos de saco vaginales. Las muestras fueron examinadas por dosatólogos diferentes y se reportaron de acuerdo al Sistema Bethesda 1988 para el reporte citológico de anomalías en las células escamosas del cervix uterino.

**b) Muestras cervicales por biopsia.** Previo exámen colposcópico, se tomaron muestras de aproximadamente 200 mg de peso húmedo con una pinza especial para biopsias cervicales. Una sección de la muestra se fijó en formaldehído al 10%, para estudios histopatológicos de rutina, los cuales fueron evaluados por dos patólogos diferentes, y la otra sección de 100 mg de peso húmedo, libre de sangre y material necrótico se conservó a -70°C hasta la obtención de los extractos.

**c) Muestras de sangre de las pacientes.** Se tomó una muestra de 10 ml de sangre venosa (en ayuno) en tubo al vacío sin anticoagulante, para la determinación de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2, por ensayo inmunoenzimático (Abbott Laboratories) y en su caso prueba confirmatoria por inmunorélica tipo Western (Dupont Laboratories).

**d) Muestras de sangre del donador para los ensayos de proliferación de linfocitos normales.** El donador para todos los ensayos fué el alumno de esta tesis. Se tomaron para cada ensayo 10 ml de sangre venosa en tubo al vacío estéril con heparina, Vacutainer (Becton Dickinson). La muestra se procesó para los ensayos de proliferación celular inmediatamente después de la extracción .

**Obtención de los Extractos.** Los extractos se prepararon a partir de las muestras cervicales, previo análisis de improntas para confirmar las características de los tejidos. Los especímenes se homogenizaron en un homogenizador/mezclador de alta velocidad (Polytron PT 3000, Kinematica AG., Brinkmann, Suiza) durante 5 minutos a 15,000 rpm, en 4 ml de NaCl 0.15 M a 4° C. Después de 3 ciclos bruscos de congelación/descongelación, cada muestra se sonicó (Sonic Dismembrator Brand, USA) 2 veces a 21 kilociclos por segundo durante un minuto con un ajuste de 40 a 4°C. Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 8,000 X g durante 10 minutos a 4° C y el sobrenadante se dividió en alicuotas de 500 µl que se conservaron a -70° C hasta la realización de los ensayos. La concentración de proteínas de los extractos se determinó por el método de Bradford (96).

**Alfa-2-macroglobulina.** La Alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ -2m) se purificó de acuerdo al método descrito por Kurecki y colaboradores (97), a partir de unidades de plasma fresco humano, donados por el Banco de Sangre del Hospital Pedro Loza S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco.

**Determinación de la actividad proteolítica:**

a) Medición de la actividad proteolítica con polvo azul de cuero como sustrato. La actividad proteolítica con el polvo azul de cuero (Calbiochem, La Joya CA) se determinó mediante la medición de la absorbancia del

sobrenadante coloreado soluble, producto de la degradación de este sustrato sólido e insoluble (98), para tal efecto, se incubaron 50 µl de los extractos con 5 mg del polvo azul de cuero en 1 ml de tampón Tris 50 mM pH 7.5, durante 20 horas a 25° C, en rotación constante. La reacción se detuvo por enfriamiento brusco de la muestra durante 3 minutos, seguido de una centrifugación a 8,000 X g 10 minutos a 4 °C. La absorbancia se midió en el sobrenadante a una longitud de onda de 520 nm .

b) Medición de la actividad proteolítica con el N-2, 4-dinitrofenil-L-prolil-L-glutaminilglicil- L-isoleucil- L-alanilglicil- L-glutaminil- D- arginina (DNP-Péptido-III) como sustrato. Para este ensayo, 100 µl de cada muestra se incubó con 100 µl del DNP-Péptido-III (1 mg/ml en Tris 50 mM, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, albúmina bovina al 0.02%, pH 7.6) durante 22 horas a 37° C. La reacción se detuvo con 0.5 ml de HCl 1.0 N. Los fragmentos degradados por las enzimas proteolíticas se extrajeron con 1 ml de etil acetato / n-butanol 1: 0.15 (v/v) durante 45 segundos. Esta mezcla se centrifugó en seguida a 2,600 X g durante 15 minutos a 25° C, y se determinó A<sub>365</sub> nm en la fase orgánica (99).

c) Medición de la actividad proteolítica con gelatina como sustrato. En este ensayo se incubaron 50 µl de cada extracto con 5 mg de gelatina insoluble (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) en 1 ml de tampón salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, durante 20 horas a 25° C , en rotación constante. La reacción se detuvo por enfriamiento brusco durante 3 minutos, seguido de una centrifugación a 8,000 X g durante 10 minutos a 4°C. Se mezclaron 400 µl del sobrenadante con 600 µl de ácido acético 0.2 M, 250 µl de citrato de sodio 0.2 M y 500 µl de reactivo de ninhidrina, preparado de la siguiente manera: ninhidrina 0.05 M, ácido ascórbico 1.8 mM, y etilén glicol monometil éter 12.6 M . La mezcla se calentó a 100°C durante 15 minutos en baño de glicerol. La reacción térmica se detuvo bruscamente en agua helada. Finalmente, se añadió 1.5 ml de etanol al 60% a cada muestra y después de una agitación vigorosa, se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 440 nm contra blanco de reactivos. En estas condiciones de lectura, la densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de prolina e hidroxiprolina liberada del sustrato insoluble presente en la solución (100).

**Ensayos de inhibición de la actividad proteolítica.** Se realizaron empleando como sustratos al polvo azul de cuero y a la gelatina. Para este fin, se pre-incubaron 50 µl de cada extracto a 4°C durante 60 minutos con alguno de los siguientes inhibidores (todos de Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) en las concentraciones finales señaladas: fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, aprotinina (Aprot) 100 µg/ml, trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano (E-64) 2 µM, p-hidroximercuribenzoato (PHMB) 1 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 2 mM, 1,10-fenantrolina (1-10-Fen) 2 mM, fosforamidón (Fosfon) 5 µM, y pepstatina-A 1 µg/ml. Con la excepción de la pepstatina-A, los ensayos de inhibición con el polvo azul de cuero como sustrato, se realizaron en 1 ml de tampón Tris 50 mM, pH 7.5; mientras que con la gelatina se realizaron en el mismo volumen, pero de PBS, pH 7.4. Para ambos sustratos, en los ensayos de inhibición con la pepstatina-A, se empleó 1 ml de tampón de citrato 0.05 M, pH 5.0. Al finalizar la pre-incubación, se agregó el sustrato correspondiente, y se procedió a completar el ensayo de acuerdo a lo señalado en los apartados anteriores.

**Electroforesis en gel/sustrato.** Se utilizó un procedimiento similar al descrito por Pérez-Montfort (101). Los extractos se prepararon con el tampón de muestra que contenía dodecil sulfato de sodio, en presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol, es importante mencionar que las muestras no se sometieron a calentamiento. La separación por electroforesis se efectuó en geles de poliacrilamida al 12.5%. En algunos casos, después del corrimiento, los geles se incubaron con 10 volúmenes de Tritón X-100 en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 durante 90 minutos a temperatura ambiente en agitación leve y con cambios de solución cada 30 minutos. En seguida, los geles se lavaron 2 minutos en agua destilada y se equilibraron durante 10 minutos en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 con CaCl<sub>2</sub> 10 mM e inmediatamente después, se colocaron sobre otros geles con acrilamida al 7.5% en Tris-HCl 0.075 M, pH 8.45 y 0.57 mg ml<sup>-1</sup> de gelatina sin dodecil sulfato de sodio (gel/sustrato). En otros casos, los geles no recibieron el tratamiento con el Tritón-X-100, después de la electroforesis y directamente se empalmaron con el gel sustrato. Los geles empalmados, se colocaron entre dos placas de vidrio y se incubaron a 37° C durante 24 horas en ambiente húmedo. Los geles se fijaron y se tñieron en isopropanol al 25% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v) y Azul Brillante de Coomassie G-250

(Bio-Rad, Richmond CA) al 0.05% (p/v) durante 2 horas y se aclararon en ácido acético glacial al 10% (v/v) y metanol al 10% (v/v) durante 24 horas a temperatura ambiente.

**Ensayos de la proliferación de linfocitos normales estimulados con mitógeno.** Para evaluar si las proteinasas presentes en los extractos cervicales de los cuatro grupos estudiados, afectan la respuesta inmune celular *in vitro* de linfocitos normales, se empleó un ensayo de proliferación de linfocitos descrito por Bagge, que se basa en la conversión de una sal del tetrazolio a un producto coloreado, formazán (102). Para este fin, se extrajeron 10 ml de sangre venosa en cada ensayo, en un tubo al vacío estéril con heparina. La capa de células mononucleares se separaron mediante un gradiente de 5 ml de Ficoll-Hypaque a una densidad de 1.077 centrifugando a 450 X g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El paquete de células mononucleares se lavo 3 ocasiones con PBS, pH 7.4 a 4° C. La viabilidad celular se determinó mediante la exclusión de azul tripano, resultando en todos los casos mayor a 95%. Se ajustaron a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  células/ml en un medio AIM-v, libre de suero (Difco), Se colocaron 100  $\mu$ l de esta suspensión por pozo, en cajas de cultivo de 96 pozos (Nun Clone, Dinamarca) que contenían 15  $\mu$ l de alguno de los extractos o NaCl 0.15 M, pre-incubados previamente 1 hora a 4°C con 15  $\mu$ l de alguno de los siguientes inhibidores a las concentraciones finales señaladas o sus vehículos como controles: Alfa-2-macroglobulina 0.8 mg/ml, Aprotinina 100  $\mu$ g/ml, trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano (E-64) 2  $\mu$ M, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 2 mM, 1,10-fenantrolina 2 mM. Se adicionó medio de cultivo con o sin la dosis óptima de fitohemaglutinina que en este caso fué de 2.5  $\mu$ g/ml (concentración final) para todos los ensayos. Los cultivos se realizaron durante 72 horas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> en ambiente húmedo. Después de este lapso, se incubaron 2 horas con 50  $\mu$ l de bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/ml en PBS pH 7.4. Finalmente, se incubaron a temperatura ambiente durante 12 horas con 200  $\mu$ l del tampón de extracción que contenía dodecil sulfato de sodio al 20% (p/v) en una solución pH 4.7 con dimetilformamida 50% (v/v) y 2.5% de ácido acético. Las placas se leyeron en un lector de micro-ELISA a una longitud de onda de 570 nm contra blanco de reactivos. En algunos ensayos en lugar de los extractos, se empleó tripsina (10,700 unidades BAEE/ mg de proteína, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) o colagenasa (E.C.3.4.2.4.3., 1970 unidades/mg de proteína, Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO), preincubadas o no con aprotinina o 1-10 fenantrolina, respectivamente a las concentraciones y condiciones señaladas en los experimentos anteriores. En todos los casos se confirmó que los inhibidores utilizados no fueron tóxicos para las células, mediante la prueba de exclusión de azul tripano.

**Cálculos de resultados y análisis estadístico.** La actividad se expresó como unidades de actividad proteolítica que fueron calculadas de la siguiente manera : la absorbancia dividida entre la concentración de proteínas de los extractos de los tejidos expresada en  $\mu\text{g}$ . Los resultados de los ensayos de inhibición, se expresaron como porcentaje de inhibición con cada uno de los inhibidores, en relación a la prueba sin el inhibidor. Los resultados se presentaron como promedios  $\pm$  sus desviaciones estándar. Las diferencias entre los valores de los cuatro grupos se analizaron con la prueba t de Student, con separación del estimado de las variancias, si las desviaciones estándar eran significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de F. En el caso de los ensayos de inhibición, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney. Los resultados de las pruebas de proliferación de linfocitos, se expresaron como actividad de proliferación ( $[\text{Densidad Óptica a una longitud de onda de } 570 \text{ nm, de linfocitos estimulados con PHA} - \text{Densidad Óptica a una longitud de onda de } 570 \text{ nm, de linfocitos sin PHA}] \times 100$ ) y porcentaje de inhibición de la proliferación.

## RESULTADOS

La mayor parte de los carcinomas epidermoides invasores del cervix que se incluyeron en este trabajo, correspondió a la variedad de células grandes no queratinizantes (93%), contra un 7% de la variedad de células pequeñas. Por su parte, el 50% de las LIEGA, correspondió a carcinomas *in situ*, 29% a displasias severas y 21% a displasias moderadas, de acuerdo a las clasificaciones previas a la de Bethesda (2).

**Actividad proteolítica.** En un primer tiempo se decidió estudiar la actividad proteolítica general en los extractos de tejidos normales, lesiones precursoras y tumores invasores del cervix uterino, con tres substratos diferentes. Los resultados mostraron que la actividad proteolítica general, se incrementó en forma significativa conforme a la progresión de las lesiones cervicales hacia la malignidad, tal, como podemos apreciarlo en la Tabla I, que presenta los resultados obtenidos con los tres substratos. Con el polvo azul de cuero, observamos que el promedio de la actividad proteolítica de los extractos de los carcinomas invasores, es seis veces mayor que el correspondiente a los extractos de los tejidos normales del cervix, tres veces mayor a los de las LIEGB y aproximadamente el doble de veces en relación a los extractos de LIEGA. A pesar de que los resultados son menos impresionantes tanto con el substrato DNP-péptido III como con gelatina, también se observó el mismo fenómeno de progresión de la actividad proteolítica: normales < LIEGB < LIEGA < Ca Inv, aunque las diferencias entre los grupos LIEGBA y LIEGA no fueron precisas.

**Inhibición de la actividad proteolítica.** Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición, mostraron que los inhibidores de las cuatro clases catalíticas de endopeptidasas, inhibieron en mayor o en menor grado la actividad proteolítica de los extractos de los cuatro grupos estudiados. Sin embargo, tal como lo podemos apreciar en la Tabla II, la clase catalítica predominante de proteinasas correspondió a la de metaloproteinasas, ya que tanto en los ensayos con el azul de cuero, como con gelatina, el EDTA o la 1,10-fenantrolina inhibieron desde un 36% a 55% de la actividad proteolítica total, sin diferencias significativas entre los grupos estudiados. Es importante mencionar que el inhibidor de metaloproteinasas fosforamidón,



**Tabla I. Actividad proteolítica de extractos de carcinomas invasores y lesiones precursoras del cervix uterino con tres diferentes substratos.**

**Promedio ± S de la actividad proteolítica (3 substratos)**

<b>Grupo</b>	<b>Poivo azul de cuero-</b>	<b>Péptido DNP-III+</b>	<b>Gelatina*</b>
<b>N</b>	9.9 ± 5.8	5.8 ± 2.9	64.9 ± 10.4
<b>LIEGB</b>	20.4 ± 3.9	11.9 ± 2.2	89.8 ± 12.5
<b>LIEGA</b>	34.5 ± 17.5	13.1 ± 4.9	84.2 ± 24.0
<b>Ca Inv</b>	65.5 ± 18.7	16.9 ± 4.6	133.3 ± 31.6

La actividad proteolítica se expresó como el promedio ± S de las unidades de actividad proteolítica. Una unidad = absorbancia a la longitud de onda correspondiente al substrato / concentración de proteínas de los extractos en µg.

Análisis estadístico (t de Student):

- Ca Inv vs LIEGA p < 0.05, vs LIEGB p < 0.01, vs N p < 0.007.

\* Ca Inv vs LIEGB y LIEGA p < 0.015, vs N p < 0.010.

+ Ca Inv vs LIEGB p < 0.05, vs N p < 0.01.

**Tabla II. Efecto de los inhibidores de las clases catalíticas de endopeptidasas en la actividad proteolítica de tumores invasores y lesiones precursoras del cervix uterino.**

**Grupos (% de inhibición promedio  $\pm$  S )**

<b>Inhibidor (es)</b>	<b>Normales</b>		<b>LIEGB</b>		<b>LIEGA</b>		<b>Ca Inv</b>	
<b>EDTA (2 mM)</b>	47.4	$\pm$ 11.8	54.2	$\pm$ 15.2	42.1	$\pm$ 7.8	41.3	$\pm$ 9.0
<b>1-10 fen (2 mM)</b>	41.5	$\pm$ 16.8	55.7	$\pm$ 13.6	40.2	$\pm$ 10.8	36.4	$\pm$ 9.6
<b>Fosfon (5 <math>\mu</math>M)</b>	-2.9	$\pm$ 7.8	-7.0	$\pm$ 14.4	-7.2	$\pm$ 16.8	-9.9	$\pm$ 19.3
<b>PMSF (1 mM)</b>	8.0	$\pm$ 5.1	13.1	$\pm$ 4.8	10.2	$\pm$ 4.0	12.8	$\pm$ 7.2
<b>Aprot (100 <math>\mu</math>g/ml)</b>	18.8	$\pm$ 3.2	18.2	$\pm$ 10.2	13.4	$\pm$ 7.8	20.8	$\pm$ 10.8
<b>E-64 (2 <math>\mu</math>M)</b>	6.9	$\pm$ 1.6	19.9	$\pm$ 13.6	10.3	$\pm$ 3.2	13.1	$\pm$ 4.0
<b>PHMB (1 mM)</b>	9.5	$\pm$ 6.2	14.8	$\pm$ 7.8	18.1	$\pm$ 9.0	27.5*	$\pm$ 13.6
<b>Pep-A (1 <math>\mu</math>M)</b>	7.3	$\pm$ 10.8	7.4	$\pm$ 5.2	8.1	$\pm$ 4.4	9.0	$\pm$ 6.2
<b><math>\alpha</math>-2m (0.8 mg/ml)</b>	72.2	$\pm$ 39.6	67.8	$\pm$ 24.0	73.8	$\pm$ 28.0	71.1	$\pm$ 21.1
<b>EDTA/Aprot/PHM</b>	85.8	$\pm$ 34.8	86.6	$\pm$ 26.0	83.6	$\pm$ 28.1	89.7	$\pm$ 32.4

Los extractos de las muestras se preincubaron con los inhibidores a 4 °C durante una hora, seguida de una incubación a 25 °C durante 22 horas con gelatina como sustrato. La reacción se detuvo a 4 °C por centrifugación a 6,000 x g. se agregó el reactivo de ninhidrina al sobrenadante y se calentó a 100 °C durante 15 minutos en baño de glicerol. Después de añadir etanol, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 440 nm. \* p < 0.05 (t de Student)

inhibió en más del 27% la actividad proteolítica. el resto de los inhibidores disminuyó esta actividad en porcentajes menores al 19%. Con la excepción del PHMB que en los extractos de tumores invasores produjo una inhibición significativa de la actividad proteolítica en comparación con los tres grupos restantes ( $p < 0.05$ ), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de extractos con el resto de los inhibidores.

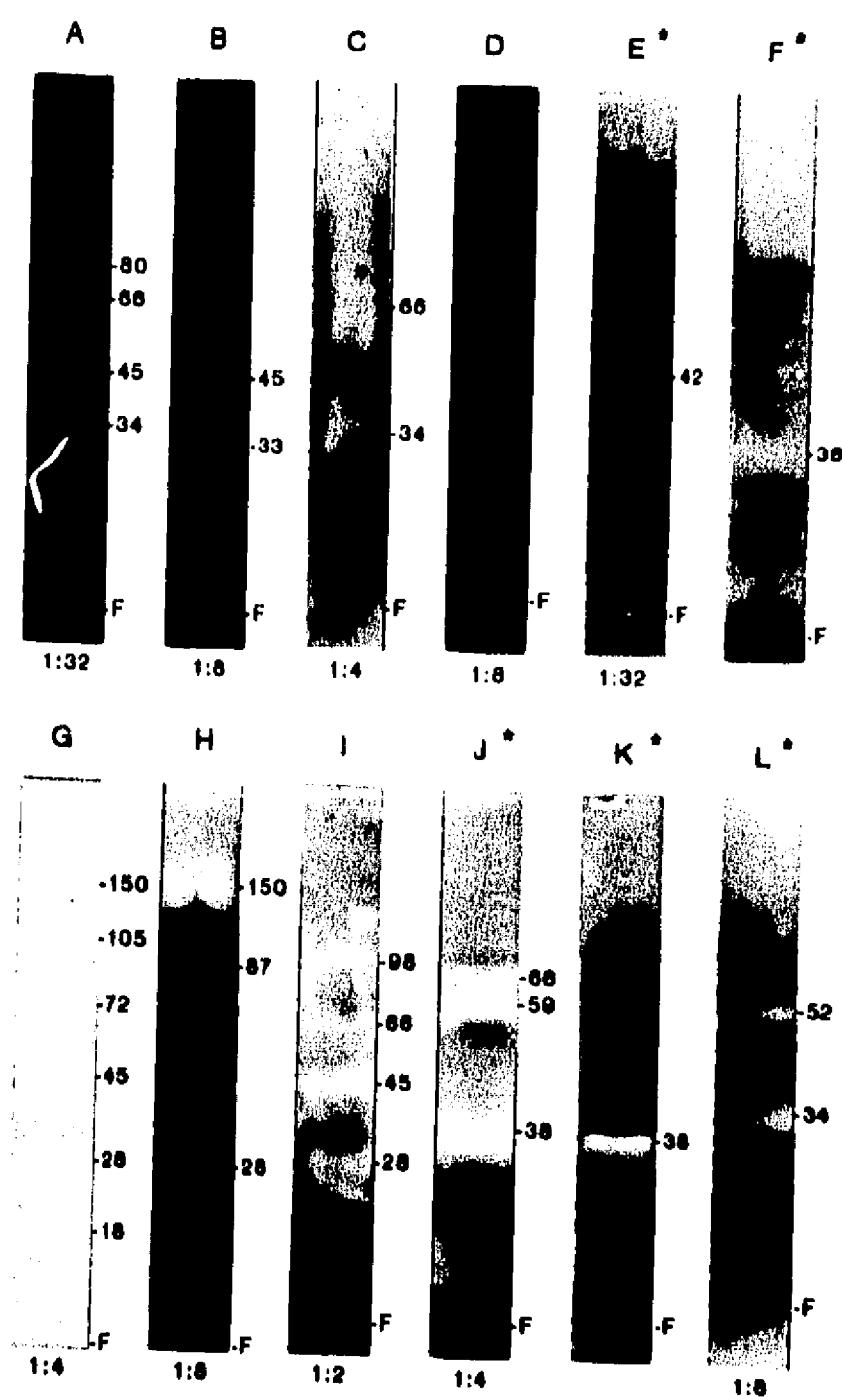
Los ensayos con el inhibidor universal  $\alpha$ -2m, ocasionaron inhibiciones entre el 67.84% al 73.80%, sin diferencias significativas entre los cuatro grupos, y con ambos substratos (gelatina y polvo azul de cuero).

Con la finalidad de investigar si la mezcla de inhibidores de las clases catalíticas de serina, cisteína y metaloproteasas tenía un efecto inhibitorio aditivo, se realizó un ensayo de inhibición con la mezcla de Aprotinina, PHMB y EDTA a la concentración inhibitoria que se emplea en forma individual. Los resultados mostraron una inhibición aproximada del 85%, sin una diferencia significativa entre los grupos.

**Electroforesis en gel/substrato.** Es importante mencionar que el corrimiento de la electroforesis en condiciones reductoras con el 2-mercaptoetanol, permitió observar una mayor actividad proteolítica y reproducibilidad de los resultados que en condiciones no reductoras. Mientras que los zimogramas correspondientes a geles incubados con Tritón X-100, mostraron un número menor de bandas proteolíticas y de menor intensidad que los geles no incubados con este agente. En todos los zimogramas se realizaron diferentes diluciones de las muestras, desde 1:1 hasta 1:64.

Algunos de los extractos de tejidos cervicales provenientes de mujeres normales, produjeron en los zimogramas hasta cuatro zonas líticas (Figura 1), de las cuales, las más frecuentemente encontradas correspondieron a un peso molecular de 33 kDa y 66 kDa [Carriles A y C] con una frecuencia de 50% , seguidas de dos bandas más débiles de 45 kDa y 80 kDa [Carril A] en aproximadamente el 20% de las muestras. En otras muestras del mismo grupo, se apreciaron tres, dos, una e incluso ninguna zona lítica [Carril D], pero en todos los casos, el peso molecular de las mismas correspondió a alguna de las cuatro mencionadas.

**Figura 1. Zimogramas representativos correspondientes a extractos de tejidos normales, lesiones precursoras y carcinomas invasores del cervix uterino. Tejidos normales (carriles A, C, D), LIEGB (carriles B, E, F), LIEGA (carriles H, I), Ca Inv (carriles G, J, K). Los números indicados a la derecha de cada carril expresan el peso molecular de las bandas proteolíticas en kDa. La dilución de las muestras está señalada en la parte inferior del carril. El frente del colorante es F.**



Por su parte, en los zimogramas de las muestras de LIEGB, también se observaron hasta cuatro diferentes zonas de lisis, siendo las más frecuentes las de 33 kDa y 45 kDa con una frecuencia del 50% [Carril B], seguida de una de 66 KDa (30%) y otra de 38 KDa con 20% de frecuencia [Carril F].

En cambio los zimogramas correspondientes a las muestras de LIEGA, produjeron seis diferentes actividades, de las cuales la más frecuente fué una banda con un peso molecular aproximado de 28 kDa que se observó en el 50% de las muestras [Carriles H, I], seguida con un 20% de frecuencia de las siguientes bandas: 150 kDa [Carril H], 45 kDa [Carril I], 66 kDa [Carril I] y con un 10% : 87 kDa [Carril H] y 98 kDa [Carril I].

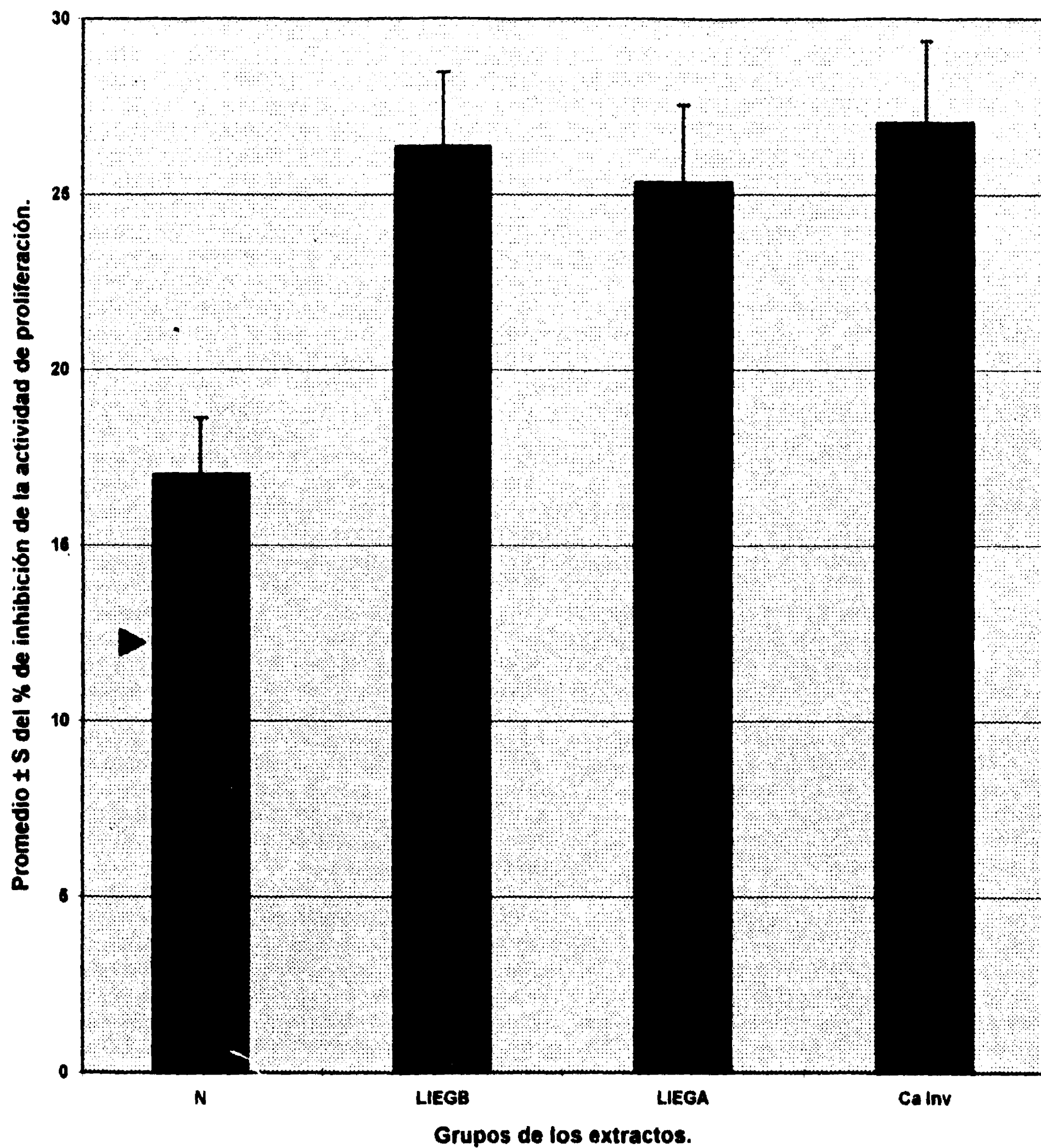
Finalmente, los extractos de los carcinomas invasores produjeron hasta 10 bandas diferentes. La más frecuente fue una de aproximadamente 45 kDa que se observó en el 50% de las muestras [Carril G], seguida en un 30% por: 28 kDa [Carril G], 34 kDa [Carril L], 38 kDa [Carriles J, K], 52 kDa [Carril L], 66 kDa [Carril J], 72 kDa [Carril G]; con 20% de frecuencia: 105 kDa [Carril G], 150 kDa [Carril G] y con una frecuencia del 10%: 18 kDa [Carril G] y 59 kDa [Carril J].

En general, las bandas proteolíticas producidas por extractos de carcinomas invasores o LIEGA, fueron más prominentes y definidas que las correspondientes a los tejidos normales y LIEGB.

**Proliferación de linfocitos normales estimulados con mitógeno.** Con la finalidad de investigar si las proteasas presentes en los extractos de las muestras de tumores invasores y lesiones precursoras del cervix, afectan la respuesta inmune celular, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos normales estimulados con fitohemaglutinina. La concentración de 2.5 µg/ ml de fitohemaglutinina, resultó ser la concentración óptima en los ensayos de proliferación, con un promedio de actividad de proliferación de  $16.22 \pm$  una desviación estándar de 2.58. No se encontraron diferencias en el porcentaje de inhibición de la proliferación celular entre los extractos invasores y lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo y alto, sin embargo los porcentajes de inhibición de estos tres grupos fueron significativamente mayores que la ocasionada por los extractos normales (Figura 2) con una  $p < 0.017$  (U de Mann-Whitney). Con el objeto de estudiar si en la inhibición de la respuesta proliferativa participaron enzimas proteolíticas, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos en presencia de los extractos e inhibidores de las clases catalíticas de

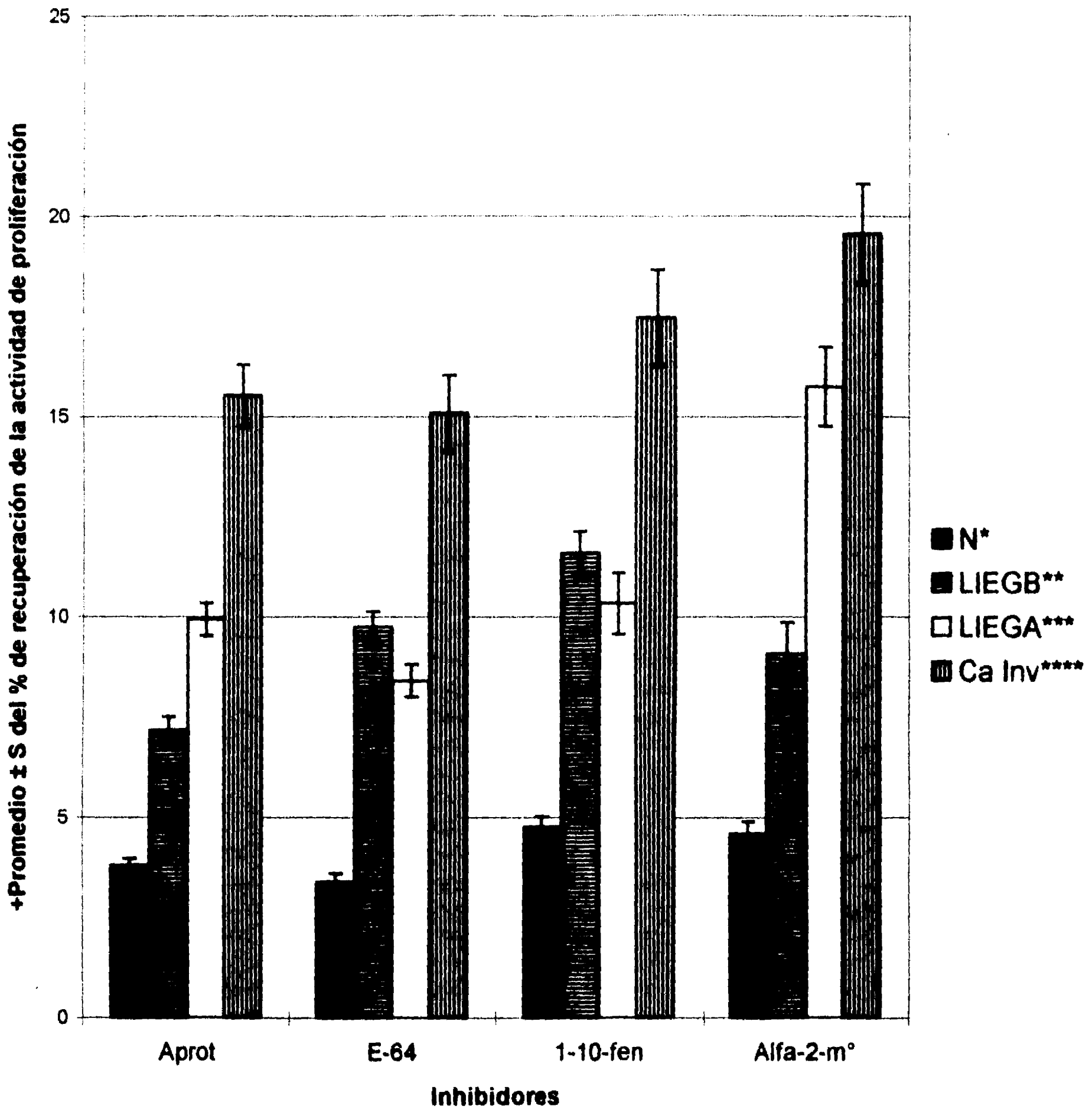
endopeptidasas. Los resultados mostraron que en el caso de los extractos normales se incrementó en menos de un 5% la actividad de proliferación en respuesta a la aprotinina, E-64, o 1-10-fenantrolina. En tanto en el caso de las LIEGB y LIEGA se observaron recuperaciones entre el 7.16% al 11,59% con los mismos inhibidores. Mientras que en los extractos invasores se observaron recuperaciones que fluctuaron entre el 15.08% y 17.47% con los mismos inhibidores (Figura 3). El mismo fenómeno se observó cuando se empleó a la  $\alpha$ -2-m como inhibidor. Finalmente, con el propósito de fundamentar los hallazgos anteriores, se estudió el efecto de enzimas purificadas como la tripsina y la colagenasa en la respuesta de proliferación de linfocitos normales estimulados con fitohemaglutinina, observándose una disminución importante de la actividad de proliferación, misma que se recuperó casi en un 100% con la aprotinina en los ensayos con tripsina (Figura 4) y parcialmente con la 1-10-fenantrolina en los ensayos con colagenasa (Figura 5).

**Figura 2. Inhibición de la proliferación de linfocitos normales en presencia de extractos de carcinomas invasores y lesiones precursoras del cervix uterino.**



Actividad de proliferación = absorbancia a 570 nm de CLE-FHA/CLNE-FHA X100.  $p < 0.05$

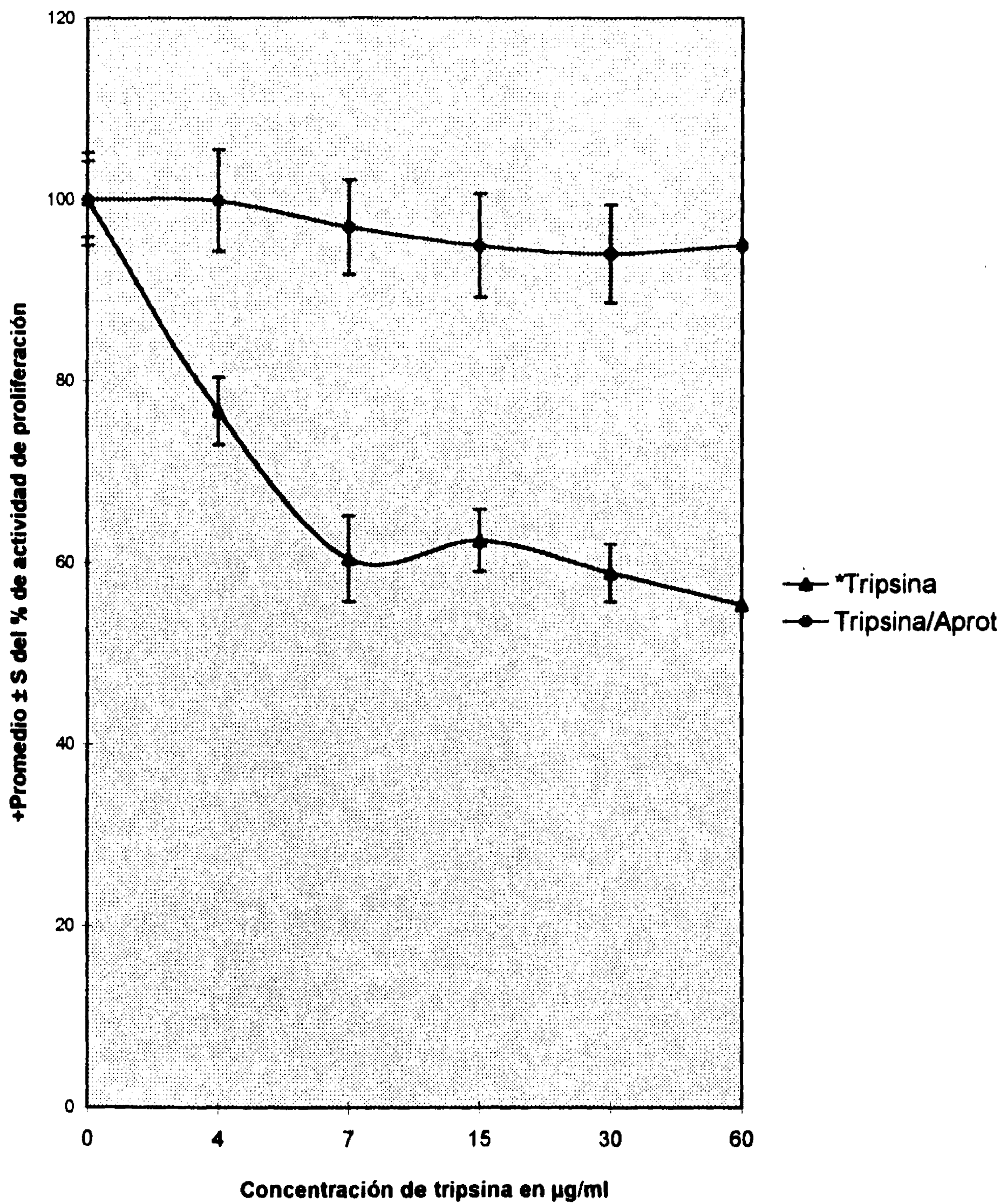
**Figura 3. Recuperación de la actividad de proliferación de linfocitos normales en presencia de inhibidores de endopeptidasas y extractos de tumores invasores y lesiones precursoras del cervix uterino.**



+ = diferencia del % de actividad de proliferación en presencia de inhibidor y extracto - extracto. Ensayo sin inhibidor y sin extracto = 100%. \* p vs \*\*, \*\*\* p < 0.01, vs \*\*\*\* p < 0.001. \* vs \*\*\*\* p < 0.05.

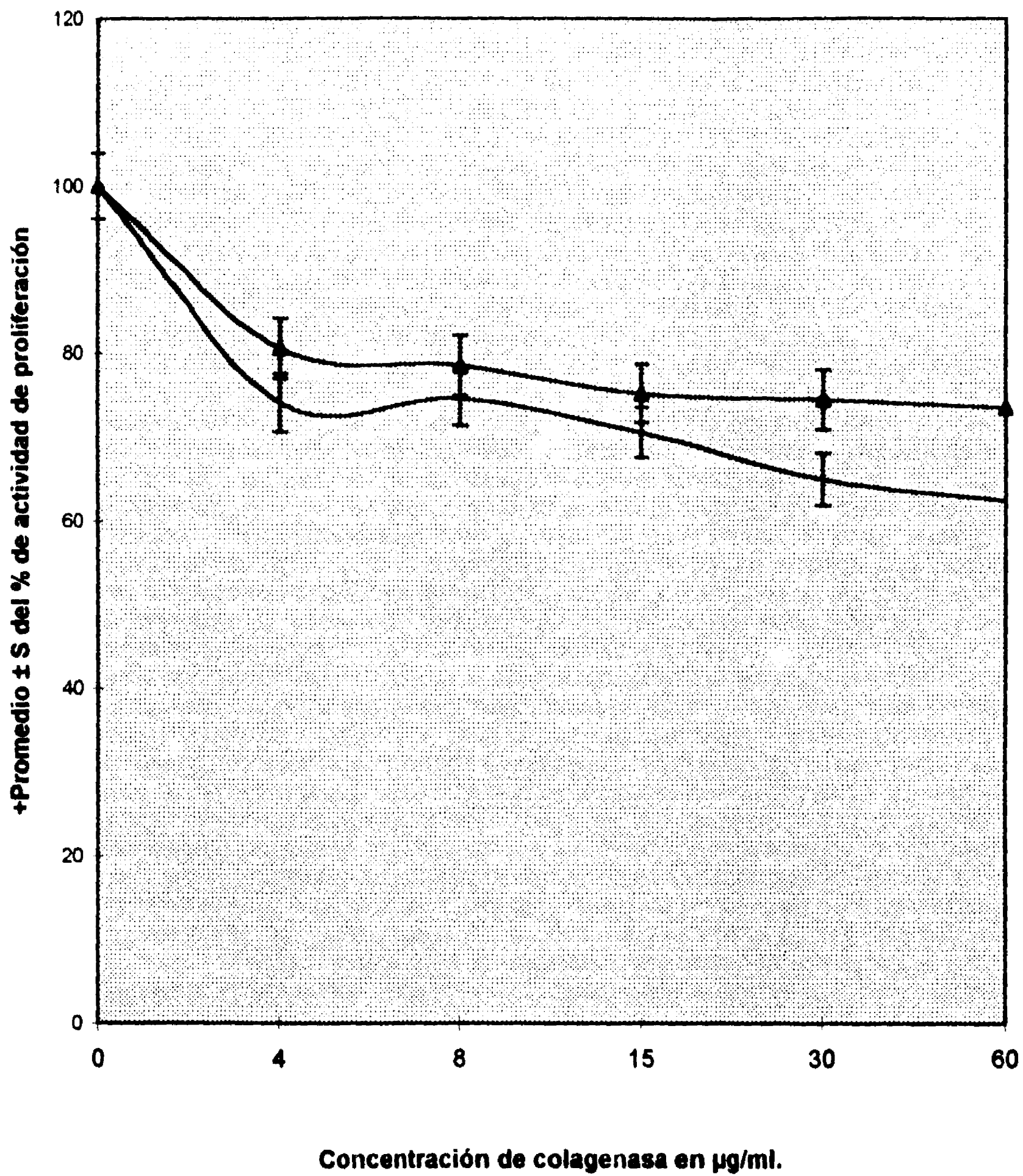


**Figura 4. Inhibición de la actividad de proliferación de linfocitos normales mediante tripsina y su recuperación con aprotinina.**



+ 100% de actividad de proliferación = Actividad de proliferación sin tripsina ni aprotinina (100 µg/ml). \* p < 0.001, 3,7 µg/ml de tripsina p < 0.01.

**Figura 5. Inhibición de la actividad de proliferación de linfocitos normales mediante colagenasa y su recuperación parcial con 1-10-fenantrolina.**



+ 100 % de actividad de proliferación = Actividad de proliferación en ausencia de colagenasa y 1-10 fen.\* p < 0.05 (30 µg/ml), p < 0.01 (60 µg/ml).

— \*Colagenasa —▲— Colagenasa/1-10-fen

## DISCUSION

Los resultados mostraron que la actividad proteolítica presente en los extractos de los tejidos estudiados, aumenta conforme progresan las lesiones intraepiteliales escamosas dentro de la historia natural del cáncer del cervix uterino: tejidos normales del cervix, LIEGB, LIEGA y finalmente carcinomas invasores. Los resultados fueron consistentes con los tres substratos estudiados, aunque con el polvo azul de cuero, las diferencias entre los extractos de carcinomas invasores y el resto de los grupos fue más clara, particularmente si se comparan con los tejidos normales, donde se aprecia una actividad 6.6 veces menor en relación a los extractos de los carcinomas invasores en los ensayos con polvo azul de cuero, contra 2.9 y 2.1 veces menor actividad con el péptido DNP-III y gelatina como substratos respectivamente. Estas diferencias entre los substratos podrían explicarse en el sentido de que el polvo azul de cuero es un substrato más amplio que permite su degradación por un número mayor de proteasas de clases catalíticas distintas que la gelatina y el péptido sintético.

Por su parte, los ensayos de inhibición indican que la clase catalítica de proteinasas predominante en todos los extractos de los grupos estudiados, correspondió a las metaloproteiniasas. Este hallazgo no es sorprendente, ya que se ha descrito en la literatura la importancia de algunas enzimas que pertenecen a esta clase catalítica en los procesos de remodelación tisular, tales como la involución del útero después del parto, la menstruación y otras respuestas fisiológicas que ocurren en este órgano (103, 104).

El motivo por el cual el fosforamidón no inhibió la actividad proteolítica de los extractos estudiados, parece ser debido a que este agente es un inhibidor eficiente de metaloproteiniasas de origen bacteriano, pero solamente de un número reducido de origen mamífero (105). Es importante señalar que también se observó una discreta inhibición de la actividad proteolítica con los inhibidores de la clase catalítica de cisteína, serina y ácido aspártico, sin diferencias significativas entre los grupos, con la excepción de un porcentaje de inhibición mayor al PHMB en los extractos de carcinomas invasores. En su conjunto los resultados sugieren que existe un aumento global en las cuatro clases catalíticas de proteinasas, al comparar tanto los estudios de actividad como los de inhibición, pero con un predominio de metaloproteiniasas en todos los grupos. Estos resultados contrastan con lo publicado por Benítez-Bribiésca y colaboradores (83), en el sentido de un

importante incremento de la catepsina B en los tumores invasores. Sin embargo, es importante resaltar que en el estudio mencionado, solamente investigaron líquido vaginal y suero, lo cual no asegura que el contenido enzimático de estos fluidos sea un reflejo de lo que sucede en los tejidos correspondientes, donde se efectúan los procesos de invasión y metástasis. Además, estos autores tampoco realizaron un estudio con inhibidores de las cuatro clases catalíticas de endopeptidasas. Por otro lado, tal como se señaló anteriormente, el substrato que empleó para la cuantificación de la actividad de la catepsina B, en la actualidad no se considera exclusivo para esta enzima, pudiendo ser degradado por enzimas de otras clases catalíticas.

Los resultados de los ensayos colorimétricos, fueron apoyados por los hallazgos encontrados en las electroforesis en gel/substrato, que mostraron un aumento en el número de bandas proteolíticas directamente relacionadas al progreso en la historia natural del cáncer del cervix uterino.

Un aspecto notable de este trabajo, se refiere a las bandas proteolíticas de 72 kDa y 52 kDa que se identificaron en el 30% de los extractos provenientes de tumores invasores y por otro lado la banda de 150 kDa que también se observó en extractos de LIEGA. Desconocemos la identidad y el papel de estas enzimas, sin embargo, por el hecho de que las dos primeras fueron identificadas solamente en los tumores invasores, sugiere que pudieran estar involucradas en los procesos de invasión. Para resolver estas interrogantes, en la actualidad se está trabajando en un proyecto que contempla la identificación de estas enzimas con métodos inmunológicos, tales como las réplicas tipo Western, inmunohistoquímica y ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos monoclonales.

Los conceptos recientes en relación al papel de las proteinasas en los procesos de invasión y metástasis, establece que la degradación de los diferentes componentes de la matriz extracelular, requiere la participación compleja de un grupo de enzimas proteolíticas, dentro de las cuales el activador del plasminógeno y las metaloproteiniasas parecen involucradas en la invasión de un número importante de tumores experimentales y de origen humano, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (37). En relación a los activadores del plasminógeno, se han descrito diferentes pesos moleculares, dependiendo si son del tipo tisular (70 kDa) o tipo urocinasa que es el que se asocia a los procesos de invasión, con un rango de peso molecular que va desde 40 kDa hasta 70 kDa (106, 107). Por otro lado, las metaloproteiniasas que se han

involucrado en los procesos de invasión y metástasis de otros tumores son las colagenasas tipo IV de 72 kDa y 92 kDa que para activarse, requieren la liberación de un fragmento de 6 a 10 kDa (108, 109). Sin embargo, también se han descrito colagenasas tipo IV de alto peso molecular a partir de tejidos provenientes de carcinomas humanos (110). La estromelisina y otras metaloproteinasas de diferentes pesos moleculares, también se han implicado en los procesos de invasión tumoral (38). En este caso, desconocemos la relación de todas estas enzimas, con las bandas proteolíticas que se observaron a partir de los extractos estudiados en este trabajo.

El panorama se complica un tanto más, debido a la presencia de inhibidores tales como los inhibidores del activador del plasminógeno (IAP-1 e IAP-2)) y los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP-1, TIMP-2) y otra serie de inhibidores como las serpinas entre otros, que con frecuencia se encuentran asociados a las enzimas proteolíticas en formas de complejos de diferentes pesos moleculares (111). Nuestros resultados son consistentes con la formación de dichos complejos, lo anterior apoyado por la observación técnica de la necesidad de preparar diluciones para detectar en forma más adecuada, las bandas proteolíticas. En este aspecto, actualmente se está iniciando otro estudio que busca valorar a los inhibidores de los activadores del plasminógeno en las diferentes etapas del cáncer cervical.

En este trabajo se decidió investigar el efecto de las enzimas proteolíticas presentes en los extractos de los tumores invasores y lesiones precursoras del cervix uterino, debido a la importancia que tiene el sistema inmune en el destino final de los tumores malignos, y por el hecho de que las enzimas proteolítica afectan diferentes sistemas biológicos, incluyendo antígenos y proteínas de superficie de membrana. El método del MTT resultó adecuado para los ensayos de proliferación de linfocitos en presencia de la fitohemaglutinina, con coeficientes de variación menores al 8%, teniendo un especial cuidado en el pH del amortiguador de extracción que debe estar entre 4.5 y 4.8. Estos estudios revelaron que tanto los extractos de los tumores invasores, como de las LIEGA y LIEGB, ocasionaron una inhibición aproximada entre el 25.35% y el 27.04% contra un 17.01% de promedio de inhibición por los extractos de los tejidos normales, lo anterior sugiere que los extractos mencionados contienen actividad supresora mayor en las lesiones precursoras y tumores invasores. Se desconoce el o los elementos responsables de esta actividad, sin embargo los estudios en presencia de inhibidores de la clase catalítica de proteinasas o con el inhibidor universal  $\alpha$ -2-m, apuntan

a que parcialmente esta actividad pudiera estar mediada por proteinasas. Lo anterior se refuerza por los experimentos con enzimas purificadas, en lugar de los extractos, donde se aprecia una inhibición a mayor dosis, que se recupera en cerca del 100% con la aprotinina, en los ensayos con tripsina y parcialmente con la 1-10-fenantrolina en los ensayos de la colagenasa. Definitivamente, no se puede descartar la participación de otros factores supresores, presentes en los extractos estudiados, que pudieran ser realmente los responsables de la inhibición de la actividad proliferativa, tales como el factor de crecimiento transformante beta, IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN-gama y la prostaglandina E2 entre otros (87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94). Sin embargo resulta interesante proponer que muchas de las acciones de supresión pudieran estar mediadas por proteasas, lo cual de demostrarse aclararía las interrogantes en relación a los factores supresores descritos en tumores y otras entidades patológicas. A raíz de los procedimientos de inmunoterapia con células infiltrantes e interleucina-2, se ha descrito el efecto de algunas enzimas como la colagenasa/ADNasa en la disminución de la expresión de marcadores de superficie como el CD4, CD8, CD14, CD16, y CD56, que son importantes en la respuesta inmunológica por parte de los linfocitos y macrófagos, aunque en gran parte este efecto se atribuyó a otras proteasas contaminantes con actividad de proteasa de serina (112). Finalmente, consistente con los hallazgos de este trabajo de tesis, se ha reportado que complejos tripsina/  $\alpha$ -2-m, disminuyen la actividad proliferativa de linfocitos normales en una forma dosis dependiente (113).

En conclusión, se encontró por un lado una correlación directa entre la historia natural de cáncer del cervix uterino y el grado de actividad proteolítica presente en las correspondientes muestras. Estos hallazgos no se habían publicado con anterioridad en muestras de tejidos provenientes de carcinomas invasores del cervix y lesiones precursoras. Se requiere por un lado un estudio más profundo, particularmente dirigido a la identificación de las bandas proteolíticas descritas en este trabajo, y su papel en los procesos de invasión, y por otro lado a la investigación del papel de los virus del papiloma humano en el incremento en la actividad proteolítica de las lesiones precursoras al cáncer invasor cervical. Así mismo, se describió el efecto supresor sobre la actividad proliferativa de linfocitos normales, por parte de los extractos, principalmente de la lesiones precursoras y tumores invasores, que parcialmente se recupera mediante la adición de inhibidores de endopeptidasas, en conjunto con los estudios de enzimas purificadas, se abre la perspectiva de estudiar el papel de las proteinasas en la supresión de la respuesta inmune de pacientes portadores de tumores.

## **PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES**

Los resultados de este trabajo de tesis generan una serie de perspectivas, primero las relacionadas con la identificación de las enzimas proteolíticas que se observaron en cada una de las etapas de la historia natural del cáncer cervical, para tal efecto se pueden emplear dos diferentes estrategias, una que implica el uso de anticuerpos monoclonales ya sea en estudios inmunohistoquímicos, inmunoenzimáticos o réplicas tipo Western, cada uno de estos ensayos ofrece ventajas y limitaciones, por ejemplo los primeros permiten reconocer en la estructura tisular la localización de las enzimas, mientras que el segundo puede ser un método cuantitativo y el tercero nos muestra propiedades tales como la masa molecular de las enzimas. La otra estrategia requiere de la biología molecular para analizar la expresión y regulación de los genes que codifican para las distintas proteasas implicadas en los procesos de invasión y metástasis, resultaría interesante con esta metodología estudiar y efectuar una correlación con la infección con los tipos oncogénicos del virus del papiloma humano. Estas mismas estrategias se pueden emplear para el estudio de los inhibidores naturales que en forma análoga con las proteasas, permitirían realizar asociaciones y correlaciones con aspectos clínicos de pronóstico y respuesta al tratamiento. Sin embargo para completar el estudio acerca del papel de las enzimas y sus inhibidores en los procesos de invasión y metástasis, es deseable la realización de estudios de invasión *in vitro* con líneas de tumores cervicales y ensayos con inhibidores para demostrar un efecto directo. No menos importante, es la perspectiva de estudiar con más detalle el efecto de las proteinasas y sus inhibidores en la respuesta inmunológica, primero confirmar los resultados de este trabajo con otros ensayos inmunológicos, segundo disecar con más detalle la etapa, las células y las moléculas que son afectadas por las enzimas y tercero purificar los extractos para evitar el efecto de otros componentes. Los estudios propuestos aportarían un mejor conocimiento a la biología del cáncer del cervix uterino, y probables aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del tumor maligno más frecuente en la mujer Mexicana.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Registro Nacional de Cáncer, D.G.E./ Secretaría de salud. México, 1989.
- 2.- Ambros R.A., Kurman R.J.: Current concepts in the relationships of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous squamous lesions of the uterine cervix. *Seminars in diagnostic Pathology*, 1990; 7: 158-172.
- 3.- Brinton L.A., Fraumeni J.F.: Epidemiology of uterine cervical cancer. *J. Chronic. Dis.* 1986; 39: 1051-1065.
- 4.- Brinton L.A., Hamman R.F., Huggins G.R., Lehman H.F., Levine R.S., Mallin K., Fraumeni J.F.: Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1987; 79: 23-30.
- 5.- Pater M.M., Dunnes J., Hogan J., y cols.: Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology*. 1986; 155: 13-18.
- 6.- Crum C.P., Ikenberg H., Richart R.M., Gissman L.: Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310: 880-888.
- 7.- Reid R., Greenberg M., Jenson B.: Sexually transmitted papillomavirus infections. I. The anatomical distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1987; 156: 216-222.
- 8.- Tsunokawa Y., Takebe N., Nozawa S., y cols.: Presence of human papillomavirus type 16 and 18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. *Int. J. Cancer.* 1986; 37: 499-503.
- 9.- Dyson N., Howley P.M., Munger K., Harlow E.: The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243: 934-937.
- 10.- Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M.: Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248: 76-79.
- 11.- Brinton L.A., Schairer C., Haenzel W., y cols.: Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *J.A.M.A.* 1986; 255:3265-3269.
- 12.- Brinton L.A., Huggins G.R., Lehman H.F., y cols.: Long term use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 1989; 43:511-518.
- 13.- La Vecchia C., Franceschi S., Decarli A., y cols.: Dietary vitamin A and the risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 1984; 34:319-322.
- 14.- Rommey S.L., Dutttagupta C., Basu J., y cols.: Plasma vitamin C and the uterine cervical dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1985; 151:976-980.
- 15.- Butterworth C.E., Hatch K.D., Gore H., y cols.: Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982; 35: 73-82.
- 16.- Sillman F.S., Stanek A., Sedlis A., y cols.: The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984; 150:300-308.



- 17.- Henry M.J., Stanley M.W., Cruikshank S., Carson L.F.: Association of human immunodeficiency virus-induced immunosuppression with human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989;160:352-353.
18. Liotta, L.A. and W.G. Stetler-Stevenson. Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. En *Cancer principles and practice of oncology*, 3ra ed, De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. eds. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989 : p. 98-115.
19. Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991. 64: p. 327-336.
20. Fidler, I.J. and N. G.J., The process of cancer invasion and metastasis. *Cancer Bull.* 1987. 39: p. 126-131.
21. Chambers, A.F. and A.B. Tuck, *Ras*-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncog*, 1993. 4(2): p. 95-114.
22. Koda, Y., et al., Expression of Nm23 H-1 RNA Levels in Human Gastric Cancer Tissues - A Negative Correlation with Nodal Metastasis. *Cancer*, 1994. 73(2): p. 259-265.
23. Mandai, M., et al., Expression of Metastasis-Related nm23-H1 and nm23-H2 Genes in Ovarian Carcinomas - Correlation with Clinicopathology, EGFR, c-erbB-2, and c-erbB-3 Genes, and Sex Steroid Receptor Expression. *Cancer Res*, 1994. 54(7): p. 1825-1830.
24. MacDonald, N.J., et al., A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem*, 1993. 268(34): p. 25780-25789.
25. Garrido, F., et al., Natural history of HLA expression during tumour development.. *Immunol Today*, 1993. 14(10): p. 491-499.
26. Fidler, I.J. and I.R. Hart, Biologic diversity in metastatic neoplasms-origins and implications. *Science*, 1982. 217: p. 998-1001.
27. Yurchenco, P.D. and J.C. Schittny, Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*, 1990. 4: p. 1577-1590.
28. Van Der Rest, M. and R. Garrone, Collagen family of proteins. *FASEB J*, 1991. 5: p. 2814-2823.
29. Weidner, N., Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol*, 1993. 10(4): p. 302-313.
30. Moscatelli, D. and D.B. Rifkin. Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 948: p. 67-85.
31. Heino, J., Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation. *Annals of Medicine*, 1993. 25(4): p. 335-342.
32. Juliano, R.L. and J.A. Varner, Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. 5(5): p. 812-818.
33. Juliano, R.L., The role of beta 1 integrins in tumors. *Semin Cancer Biol*, 1993. 4(5): p. 277-283.
34. Takeichi, M., Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. 5(5): p. 806-811.

35. McCarthy, J.B.. Human fibronectin contains distinct adhesion-and motility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *J Cell Biol*, 1986. 102: p. 179-188.
36. Wewer, U.M., et al., Role of laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Res*, 1987. 47: p. 5691-5698.
37. Mignatti, P. and D.B. Rifkin, Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Rev*, 1993. 73(1): p. 161-195.
38. Schmitt, M., F. Janicke, and H. Graeff, Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis*, 1992. 6((Suppl 4)): p. 3-26.
39. Duffy, M.J., The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 1992. 10(3): p. 145-155.
40. Duffy, M.J., Plasminogen activators and cancer. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1990. 1(6): p. 681-687.
41. Kwaan, H.C., The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*, 1992. 11(3-4): p. 291-311.
42. de Vries, T.J., et al., Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol*, 1994. 144(1): p. 70-81.
43. Montgomery, A.M., et al., Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways. *Cancer Res*, 1993. 53(3): p. 693-700.
44. Nagayama, M., et al., Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. Low content of type 2 plasminogen activator inhibitor associated with tumor dissemination. *Cancer*, 1994. 73(5): p. 1398-1405.
45. Pedersen, H., et al., Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 1994. 54(1): p. 120-123.
46. Gris, J.C., et al., Immunohistochemical study of tumor cell-associated plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in lung carcinomas. *Chest*, 1993. 104(1): p. 8-13.
47. Reilly, D., P.A. Andreasen, and M.J. Duffy, Urokinase-plasminogen activator in breast cancer: assay by both catalytic and immunoassay. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1991. 2(1): p. 47-50.
48. Janicke, F., et al., Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. 24(3): p. 195-208.
49. Grondahl-Hansen, J., et al., High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res*, 1993. 53(11): p. 2513-2521.
50. Graeff, H., et al., Prognostic impact and clinical relevance of tumor-associated proteases in breast cancer. *Fibrinolysis*, 1992. 6((Suppl 4)): p. 45-53.
51. Bouchet, C., et al., Prognostic Value of Urokinase-Type Plasminogen Activator (Upa) and Plasminogen Activator Inhibitors Pai-1 and Pai-2 in Breast Carcinomas. *Br J Cancer*, 1994. 69(2): p. 398-405.
52. Landau, B.J., et al., Elevated Levels of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Malignant Human Brain Tumors. *Cancer Res*, 1994. 54(4): p. 1105-1108.

53. Rao, J.S., et al., Increased Levels of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Pai-1) in Human Brain Tumors. *J Neuro-Oncol*, 1993. 17(3): p. 215-221.
54. Steven, F.S., M.M. Griffin, and I.C. Talbot. GB (guanidinobenzoate) cell surface protease and serum inhibitors in colorectal neoplasia. *J Pathol*, 1992. 167: p. 19-24.
55. Steven, F.S., et al., Inhibition of a cell surface protease after cisplatin chemotherapy. *J Enzym Inhib*, 1991. 5(2): p. 151-164.
56. Poustis-Delpont, C., et al., Characterization and purification of a guanidinobenzoate: a possible marker of human renal carcinoma. *Cancer Res*, 1992. 52(13): p. 3622-3628.
57. Koivunen, E., et al., Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res*, 1991. 51: p. 2107-2112.
58. Woessner, J.F.J., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 1991. 5: p. 2145-2154.
59. Stetler-Stevenson, W.G., L.A. Liotta, and D.E.J. Kleiner, Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*, 1993. 7(15): p. 1434-1441.
60. Matrisian, L.M. and G.T. Bowden, Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin Cancer Biol*, 1990. 1(2): p. 107-115.
61. Kawami, H., et al., Stromelysin-3 mRNA expression and malignancy: comparison with clinicopathological features and type IV collagenase mRNA expression in breast tumors. *Anticancer Res*, 1993. 13(6A): p. 2319-2323.
62. Boag, A.H. and I.D. Young, Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol*, 1994. 144(3): p. 585-591.
63. Noel, A.C., et al., Coordinate enhancement of gelatinase A mRNA and activity levels in human fibroblasts in response to breast-adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, 1994. 56(3): p. 331-336.
64. Bonfil, R.D., et al., Expression of gelatinase/type IV collagenase in tumor necrosis correlates with cell detachment and tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*, 1992. 10(3): p. 211-220.
65. Sefter, R.E.B., et al., The 72 KDa type IV collagenase is modulated via differential expression of avb3 and a5b1 integrins during human melanoma cell invasion. *Cancer Res*, 1993. 53: p. 3411-3415.
66. Agarwal, C., et al., Transforming Growth Factor beta 1 Regulation of Metalloproteinase Production in Cultured Human Cervical Epithelial Cells. *Cancer Res*, 1994. 54(4): p. 943-949.
67. Mauviel, A., Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*, 1993. 53(4): p. 288-295.
68. Denhardt, D.T., et al., Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol-Ther*, 1993. 59(3): p. 329-341.
69. Murphy, A.N., E.J. Unsworth, and W.G. Stetler-Stevenson, Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*, 1993. 157(2): p. 351-358.

70. Uria, J.A., et al., Structure and Expression in Breast Tumors of Human Timp-3, a New Member of the Metalloproteinase Inhibitor Family. *Cancer Res*, 1994. 54(8): p. 2091-2094.
71. Guinec, N., V. Dalet-Fumeron, and M. Pagano, "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1993. 374(12): p. 1135-1146.
72. Boike, G., et al., A possible role for cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumour cells. *Melanoma Res*, 1992. 1(5-6): p. 333-340.
73. Visscher, D.W., et al., Clinicopathologic Significance of Cathepsin B Immunostaining in Transitional Neoplasia. *Modern Pathol*, 1994. 7(1): p. 76-81.
74. Redwood, S.M., et al., Abrogation of the invasion of human bladder tumor cells by using protease inhibitor(s). *Cancer*, 1992. 69(5): p. 1212-1219.
75. McCormick, D., Secretion of cathepsin B by human gliomas in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1993. 19(2): p. 146-151.
76. Tsushima, H., et al., Inactive cathepsin B-like enzyme in human melanoma culture medium. *Melanoma Res*, 1992. 1(5-6): p. 341-347.
77. Kobayashi, H., et al., Effects of membrane-associated cathepsin B on the activation of receptor-bound prourokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1178(1): p. 55-62.
78. Rochefort, H., F. Capony, and M. Garcia, Cathepsin D: A protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. 9(4): p. 321-331.
79. Rochefort, H., Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol*, 1992. 31(2): p. 125-130.
80. Hahnel, R., et al., Cathepsin-D in human breast cancer: correlation with vascular invasion and other clinical and histopathological characteristics. *Anticancer Res*, 1993. 13(6A): p. 2131-2135.
81. Johnson, M.D., et al., The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1993. 53(4): p. 873-877.
82. Seshadri, R., et al., The relative prognostic significance of total cathepsin D and HER-2/neu oncogene amplification in breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *Int J Cancer*, 1994. 56(1): p. 61-65.
83. Benitez-Bribiesca L, Freyre-Horta R, Gallegos-Vargas G. Protease and anti protease concentrations in serum and vaginal fluid of patients with carcinoma of the cervix. *Arch Invest Med (Mex)* 1980;11:523-549.
84. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:427-433.
85. Abbas A.K., Lichtman A. H., Pober J.S. editores. Cellular and molecular immunology, 2da edición. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1994

86. Lotze, M.T., Finn, O.J.: Recent advances in cellular immunology. Implications for immunity to cancer. *Immunol. Today*, 16: 190-193, 1990.
87. Young, M.R., Wright, M.A., Coogan, M., Young, M.E., Bagash, J.: Tumor-derived cytokines induce bone marrow suppressor cells that mediate immunosuppression through transforming factor beta. *Cancer Immunol. Immunother.*, 35: 14-18, 1992.
88. Sotomayor, E.M., Fu, Y.X., Lopez-Cepero, M., Herbert, L., Jimenez, J.J., Albarracin, C., Lopez, D.M.: Role of tumor derived cytokines on the immune system of mice bearing a mammary adenocarcinoma. II. Down-regulation of macrophage-mediated cytotoxicity by tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 147: 2816-2823, 1991.
89. Walker, T.M., Yurochko, A.D., Burger, C.J., Elgert, K.D.: Cytokines and suppressor macrophages cause tumor-bearing host CD8+ T cells to suppress recognition of allogeneic and syngeneic MHC class II molecules. *J. Leukoc. Biol.*, 52: 661-669, 1992.
90. Elg, S.A., Carson, L.F., Fowler, J.M., Twigg, L.B., Moradi, M.M., Ramakrishnan, S.: Ascites levels of haptoglobin in patients with ovarian cancer. *Cancer*, 71: 3938-3941, 1993.
91. Aso, H., Tamura, K., Yoshie, O., Nakamura, T., Kikuchi, S., Ishida, N.: Impaired NK response of cancer patients to IFN-alpha but not to IL-2: correlation with serum immunosuppressive acidic protein (IAP) and role of suppressor macrophage. *Microbiol. Immunol.*, 36: 1087-1097, 1992.
92. Bergelson, L.D.: Gangliosides and antitumor immunity. *Clinical Investigator*, 71: 590-594, 1993.
93. Abolhassani, M., Tillotson, J.K., Chang, J., Chiao, J.W.: Regulation of human lymphocyte proliferation by a tumor cell-derived DNA fraction. *Immunol. Cell Biol.*, 69: 377-385, 1991.
94. Daneri-Navarro A., Del Toro-Arreola A., García-Velazco J. C., Del Toro-Arreola S., Orbach-Arbouys S., Bravo-Cuellar A.: L-5178-Y lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 48, 1994.
95. McCoy K., Gal S., Schwartz R. H., Gottesman M.M.: An acid protease secreted by transformed cells interferes with antigen processing. *J. Cell. Biol.* 1988; 106: 1879-1884.
96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
97. Kurecki T, Kress LF, Laskowski M. Purification of human plasma  $\alpha_2$  macroglobulin and a 1 proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography. *Anal Biochem* 1979;99:415-420.
98. Avila EE, Sánchez-Garza M, Calderón J. *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: sulfhydryl-dependent proteolytic activity. *J Protozool* 1985;32:163-165.
99. Gray RD, Saneii HH. Characterization of vertebrate collagenase activity by high-performance liquid chromatography using a synthetic substrate. *Anal Biochem* 1982;120:339-346.
100. Rodwell VW. Amino acids. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed. *Harper's Biochemistry*. East Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1993: 26-31.
101. Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1987;26:87-98.

102. Bagge M., Nielsen S.E., Berg K.: Re-examination and further development of a rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunological Methods*. 1989; 119: 203-210.
103. Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154.
104. Osmer R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Szeverényi M, Kuhn W. Collagenase activity in the human cervix uteri after prostaglandin E2 application during the first trimester. *EUROBS* 1991;42:29-32.
105. Beynon RJ, Salvesen G. Commercially available protease inhibitors. In: Beynon RJ, Bond JS, ed. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Oxford: Oxford University IRL Press, 1989: 246.
106. de Bruin PAF, Griffioen G, Verspaget HW, et al. Plasminogen activator profiles in neoplastic tissues of the human colon. *Cancer Res* 1988;48:4520-4524.
107. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochem* 1980;102:196-202.
108. Davies B, Miles DW, Haperfield LC, et al. Activity of type-IV collagenases in benign and malignant breast diseases. *British J Cancer* 1993;67:1126-1131.
109. Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Gatter KC, Carmichael J. Association between expression of activated 72-Kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:574-578.
110. Tsuda TT, Kodama A, Yamamura M, Matzukaki S, Tsuda M. Isolation and characterization of a high molecular weight type-IV collagenase isolated from human carcinoma tissue. *FEBS Letters* 1993;319:35-39.
111. Sier SFM, Verspaget HW, Griffioen G, et al. Imbalance of plasminogen activators and their inhibitors in human colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 1991;101:1522-1528.
112. Mulder, W.M., et al., Reduced expression of distinct T-cell CD molecules by collagenase/DNase treatment. *Cancer Immunol Immunother*, 1994. 38(4): p. 253-258.
113. Mannhalter, J.W., W. Borth, and M.M. Eibl. Modulation of antigen-induced T cell proliferation by alpha 2M-trypsin complexes. *J Immunol*, 1986. 136(8): p. 2792-2799.

**ANEXOS**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

# BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Editor in Chief : Georges Mathé (Hôpital Suisse, Issy-les-Moulinesaux, France)  
Editors : David Machover & Haim Tapiero (Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France)

Dr Adrian Daneri-Navarro  
Instituto de Patologia Infecciosa y  
Experimental  
« Dr Francisco Ruiz Sanchez »  
A.P. 2-797, C.P. 44280  
Guadalajara, Jalisco  
Mexico

February 3, 1995

Re : MS n° 94-102 - **Proteolytic activity in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions**

Dear Dr Daneri-Navarro,

Thank you for your recent submission of the above manuscript. I am pleased to inform you that it has been accepted for publication in **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**. I anticipate the appearance of this paper in n° 5 issue (next May).

You should hear directly from the publisher in a not too distant future. Of course, should you have other manuscripts or have colleagues who wish to submit manuscripts I would like to emphasize that the journal is in need of continued submission of quality manuscripts.

Sincerely yours

P/ Haim Tapiero

Editor

Editorial office : MC Feuillet, Hôpital Paul Brousse  
14 avenue Paul-Vaillant-Couturier - 94800 VILLEJUIF, France  
tel : (33-1) 47 26 78 71 - Fax : (33-1) 47 26 80 97

FALLA DE ORIGEN



**PROTEOLYTIC ACTIVITY IN EXTRACTS OF INVASIVE CERVICAL CARCINOMA  
AND PRECURSOR LESIONS. <sup>1</sup>**

ADRIAN DANERI-NAVARRO <sup>2, 3</sup>, SUSANA DEL TORO-ARREOLA <sup>3</sup>, ALEJANDRO BRAVO-  
CUELLAR <sup>4</sup>, NALLELY CABRERA <sup>5</sup>, SIMONE ORBACH-ARBOUYS <sup>6</sup>, RUY PEREZ-MONTFORT <sup>5</sup>

<sup>3</sup> Instituto de Patología Infecciosa y Experimental, "Dr. Fco. Ruíz Sánchez",  
Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 2-797, 44280, Guadalajara,  
Jalisco, México. <sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS,  
Guadalajara Jalisco, México. <sup>5</sup> Departamento de Microbiología, Instituto de  
Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal  
70242, 04510 México D.F., México. <sup>6</sup> ICIG Hôpital Paul Brousse, Villejuif,  
France.

<sup>1</sup> Supported by grant from CONACYT (D0557-M9201) to ADRIAN DANERI-NAVARRO.

<sup>2</sup> To whom proofs should be sent.

Key words: Cervical carcinoma, proteinases, metalloproteinases, inhibitor,  
substrate gel electrophoresis

Abbreviated running title: Proteinases in Cervical Carcinoma

**ABSTRACT**

In this preliminary report, we showed that proteolytic activity of extracts from 85 cervical samples of patients with normal cervix, low and high-grade squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma, increased according to the natural history of the cervical cancer when measured with three different substrates. Inhibitor assays for four different catalytic classes of endopeptidases indicated that the predominant catalytic class in extracts of all groups was that of metalloproteinases. Substrate gel electrophoresis revealed that invasive carcinoma extracts had two bands with proteolytic activity (with  $M_r$  of 72 and 52 kDa) which were not present in normal tissue or biopsies with precursor lesions. Immunological and molecular characterization of these bands may provide information relevant to cervical cancer biology and clinical applications.

### INTRODUCTION

Metastasis is a complex multi-step process in which proteolytic degradation plays an important role (1, 2). The ability of proteases to digest extra cellular matrix components, provides a clue for the contribution of these enzymes to tumor invasion and metastasis (3). It is now clear that the role of proteases in these processes is complex and probably requires the cooperation of different enzymes. Furthermore, an imbalance between protease positive regulation and its negative control, by natural inhibitors, have also been implicated (4).

Distinct catalytic classes of proteinases have been recognized as important mediators of invasion and metastasis; examples include metalloproteinases such as type IV collagenases (5) and stromelysins (6), serine-dependent proteinases including urokinase type plasminogen activators (7), tumor-associated trypsin (8) and guanidinobenzoatase (9), cysteine-dependent proteinases such as cathepsin B (10), and aspartyl-dependent proteinases like cathepsin D (11).

Squamous invasive cervical carcinoma is the most frequent malignant tumor in Mexico. This tumor arises in a step-wise manner from precursor squamous intraepithelial lesions. We thought that a study of the proteolytic enzymes produced by these different stages might yield interesting results and correlation's. In the only previous study known to us, Benitez-Bribiesca et al. reported an increase of cathepsin B in vaginal fluid and serum in patients with invasive carcinoma (12). This study was based exclusively on

the use of substrates assumed to be specific for this enzyme, and the ambiguity of this supposition has been proven on repeated occasions, for example in some studies the N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine- $\beta$ -naphthylamide (BANA) has been considered as a trypsin substrate (13). Also, their study did not accomplish a systematic search of the catalytic classes of proteinases present in tumors or in normal tissues.

We report the results of a study of proteolytic activity in invasive cervical carcinoma and precursor lesion samples, using three different substrates and inhibitors of catalytic classes of endopeptidases. We also describe the number of proteases and their apparent molecular mass  $M_r$  as determined by substrate gel electrophoresis.

## MATERIALS AND METHODS

**Tissue Specimens.** Tissue samples were collected from all women by biopsies or surgical resection, after initial cytological studies. The subjects of this study were 30 cases with invasive cervical cancer (Inv Ca), 30 cases with High Grade Squamous Intraepithelial Lesions (HGSIL), 30 cases with Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LGSIL) and 30 control women, attending the Oncology or Gynecology Services at the Hospital Civil de Guadalajara, Mexico (mean age was similar in all groups ranging from 25 to 65 years). Diagnosis was made in accordance with "The 1988 Bethesda System for Reporting Cytological Diagnosis of Squamous Cell Abnormalities" (14). Two different pathologists evaluated adjacent fragments for all specimens, confirming the nature of the tissues. After removing necrotic and bloody areas, the samples were frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until extraction procedures.

**Tissue Extraction.** Extracts were prepared from 100-150 mg (wet weight) tissue samples. The specimens were homogenized in a High-Speed Mixer-Homogenizer (Polytron PT 3000, Kinematica AG., Brinkmann, Switzerland) for 5 minutes at 15,000 rpm, in 4 ml of 0.15 M NaCl at  $4^{\circ}\text{C}$ . After three freeze-thaw cycles the homogenate of each sample was sonicated (Sonic Dismembrator Brand, USA) two times at 21 kilocycles per second for one minute with a setting of 40 at  $4^{\circ}\text{C}$ . The homogenate was centrifuged at  $8,000 \times g$  for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatant was divided in aliquots and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Protein concentration of the extracts was determined according to Bradford (15).

**Alpha-2-macroglobulin.** Alpha-2-macroglobulin ( $\alpha_2\text{m}$ ) was purified as described by Kurecki et al (16) from fresh human plasma supplied by the Blood Bank of Hospital Pedro Loza S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco.

**Assay with hide powder azure.** Proteolysis of hide powder azure (Calbiochem, La Joya CA) was determined by measuring the absorbance of color released from 5 mg of the solid and insoluble substrate as described (17). Briefly, 10  $\mu\text{l}$  of the extract, pre incubated at 4°C for 60 minutes with one of the inhibitors (all from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO): 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 100  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin (Aprot), 2  $\mu\text{M}$  trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64), 1 mM p-hydroxymercuribenzoate (PHMB), 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM 1,10-phenanthroline (1-10-Phen), 5  $\mu\text{M}$  phosphoramidon (Phosphon), in 1 ml of 50 mM Tris pH 7.5; pepstatin A 1  $\mu\text{g/ml}$  in 1 ml 0.05 M citrate buffer pH 5.0, or without inhibitors (in 1 ml of the corresponding buffer), was incubated with the substrate at 25°C for 20 h with constant rotation. The reaction was stopped by chilling the samples for 3 minutes followed by centrifugation (8,000 X g for 10 minutes at 4°C). The supernatant was removed and the  $A_{520}$  read in a spectrophotometer.

**Assay with N-2,4-Dinitrophenyl- L-Prolyl- L-Glutaminylglycyl- L-Isoleucyl- L-Alanylglycyl- L-Glutaminyl- D- Arginine (DNP-Peptide-III) as substrate.** In this assay, 100  $\mu\text{l}$  of each sample, with or without inhibitors, was incubated with 100  $\mu\text{l}$  of the DNP-Peptide-III (1 mg/ml in 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.02% bovine serum albumin, pH 7.6) for 22 h at 37°C. The reaction was stopped with 0.5 ml 1.0 N HCl. The fragments were

extracted with 1 ml of 1:0.15 (v/v) ethyl acetate/n-butanol for 45 seconds. Then the mixture was centrifuged at 2,600 X g for 15 minutes at 25°C and the  $A_{365}$  of the organic phase was read (18).

**Assay with gelatin as substrate.** In this assay, 50  $\mu$ l of the extracts (pre incubated with inhibitors in the aforementioned conditions in phosphate buffered saline pH 7.4) were incubated with 5 mg of insoluble gelatin (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) and rotated constantly at 25°C for 20 h. The samples were chilled for 3 minutes and centrifuged (8,000 X g for 10 minutes at 4°C). The supernatant (400  $\mu$ l) was mixed with 600  $\mu$ l of 0.2 M acetic acid, 250  $\mu$ l of 0.2 M sodium citrate and 500  $\mu$ l of a ninhydrin reagent prepared as follows: 0.05 M ninhydrin, 1.8 mM ascorbic acid and 12.6 M ethylene glycol monomethyl ether. The mixture was boiled at 100°C for 15 minutes in an oil bath and the thermic reaction was abruptly stopped by chilling. Finally, 1.5 ml of 60% ethanol was added to each sample and, after vigorous agitation, was read at  $A_{440}$  against the reagent blank. In these conditions the color is directly proportional to the amount of proline and hydroxyproline in solution (19).

**Substrate gel electrophoresis.** A procedure similar to the one described by Perez-Montfort was used (20). The extracts were mixed with electrophoresis sample buffer containing sodium dodecyl sulfate (SDS) in the absence or presence of 10% (v/v) 2-mercaptoethanol (2-ME) [samples were not boiled] and were separated by electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gels (PAGE). In some cases, the gels were incubated immediately after electrophoresis with 10 gel volumes of 2.5% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 for 90 minutes at

room temperature with gentle stirring; the solution was changed every 30 minutes. The gel was then washed for two minutes in distilled water and placed in 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 with 10 mM CaCl<sub>2</sub> for 10 minutes, and immediately laid on top of another gel containing 7.5% acrylamide in 0.075 M Tris-HCl pH 8.45 and 0.57 mg ml<sup>-1</sup> of gelatin without SDS. In other cases, the gels received no treatment after electrophoresis. The gels were placed between glass plates, wrapped in wet tissue paper and incubated in a humid chamber at 37°C for 24 h. The gels were fixed and stained in 25% (v/v) isopropanol, 10% glacial acetic acid and 0.05% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad, Richmond CA) for 2 h, and discolored in 10% (v/v) glacial acetic acid, 10% (v/v) methanol for 24 h at room temperature.

**Calculations and Statistical Analysis.** Proteolytic activity was expressed as activity units (absorbance /  $\mu$ g of protein of the extracts) and inhibition was represented as percentage of inhibition. Results are given as mean  $\pm$  SEM. Differences between group means were tested for significance using Student's t test, with separate variance estimate if the standard deviations were significantly different according to the F test.



## RESULTS

The great majority of the epidermoid invasive carcinomas of uterine cervix we studied, were large cell nonkeratinizing type (93 %) against that of small cell type (7 %). Whereas 50% of the high grade intraepithelial squamous lesions were Ca in situ, 29% were severe dysplasia and 21% moderate dysplasia, according to the old classifications.

Our results showed increasing total proteolytic activity correlating with progression toward malignancy and invasive behavior, on all substrates tested. In Table I, one can appreciate that hide powder azure was the substrate in which the difference between the groups was more pronounced. The mean proteolytic activity of the Inv Ca extracts with this substrate was six times that of the normal extracts, three times that of the LGSIL extracts, and nearly two times that of HGSIL extracts. Although the differences between groups with gelatin and DNP-peptide III as substrates were less impressive, the results were consistent in showing an increment of proteolytic activity according to the progression in the natural history of this tumor (normal < LGSIL < HGSIL < Inv Ca).

The results with the inhibitors of the catalytic classes of proteinases (Table II) showed that the metalloproteinases were the predominant type of proteinases in all groups of extracts studied. Inhibition of proteolytic activity was always greater than 36% with EDTA and 1,10-Phen in the hide

powder azure (not shown) and gelatin assays, without significant differences between the groups. The proteolytic activity of the extracts was not affected by the metalloproteinase inhibitor Phosphon. Inhibitors of other catalytic classes diminished activity by less than 19% (with the exception of the Inv Ca extracts with PHMB in which the inhibition was greater than 27%). The only statistically significant difference was that of PHMB on the Inv Ca extracts in comparison with the other groups ( $p < 0.05$ ). The universal inhibitor  $\alpha$ -2m produced an inhibition between 67.84% and 73.80%, without significant differences between the groups, with either hide powder azure (not shown) or gelatin substrates. A mixture of three endopeptidase inhibitors for different catalytic classes (EDTA, Aprot, PHMB) results in an inhibition of approximately 85% for each group. Considering the gradual increment in proteolytic activity for each group together with the relatively uniform inhibition, our results suggest that the extracts of the diseased tissues had an overall increase in all catalytic classes of proteinases, with a predominance of metalloproteinases.

Using substrate gel electrophoresis in presence of 2-ME [Fig. 1], some of the extracts from normal tissues showed four lysis zones. The two most frequent and defined bands had apparent molecular masses of 34 kDa and 66 kDa [lanes A and C] both observed in 50% of the samples at different dilution's. Proteolytic lysis zones only became apparent using different dilution's for each extract. This could be due to varying concentrations of proteinase inhibitors in each sample (see Discussion). We also observed other two weak

bands with  $M_r$  of 45 kDa and 80 kDa (20% of the samples) [lane A]. In some extracts no proteolytic activity was detected [lane D].

The LGSIL showed four lysis zones. Bands of 33 kDa and 45 kDa were the most frequent activities (50%) [lane B], followed by one with  $M_r$  of 66 kDa (30%) [not shown] and another of 38 kDa (20%) [lane F]. On the other hand, the HGSIL showed six defined activities, for which the most frequent bands were at 28 kDa (50%) [lanes H and I], 150 kDa (20%) [lane H], 45 kDa (20%) [lane I], 66 kDa (20%) [lane I], 87 kDa (10%) [lane H] and 98 kDa (10%) [lane I]. Finally, the Inv Ca extracts showed at least ten well defined bands with proteolytic activity, these were at 45 kDa (50%) [lane G], 28 kDa (30%) [lane G], 34 kDa (30%) [lane L], 38 kDa (30%) [lanes J and K], 52 kDa (30%) [lane L], 66 kDa (30%) [lane J], 72 kDa (30%) [lane G], 105 kDa (20%) [lane G], 150 kDa (20%) [lane G], 18 kDa (10%) [lane G] and 59 kDa (10%) [lane J]. In general, the proteolytic bands of Inv Ca and HGSIL extracts, were more defined and prominent than those of LGSIL and normal tissue extracts.

### DISCUSSION

Our preliminary data show that the proteolytic activity in the extracts of the studied tissues increases correlating with the progression from normal tissues, to LGSIL, HGSIL and finally to Inv Ca. The results was consistent with all substrates tested. Inhibitor assays indicated that the predominant catalytic class of proteinases in the extracts of all groups were the metalloproteinases. This finding is not surprising, since matrix metalloproteinases are important in remodeling processes such as post-partum involution of the uterus, menstruation and other physiological responses in this organ (21, 22). Although Phosphon did not inhibit proteolytic activity, this could be due to the fact that this agent is an inhibitor of many bacterial-endoropeptidases, but few of mammalian origin (23). We also observed inhibition of proteolytic activity with inhibitors of other catalytic classes without significant differences between the groups, except a greater inhibition with PHMB of Inv Ca extracts than those of other groups. Assays with metalloproteinase activators, reveal that proteolytic activity can be enhanced (25%-55%) with aminophenylmercuric acetate, without significant differences between the groups (data not shown). The finding that metalloproteinases are the main catalytic class of endopeptidases in cervical carcinoma contrasts with the results published by Benitez -Bribiesca et al. This is probably due to the fact that these authors studied "substrate specific" proteolytic activity in serum and vaginal fluid only, and did not look for other catalytic classes of proteinases. As stated before, this

method may give ambiguous results and besides, the proteinase content of these two fluids may not reflect the composition of invasive tissue, since relevant proteinases may not be secreted.

Our initial observations were also supported by our results with the substrate gel electrophoresis, that showed an increase in the number of proteolytic bands that was proportional to the progress in the natural history of cervical cancer. It is attractive to point out the potential association of papillomavirus infection and proteolytic activity at each step of the natural history of cervical cancer. In this respect, we are currently working on the relation between the expression of human papillomavirus type 16 and 18 and proteolytic activity in cervical carcinoma and precursor lesions. An important point in our work is the appearance of certain bands of proteolytic activity in extracts of invasive tumors, like the 72 kDa and 52 kDa bands that were present exclusively in 30% of the samples in this group [Fig. 1 lanes G and L] and the 150 kDa band [Fig. 1 lane G], also present in HGSIL [Fig. 1 lane H]. We do not know the role of these bands, but we speculate they may be involved in invasion mechanisms of the tumors. We are working with immunological methods to resolve the questions about the identity and expression of these proteinases in tumoral tissue.

New concepts on the role of proteinases in tumor invasion established that the degradation of the extracellular matrix requires a complex array of lytic enzymes, in which plasminogen activators and matrix metalloproteinases appear to be involved in tumor invasion in most *in vitro* and *in vivo* experimental models, as well in some human tumors (24). Different molecular weights have

been reported for plasminogen activators, such as the tissue type (70 kDa), the urinary type that ranges between 40 kDa and 70 kDa in normal tissues and tumors (25, 26). On the other hand the most notable metalloproteinases in tumor invasion are the 72 kDa and 92 kDa type IV collagenases, that for activation require the release of 6 to 10 kDa fragments (27, 28). However, a high molecular weight type IV collagenase from human carcinoma tissue has been reported (29), as well as stromelysins and other metalloproteinases of different molecular weights that participate in tumor invasion (30). The relationship of the bands we have observed to these proteinases still has to be determined.

The picture is complicated due to the presence of inhibitors, like plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2), metalloproteinase inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) and other inhibitors that have been frequently found associated with proteolytic enzymes forming complexes of different molecular weights (31). Our results are consistent with the formation of such complexes in the extracts, because of the necessity to make dilution's to detect the proteolysis zones with substrate gel electrophoresis [Fig. 1].

In conclusion we found a direct correlation between the natural history of cervical carcinoma and the degree of proteolytic activity present in the respective samples. These findings were not previously reported in samples of cervical cancer and precursor lesions. A profound study of this field, particularly about the proteolytic bands that are exclusively present in invasive carcinoma, may has important clinical applications.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Ms. María de Lourdes Palmer for help with the zymograms, Dr. Gerardo Vaca for helpful suggestions for the proteolysis assay with gelatin.

## REFERENCES

1. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasm's-origins and implications. *Science* 1982;217:998-1001.
2. Stracke ML, Liotta LA. Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo* 1992;6:306-309.
3. Liotta LA. Tumor invasion and metastasis: role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986;46:1-7.
4. Liotta LAS P.S. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-336.
5. Tryggvason K, Höyhty M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987;907:191-217.
6. Matrisian L, Bowden Y. Stromelysin/transin and tumor progression. *Sem Cancer Biol* 1990;1:107-115.
7. Testa JE, Quigley JP. The role of urokinase type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:353-367.
8. Koivunen E, Ristimäki A, Itkonen O, Osman S, Vuento M, Stenman UH. Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res* 1991;51:2107-2112.
9. Steven FS, Griffin MM, Talbot IC. GB (guanidinobenzoate) cell surface protease and serum inhibitors in colorectal neoplasia. *J Pathol* 1992;167:19-24.
10. Weiss RE, Liu BC-S, Ahlering T, Dubeau L, Droller MJ. Mechanisms of human bladder tumor invasion: Role of protease cathepsin B. *J Urol* 1990;144:798-804.
11. Rochefort H, Capony F, García M. Cathepsin D: A protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:321-331.
12. Benitez-Bribiesca L, Freyre-Horta R, Gallegos-Vargas G. Protease and anti protease concentrations in serum and vaginal fluid of patients with carcinoma of the cervix. *Arch Invest Med (Mex)* 1980;11:523-549.
13. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:427-433.
14. Ambros RA, Kurman RJ. Current concepts in the relationship of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of Pre cancerous Squamous Lesions of the uterine cervix. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1990;7:158-172.



15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
16. Kurecki T, Kress LF, Laskowski M. Purification of human plasma  $\alpha$ -2 macroglobulin and a 1 proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography. *Anal Biochem* 1979;99:415-420.
17. Avila EE, Sánchez-Garza M, Calderón J. *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: sulfhydryl-dependent proteolytic activity. *J Protozool* 1985;32:163-165.
18. Gray RD, Saneii HH. Characterization of vertebrate collagenase activity by high-performance liquid chromatography using a synthetic substrate. *Anal Biochem* 1982;120:339-346.
19. Rodwell VW. Amino acids. In: Morray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed. *Harper's Biochemistry*. East Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1993: 26-31.
20. Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1987;26:87-98.
21. Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154.
22. Osmers R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Szeverényi M, Kuhn W. Collagenase activity in the human cervix uteri after prostaglandin E2 application during the first trimester. *EUROBS* 1991;42:29-32.
23. Beynon RJ, Salvesen G. Commercially available protease inhibitors. In: Beynon RJ, Bond JS, ed. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Oxford: Oxford University IRL Press, 1989: 246.
24. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiological Rev* 1993;73:161-195.
25. de Bruin PAF, Griffioen G, Verspaget HW, et al. Plasminogen activator profiles in neoplastic tissues of the human colon. *Cancer Res* 1988;48:4520-4524.
26. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochem* 1980;102:196-202.
27. Davies B, Miles DW, Haperfield LC, et al. Activity of type-IV collagenases in benign and malignant breast diseases. *British J Cancer* 1993;67:1126-1131.
28. Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Gatter KC, Carmichael J. Association between expression of activated 72-Kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:574-578.

29. Tsuda TT, Kodama A, Yamamura M, Matzukaki S, Tsuda M. Isolation and characterization of a high molecular weight type-IV collagenase isolated from human carcinoma tissue. FEBS Letters 1993;319:35-39.
30. Schmitt M, Janicke F, Graeff H. Tumor associated proteases. Fibrinolysis 1992;6:3-26.
31. Sier SFM, Verspaget HW, Griffioen G, et al. Imbalance of plasminogen activators and their inhibitors in human colorectal neoplasia. Gastroenterology 1991;101:1522-1528.

TABLE I

Proteolytic activity of invasive cervical carcinomas and precursor lesions on three different substrates.

-----			
Mean $\pm$ SEM proteolytic activity			
-----			
Group	hide powder azure	gelatin	DNP-III-peptide
-----			
Normal (1)	9.91 $\pm$ 2.42	64.91 $\pm$ 1.17	5.80 $\pm$ 1.72
LGSIL (2)	20.40 $\pm$ 1.97	89.86 $\pm$ 1.60	11.90 $\pm$ 1.47
HGSIL (3)	34.52 $\pm$ 4.18	84.17 $\pm$ 4.90	13.09 $\pm$ 2.23
Inv Ca (4)	65.52 $\pm$ 4.33	133.33 $\pm$ 3.74	16.91 $\pm$ 2.13
-----			

Proteolytic activity was expressed as mean  $\pm$  SEM activity units (absorbance /  $\mu$ g of protein of the extracts). Statistical analysis: a) hide powder azure: 4 vs 3 p < 0.050, 4 vs 2 p < 0.010, 4 vs 1 p < 0.007, 3 vs 1 p < 0.010; b) gelatin: 4 vs 2 and 3 p < 0.015, 4 vs 1 p < 0.010; c) DNP-III-peptide: 4 vs 3 N.S., 4 vs 2 p < 0.050, 4 vs 1 p < 0.010.

TABLE II

Effect of endopeptidase catalytic class inhibitors on proteolytic activity of invasive cervical carcinomas and precursor lesion extracts.

Inhibitor (s)	Group (% Inhibition $\pm$ SE)			
	Normal	LGSIL	HGSIL	Inv Ca
EDTA (2 mM)	47.4 $\pm$ 3.6	54.2 $\pm$ 3.9	42.1 $\pm$ 2.8	41.3 $\pm$ 3.0
1-10-Phen (2 mM)	41.5 $\pm$ 4.1	55.7 $\pm$ 3.7	40.2 $\pm$ 3.3	36.4 $\pm$ 3.1
Phosphon (5 $\mu$ M)	2.9 $\pm$ 2.3	-7.0 $\pm$ 3.8	-7.2 $\pm$ 4.1	-9.9 $\pm$ 4.4
PMSP (1 mM)	5.0 $\pm$ 2.3	13.1 $\pm$ 2.2	10.2 $\pm$ 2.0	12.8 $\pm$ 2.7
Aprot (100 $\mu$ g/ml)	18.8 $\pm$ 1.8	18.2 $\pm$ 3.2	13.4 $\pm$ 2.8	20.8 $\pm$ 3.3
E-64 (2 $\mu$ m)	6.9 $\pm$ 1.8	14.9 $\pm$ 3.7	10.3 $\pm$ 1.8	13.1 $\pm$ 2.0
PHMB (1 mM)	9.5 $\pm$ 2.5	14.8 $\pm$ 2.8	18.0 $\pm$ 3.0	27.5 $\pm$ 3.7
Pep-A (1 $\mu$ Ml)	7.3 $\pm$ 3.3	7.4 $\pm$ 2.3	8.8 $\pm$ 2.1	9.0 $\pm$ 2.5
$\alpha$ 2m (0.8 mg/ml)	72.2 $\pm$ 3.3	67.8 $\pm$ 2.3	73.8 $\pm$ 3.3	71.1 $\pm$ 3.1
EDTA, Aprot, PHMB	85.8 $\pm$ 2.9	86.6 $\pm$ 3.1	83.6 $\pm$ 2.8	89.7 $\pm$ 3.2

Inhibitors were pre incubated with extracts at 4° C during 1 h, followed by an incubation during 22 h at 25° C with gelatin as substrate. Afterwards the reaction was stopped at 4° C by centrifugation at 6000 X g and the supernatant was reacted with the ninhydrin reagent and the O.D. determined at a 440 nm.

Fig. 1. Representative zymograms of gels on which extracts of normal and cancerous cervical tissues were analyzed. Lanes A, C and D, normal tissue; lanes B, E and F, LGSIL; lanes H and I, HGSIL; lanes G, J, K and L, Inv Ca. Lanes marked with an \* were made in a different electrophoresis chamber. Numbers to the right indicate the  $M_r$  in kDa. F is the dye front. The dilution of the sample is indicated at the bottom of each lane.

