



11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

EL PAPEL DEL TIMP-4 EN EL CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS PRESENTA
FLORIA JOSEFINA LIZÁRRAGA SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**

NOVIEMBRE 2005

0352129



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Jorge Meléndez Zajgla en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por todas sus enseñanzas, su apoyo y paciencia, por su ejemplo como científico.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por compartir su experiencia y dedicación a la biología del cáncer, por la discusión de este proyecto.

A la Dra. Annie Pardo Semo, por preocuparse por mi formación y ayudarme a superar los obstáculos, por su ejemplo y su participación en este proyecto.

A los integrantes de mi jurado de examen, Dr. Jaime Berumen, Dr. Moisés Selman, Dra. Leticia Rocha, Dra. Marcela Lizano, Dr. Carlos Ramos, Dra. Vilma Maldonado y Dr. Jorge Meléndez, por la revisión de esta tesis.

A Magali Espinosa y a Gisela Ceballos por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, por las discusiones, por su amistad.

A Leonardo Peraza Reyes, por su apoyo durante este proyecto.

A Cristina López Uribe, por sus dibujitos y por su cariño.

Al Dr. Hansberg, por sus sugerencias y su apoyo. A los miembros de su laboratorio.

Al CONACYT y a la DGEP, por los apoyos recibidos.

A mis compañeros de laboratorio, Julia, Ingrid, Aida, Abril, Lore, Alma, Luz, Juan Carlos, Rubén, Moisés, por todo su apoyo y por su agradable compañía.

Al Instituto Nacional de Cancerología.

A toda mi familia

A mis amigos

**Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada.
Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa,
ve.....Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el
amor.....Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada
sabe acerca de las uvas.**

P.

CONTENIDO

Resumen	1
INTRODUCCIÓN	3
La matriz extracelular y las metaloproteinasas de matriz extracelular	3
Los inhibidores tisulares de las MMP's	4
Funciones de los TIMP's en el cáncer	6
<i>Los TIMP's regulan el crecimiento celular y la apoptosis</i>	7
<i>Los TIMP's regulan la activación de las MMP's y la angiogénesis tumoral</i>	8
<i>Los TIMP's pueden estimular la tumorigénesis</i>	9
TIMP-4	10
<i>Expresión de lTIMP-4</i>	11
<i>Participación del TIMP-4 en el cáncer</i>	11
<i>Papel del TIMP-4 en la apoptosis</i>	12
APOPTOSIS	12
ANTECEDENTES	15
<i>Cáncer cérvico-uterino</i>	15
<i>Expresión de moléculas relacionadas con la apoptosis en CaCu</i>	16
<i>Expresión de los TIMPs en el CaCu</i>	16
<i>Hipótesis</i>	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
METODOLOGÍA	18
Cultivo celular	18
Muestras clínicas	18
Histología	18
Extracción del mRNA	18
Síntesis cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	19
Análisis estadístico	20
Clonación del marco de lectura abierto del TIMP-4 humano	21

Transfección estable de las células Calo con vectores retrovirales	21
Viabilidad celular en las células Calo	22
<i>Deprivación de SBF</i>	22
<i>Sensibilidad a fármacos</i>	22
Viabilidad celular en las células Calo y HeLa con TIMP-4 recombinante humano	22
Extracción de proteínas totales	23
Extracción de proteínas de membranas celulares	23
Extracción de proteínas citosólicas y mitocondriales	23
Extracción de proteínas nucleares	24
Inmunoprecipitaciones	24
Western blot	24
Análisis densitométrico	24
Citometría de flujo	24
Detección de anexina-V-FICT por citometría de flujo	25
Tinción con bromuro de etidio	25
Ensayos de gen reportero	25
Ensayos de migración celular	26
RESULTADOS	28
Expresión del mRNA en las muestras de pacientes y en líneas celulares de CaCu	28
Sistema de sobre-expresión del TIMP-4	31
Migración en las líneas celulares CC y CT	32
La sobre-expresión del TIMP-4 sensibiliza a células Calo a diferentes estímulos apoptóticos	34
El efecto del TIMP-4rh en las líneas celulares Calo y HeLa	37
Análisis del ciclo celular en las líneas celulares CC y CT	38
Características de la muerte inducida por el TIMP-4 en las células Calo	39
a) Privación de los factores de crecimiento	39
1) Detección de la anexina V	39
2) Activación de caspasas	39
b) Activación de los receptores de muerte	42
1) Morfología apoptótica	42

2) Tinción de de los núcleos con bromuro de etidio	42
Inhibición de la activación de la vía de Akt	42
Análisis de los componentes del complejo inductor de muerte	4
La vía del factor transcripcional NFκB	44
a) Actividad transcripcional	46
b) Las proteínas de la familia de IκB	48
Las proteínas inhibidoras de la apoptosis, IAP's	49
Las proteínas semejantes a caspasas, FLIP's	50
Las proteínas de la familia de Bcl-2	51
DISCUSIÓN	53
Expresión de las MMP's y los TIMP's en CaCu	53
Sistema de sobre-expresión del TIMP-4	53
El efecto del TIMP-4 en las células de CaCu	53
El TIMP-4 induce apoptosis en las células Calo	55
Proteínas apoptóticas en las células CC y CT	55
1. <i>La vía de la cinasa Akt</i>	56
2. <i>La familia de las IAP's</i>	56
3. <i>La familia de Bcl-2</i>	56
4. <i>Los FLIP's</i>	57
5. <i>El complejo inductor de muerte en las células Calo</i>	57
Posible vía de muerte celular inducida por el TIMP-4	58
CONCLUSIONES	62
Apéndice I. Mapas de los vectores	63
Apéndice II. Densitometrías	64
Apéndice III. Artículo publicado	65
Referencias	68

RESUMEN

La degradación y remodelación de la matriz extracelular (MEC) está asociada a procesos tanto fisiológicos y como patológicos, como la angiogénesis, la proliferación, la apoptosis y la metástasis tumoral.

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (TIMP's) participan en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) ya que interactúan e inhiben a las metaloproteinasas de la MEC (MMP's). Los TIMPs constituyen una familia de 4 proteínas pleiotrópicas que tienen una estructura conservada. Se unen al sitio activo de las MMP's a través de su dominio amino estequiométricamente 1:1 inhibiendo su actividad proteolítica. Se ha estudiado la expresión y las funciones de los TIMP's en diversos tipos de cáncer. Se han considerado como factores antitumorales debido a su función inhibitoria de las metaloproteinasas (MMP's); sin embargo, algunos trabajos han sugerido que pueden promover la formación de tumores.

El TIMP-4 es la proteína más recientemente descrita en esta familia y regula la actividad de varias MMP's *in vitro* (1, 3, 5, 7, 14, 26, entre otras). Además, afecta la proliferación, la muerte celular, la angiogénesis y la invasión de manera dependiente del tipo celular y del tejido.

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un enfermedad importante en México y es la segunda neoplasia de las mujeres en el mundo en incidencia y mortalidad. Los cambios en la composición y en las actividades de las MMP's y los TIMP's se han asociado con distintos tipos de neoplasias por lo que podría considerarse su participación en este padecimiento. Por otra parte, no se han estudiado la expresión del TIMP-4 y su posible participación en esta neoplasia. Debido a lo anterior el objetivo de este proyecto de investigación fue determinar la presencia del TIMP-4 en algunas muestras del tejido de pacientes y líneas celulares derivadas de CaCu, así como elucidar sus posibles funciones *in vitro*.

Se determinó la presencia del mRNA para el TIMP-4 en muestras tisulares de pacientes con CaCu de los estadios I a III de acuerdo con la clasificación de la FIGO (Federación internacional de gineco-obstetricia) y se encontró una relación entre el nivel de expresión del TIMP-4 y el estadio de la enfermedad. No se encontró el mRNA para el

TIMP-4 en las biopsias del cervix de mujeres sanas. Las líneas celulares de CaCu, CaLo, HeLa, CaSki y SiHa presentaron el mRNA y la proteína TIMP-4.

Se estableció un sistema de sobre-expresión del TIMP-4 para investigar las posibles funciones de este inhibidor en la línea celular derivada de CaCu denominada CaLo. Se encontró que las células que sobre-expresan TIMP-4 son más susceptibles a la muerte celular inducida por privación de los factores de crecimiento, etopósido, el factor TNF α y el ligando TRAIL. Se determinaron algunas características de apoptosis inducidas por estos estímulos como el cambio del fosfolípido fosfatidil-serina (por la detección de la anexina V) hacia la cara externa de la membrana plasmática, la activación de caspasas y la morfología apoptótica. Adicionalmente, las líneas celulares CaLo y HeLa fueron incubadas con TIMP-4 recombinante humano (10 nM) y se encontró que son más sensibles a la muerte por el ligando TRAIL y el factor TNF α .

Se analizó la expresión de los mRNA's y las proteínas de algunas familias de proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, tales como las IAP's (proteínas inhibidoras de la apoptosis), la familia de Bcl-2, los FLIP's (proteínas semejantes a caspasa), algunos componentes del complejo inductor de muerte y las I κ B's. Las células que sobre-expresan TIMP-4 presentaron menores niveles de los mRNA's para FLIP_R y FLIP_S. Las proteínas Bcl-2, Mcl-1, TRAF-2, TRADD y FLIP_R presentaron también menores niveles en las células que sobre-expresan TIMP-4. Los mRNA's y las proteínas de las cIAP's 1 y 2 e I κ B α e I κ B β se presentaron en mayor cantidad en las células que sobre-expresan TIMP-4. Asimismo, las proteínas Bak, Bid y caspasa 8 se presentaron en niveles ligeramente mayores en las células que sobre-expresan TIMP-4.

Los resultados anteriores sugieren que el TIMP-4 sensibiliza a las células de CaCu a la muerte celular por apoptosis ya que modifica la expresión de algunas proteínas que la regulan, o bien debido a que afecta alguna de las vía de transducción que regula la expresión de las anteriores.

Por otra parte, las células que sobre-expresan TIMP-4 poseen una capacidad de migración mayor cuando se crecen en medio de cultivo derivado de los fibroblastos, con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y con suero bovino fetal.

INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular y las metaloproteinasas de matriz extracelular.

Las moléculas de la matriz extracelular (MEC) proporciona señales que afectan la adhesión, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis de las células. La alteración de estas señales puede provocar que las células adquieran propiedades tumorigénicas como la pérdida de la inhibición por contacto, la evasión de la muerte celular y la división celular aberrante. Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP's, por sus siglas en inglés) son un grupo de proteínas que participan en el metabolismo de la MEC ya que controlan la remodelación de sus componentes (Nagase y Woessner, 1999).

Las MMP's constituyen una familia de proteasas que dependen de Zn^{+2} y de Ca^{+2} , capaces de degradar cualquier componente de la MEC. Estas enzimas son sintetizadas en forma de zimógenos y se activan cuando se hidroliza su extremo amino terminal y pierden su prodominio. Esta activación ocurre debido a la acción de otra MMP, de una proteasa de serina o por autoactivación. En los humanos existen 24 MMP's y fueron clasificadas inicialmente por la especificidad de los sustratos que procesan en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y matrilisininas. La nomenclatura actual utiliza un sistema numérico secuencial porque la lista de sustratos ha crecido y éstos no son solamente componentes de la MEC. Con base en los dominios que comparten las MMP's se dividen en ocho grupos, 5 grupos están constituidos por proteasas secretadas y 3 grupos por enzimas unidas a la membrana celular (Nagase y Woessner, 1999) (Anexo 1).

La actividad proteolítica de las MMP's es regulada por algunos inhibidores fisiológicos. La $\alpha 2$ -macroglobulina es un inhibidor sérico inespecífico de las MMP's; las une a receptores "secuestradores" y son endocitados irreversiblemente. Además, los inhibidores tisulares de las MMP's (TIMP's, por sus siglas en inglés) regulan la actividad de las MMP's (Hojilla *et al.*, 2003).

Los inhibidores tisulares de las MMP's

Actualmente se han identificado 4 TIMP's en los mamíferos, numerados TIMP-1 a TIMP-4 por su orden de descubrimiento y se han encontrado genes homólogos en otras especies animales. A pesar de que todos los TIMP's de mamíferos son parecidos, cada uno presenta características distintivas en su estructura y patrón de expresión, lo que sugiere que cada uno de ellos tiene funciones particulares *in vivo* y que algunas de éstas son exclusivas para un TIMP específico (Edwards, 2001).

La tabla I muestra la información básica de la familia de los TIMP's y señala las similitudes y las diferencias más importantes. Estas proteínas comparten del 31 al 51% de identidad en su secuencia de aminoácidos, siendo los más parecidos los TIMP's 2, 3 y 4. Los 4 miembros de esta familia de inhibidores poseen una estructura génica conservada, su información codificante está contenida en 5 exones (a excepción del *TIMP-1* que tiene 6) y las fronteras intrón-exón están también conservadas. Además, todos los genes de los TIMP's están embebidos en los intrones de los genes de las sinapsinas por lo que se ha propuesto que todos sus genes se originaron de un solo ancestro por duplicación génicas (Edwards, 2001).

Los TIMP's son proteínas secretadas de 20 a 30 KDa y dicha secreción es mediada por una secuencia señal amino-terminal de 23 a 29 residuos de aminoácidos. Poseen una estructura conservada de 6 asas y 12 residuos de cisteína separados de manera similar que forman 6 puentes bisulfuro. Forman complejos fuertes con una estequiometría 1:1 con las MMP's e inhiben su activación auto-catalítica y la función proteolítica de sus formas activas. El dominio amino-terminal (asas 1 a 3) de los TIMP's está altamente conservado y es necesario y suficiente para la inhibición de las MMP's. El dominio carboxilo-terminal (asas 4 a 6) es variable entre los TIMP's y proporciona la especificidad para las MMP's (Blavier *et al.*, 1999).

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Cromosoma (humano)	Xp11.3-11.23	17q2.3-2.5	22q12.-13.2	3p25
Proteína (KDa)	28	21	24	22
N-Glicosilación	Si, dos	No	Si, una	No
Localización	Celular y MEC	Celular y MEC	Unida a la MEC	Celular y MEC
RNA (Kb)	0.9-1.0	3.5, 1.0	4.5 (2.8, 2.4)	1.2
Expresión <i>in vivo</i>	Ovario, hueso, útero	Placenta, pulmón, cerebro	Riñón, pulmón, útero, cerebro	Cerebro, corazón, Mús. Esquel.
Expresión <i>in vitro</i>	Inducible	Constitutiva	Inducible y constitutiva	Constitutiva ¿? (restringida)
Inhibición de MT-MMP	No	Si	Si	Si
Asociación con pro-MMP	9	2	2,9	2,9
Actividad potenciadora eritroide	Si	Si	¿?	¿?
Mitogenicidad	Si	Si	Si	¿?
Apoptosis	Inhibición (linfoide)	Inhibición (melanoma)	Promoción (diversa)	Inhibición Promoción

Tabla 1. Propiedades de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (Modificada de Edwards, 2001).

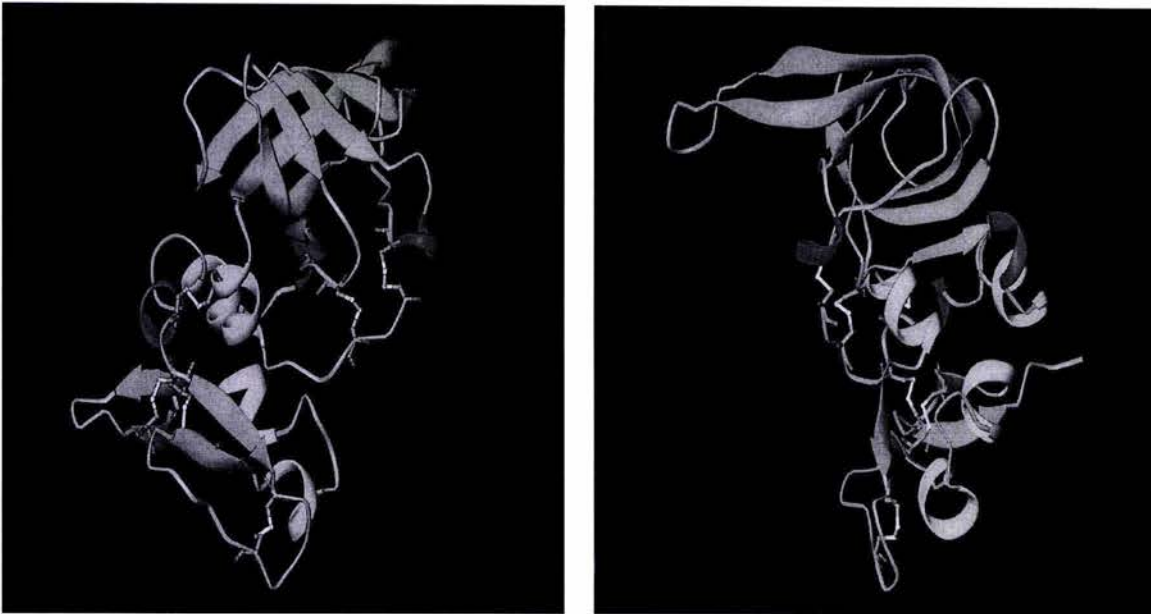


Figura 1. Modelo de la estructura del TIMP-2 humano en estado oxidado. Se indica la estructura secundaria (verde, láminas β ; azul, hélices α) y se muestran las cisteínas formadoras de los puentes disulfuro en amarillo. Número de acceso PDB (*Protein Data Bank*) 1BR9. Método: difracción de rayos X, resolución 2.1 Å.

Funciones de los TIMP's en el cáncer

Los TIMP's participan en el remodelaje de la MEC ya que regulan la activación y la actividad de las MMP's. Esta actividad de los TIMP's puede inhibir la tumorigénesis y la progresión tumoral. Sin embargo, los TIMP's presentan otras funciones independientes de su actividad inhibitoria de las MMP's por lo que sus efectos en la carcinogénesis en ocasiones resultan paradójicos (Gomez *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2002).

Las MMP's se regulan a distintos niveles: la transcripción de sus genes, la activación de sus zimógenos y por la interacción con los TIMP's. Así la actividad de las MMP's es el resultado del balance entre los niveles de enzimas y de TIMP's. La expresión elevada de las MMP's o su actividad alterada se ha relacionado con la

transformación celular maligna. Asimismo, una baja expresión de TIMP's puede resultar en una actividad mayor de las MMP's (Jiang *et al.*, 2002).

Se ha observado la sobre-expresión de las MMP's en los estadios tempranos de los tumores (Bernhard *et al.*, 1994; Koshiba *et al.*, 1998; Coussens *et al.*, 2000). Además, se sabe que las MMP's participan en la angiogénesis inducida por las células tumorales (Handsley y Edwards, 2005). A pesar de que estos hallazgos apuntan a que los TIMP's tendrían una función exclusivamente antitumoral, también existen evidencias experimentales que indican que los TIMP's pueden favorecer el desarrollo tumoral (Figura 2).

Los TIMP's regulan el crecimiento celular y la apoptosis.

Los TIMP's promueven el crecimiento celular. Los TIMP's 1 y 2 son moléculas mitogénicas para los queratinocitos normales, fibroblastos, células de adenocarcinoma pulmonar y células de melanoma (Hayakawa *et al.*, 1992; Hayakawa, 1994).

También se ha reportado que los TIMP's regulan la apoptosis. En general, se ha observado que el TIMP-3 es una proteína apoptótica y dicha función depende completamente de su actividad inhibitoria de las MMP's. Los TIMP's 1, 2 y 4 inhiben o promueven la apoptosis dependiendo del tipo celular (Ahonen *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 1999; Tummalapalli *et al.*, 2001; Bond *et al.*, 2002; Ahonen *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Los TIMP's pueden regular la apoptosis al menos de 2 formas, de manera dependiente y de forma independiente a la inhibición de las MMP's. Las interacciones de las células con su MEC influyen la viabilidad celular y se ha observado que cuando estas interacciones se alteran las células mueren por apoptosis. El recambio de las moléculas de la MEC por las MMP's modula la sobrevivencia celular y como consecuencia, los TIMP's pueden modular la apoptosis (Jiang *et al.*, 2002).

De manera independiente, los TIMP's también regulan la apoptosis. Por ejemplo, el TIMP-1 reducido completamente (por lo que no puede inhibir a las MMP's) suprime la apoptosis de los linfocitos B (Guedez *et al.*, 1998). Los efectos de los TIMP's sobre la apoptosis y la sobrevivencia celular podrían estar mediados por vías de señalización (Li *et al.*, 1999a; Ritter *et al.*, 1999; Celiker *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001). Además, varios

estudios han sugerido la existencia de algún receptor para los TIMP's (Hayakawa, 1994; Luparello *et al.*, 1999; Hoegy *et al.*, 2001).

Los TIMP's regulan la activación de las MMP's y la angiogénesis tumoral.

Las MMP's son secretadas como zimógenos y requieren una activación extracelular. A este respecto, el TIMP-2 tiene una doble función para regular a la MMP-2 (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000). El TIMP-2 es un inhibidor potente de la MMP-2, pero también es una molécula adaptadora requerida para la activación de la pro-MMP-2 en la superficie celular por lo que podría en este caso considerarse "pro-tumoral". Los TIMP's 3 y 4 también pueden unir a la pro-MMP-2 con alta afinidad, pero ninguno de ellos promueve la activación de la MMP-2 directamente (Bigg *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 1999).

Los efectos de los TIMP's son variados y paradójicos en la angiogénesis. Poseen actividad antiangiogénica por inhibir a las MMP's o por un efecto directo sobre la proliferación de las células endoteliales. Las MMP's promueven la migración de las células endoteliales y libera al VEGF de la MEC (Bergers *et al.*, 2000). También los TIMP's inhiben directamente la proliferación de las células endoteliales. El TIMP-1 potencia la expresión del VEGF en las células de carcinoma de mama (Yoshiji *et al.*, 1998). El TIMP-2 inhibe el crecimiento de las células endoteliales estimuladas con FGF-básico y puede unirse a los receptores de VEGF e inhibir la angiogénesis (Murphy *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 2003). Por su parte, el TIMP-3 inhibe la movilidad de las células endoteliales (Anand-Apte *et al.*, 1997). Finalmente el TIMP-4 inhibe la formación de tubos de células endoteliales en matrigel (Lafleur *et al.*, 2001). Con base en estos resultados se puede pensar que los TIMP's inhiben la angiogénesis; sin embargo, algunas MMP's poseen un papel importante en la generación de moléculas angiogénicas. Las MMP's 2, 7, 9, y 12 pueden convertir el plasminógeno en angiostatina, un conocido factor antiangiogénico (Patterson y Sang, 1997; Cornelius *et al.*, 1998; Pozzi *et al.*, 2000). Las observaciones anteriores sugieren que los TIMP's pueden jugar un papel positivo en la angiogénesis tumoral.

Los TIMP's pueden estimular la tumorigénesis.

Una alteración en el balance entre los TIMP's y las MMP's a favor de la inhibición enzimática, podría desfavorecer la progresión tumoral. Sin embargo, los hallazgos mencionados sugieren que los TIMP's poseen funciones paradójicas en el crecimiento y progresión tumorales, en contraste con los efectos antitumorales que se habían establecido previamente.

Se ha demostrado un incremento en la expresión de los TIMP's en varios tumores, como el de mama, el colorectal, el gástrico, el pulmonar, etc (Jiang *et al.*, 2002). Shi y sus colaboradores han propuesto que el efecto neto de los TIMP's en la tumorigénesis puede depender de su disponibilidad en un tejido determinado, del tiempo (momento y duración) en el que está presente en la célula tumoral y de la presencia de un receptor putativo en las células (Jiang *et al.*, 2002).

El balance entre la actividad inhibitoria de las MMP's antitumoral y la actividad como factor de crecimiento podría depender de la disponibilidad del TIMP en el microambiente tumoral. Así, se puede observar un fenotipo supresor tumoral cuando los niveles del TIMP son elevados y pueden inhibir a las MMP's. Si la expresión del TIMP es menor se podría favorecer el crecimiento tumoral debido a su actividad anti-apoptótica. Además, como se mencionó en el caso del TIMP-2, las concentraciones bajas favorecen la activación de la pro-MMP-2 y por lo tanto la progresión tumoral (Baker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Otro factor que influencia la actividad neta de los TIMP's es el tiempo. Cuando las células tumorales se inoculan a un animal o cuando se establecen en un órgano secundariamente, muchas mueren por apoptosis debido a la reacción del hospedero. Así, las funciones promotoras del crecimiento y/o las anti-apoptóticas podrían ser importantes en la fase inicial de la carcinogénesis (baja concentración). En estadios posteriores, la angiogénesis es importante para el crecimiento tumoral. Así, la actividad antiangiogénica de los TIMP's se volvería un factor negativo para la progresión tumoral (Jiang *et al.*, 2002). En concordancia con estas ideas, el TIMP-1 presenta efectos bifásicos en la tumorigénesis del linfoma como se mencionó anteriormente (Guedez *et al.*, 2001).

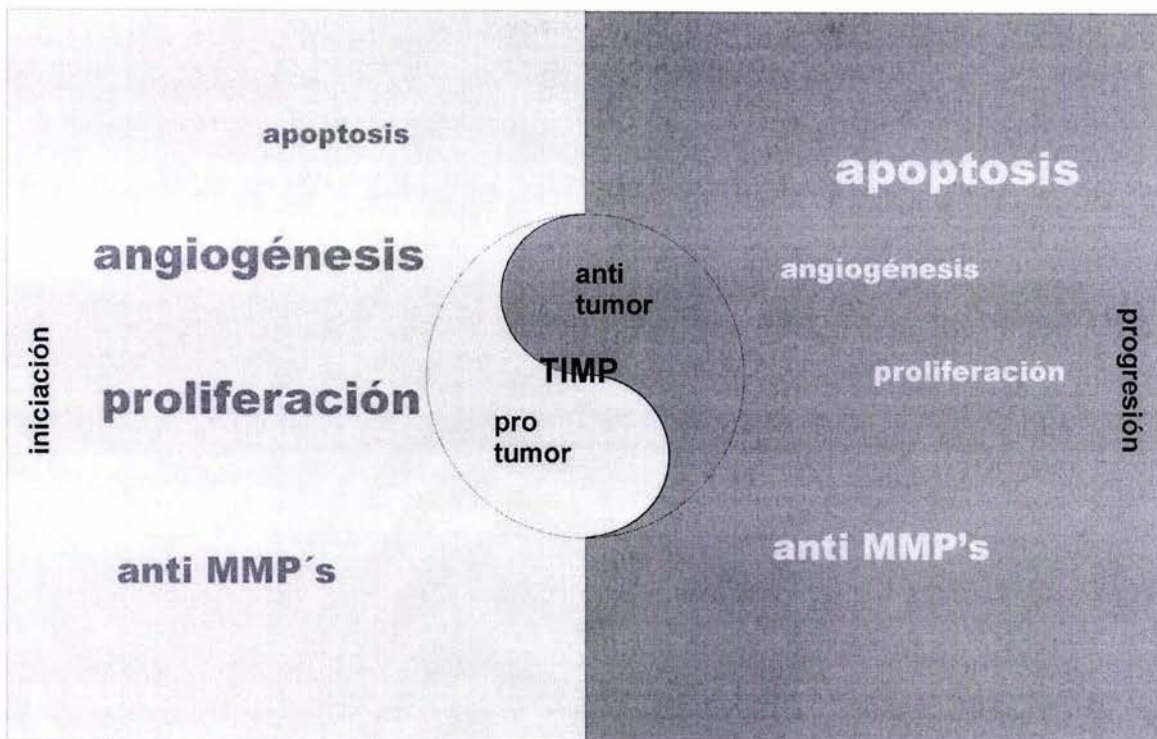


Figura 2. Esquema que señala las funciones de los TIMP's en el cáncer (modificada de Jiang *et al.*, 2002). El tamaño de las letras indica la regulación del proceso celular. La iniciación y la progresión se refieren a las fases del proceso carcinogénico.

TIMP-4

Esta proteína fue identificada en 1996, posee un peso molecular de 23 KDa aproximadamente. Su secuencia de aminoácidos tiene una identidad del 37% con el TIMP-1, de 51% con el TIMP-2 y con el TIMP-3 (Greene *et al.*, 1996). Su actividad inhibitoria de las MMP's ha sido estudiada. *In vitro* inhibe a las MMP's 1, 3, 7, 14 y 26 (Zhang *et al.*, 2002). Asimismo, el TIMP-4 puede regular la activación de la pro-MMP-2 ya que inhibe a la MMP-14 (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000; Bigg *et al.*, 2001).

Expresión del TIMP-4

En los humanos adultos, el TIMP-4 se expresa en el corazón, el páncreas, el riñón, el colon, la placenta y el testículo (Greene *et al.*, 1996; Bigg *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Se conoce muy poco acerca de la regulación de la expresión del gen del TIMP-4 en los humanos. Se encontró un sitio de regulación de la expresión por estrógenos en las células del endometrio y se observó que la expresión del TIMP-4 se regula de manera inversa a la MMP-26 (Pilka *et al.*, 2004).

Por otra parte, Li y colaboradores determinaron que la expresión transitoria del TIMP-4 se induce con TNF e IL-1 (100 u/mL) en las células ventriculares del corazón de la rata (Li *et al.*, 1999a).

Young y colaboradores (2002) analizaron el promotor del *Timp-4* en el ratón. Encontraron varios sitios consenso para el factor de transcripción Sp1 que regulan de manera positiva la expresión del TIMP-4 y una caja invertida CCAAT propuesta como un elemento de regulación negativa (Young *et al.*, 2002).

Participación del TIMP-4 en el cáncer

Como en el caso de los otros TIMP's, se ha sugerido que el TIMP-4 tiene un papel en algunos tipos de cáncer. Se demostró la expresión del mRNA en las células del estroma de tumores de mama humanos mientras que la proteína TIMP-4 está presente en las células epiteliales de esta neoplasia (Jiang *et al.*, 2001). En el carcinoma endometrial el TIMP-4 está sobre-expresado con respecto al tejido sano y este aumento en la expresión se relacionó con la invasión (Tunuguntla *et al.*, 2003). Por otra parte, se observó un incremento del TIMP-4 de la superficie celular en las células invasoras del carcinoma gástrico (Koyama, 2004).

En contraste, se observó la expresión del mRNA para el TIMP-4 en muestras de gliomas humanos y se encontró una relación inversa con la malignidad tumoral (Groft *et al.*, 2001). También se ha propuesto que el TIMP-4 suprime el crecimiento tumoral en algunos casos. Se observó que la expresión del TIMP-4 inhibe el crecimiento del tumor de Wilms, a una concentración menor a la requerida para inhibir a las MMP's (Celiker *et al.*, 2001). Ohta y colaboradores (2005) determinaron que la expresión del TIMP-4 (mRNA) disminuye en los casos de feocromocitoma maligno con respecto al benigno

(Ohta *et al.*, 2005). Estos hallazgos sugieren una participación compleja del TIMP-4 en el cáncer.

Papel del TIMP-4 en la apoptosis

Existen pocos reportes acerca de la participación del TIMP-4 en la muerte celular o apoptosis. Tummalapalli y colaboradores (2001) demostraron que el TIMP-4 recombinante humano (TIMP-4rh) induce apoptosis en los fibroblastos de corazón transformados con un virus de poliovirus; sin embargo inhibe la migración a través de cámaras de Boyden (Tummalapalli *et al.*, 2001). Guo y colaboradores (2004) sobre-expresaron el TIMP-4 en las células vasculares de músculo liso y observaron un incremento en la apoptosis (Guo *et al.*, 2004).

Por otra parte, Jiang y colaboradores (2001) mostraron que el TIMP-4 induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L e inhibe la apoptosis en las humanas de cáncer de mama *in vitro* y en modelos tumorales *in vivo*.

APOPTOSIS

La apoptosis es un de los tipos de muerte celular conservada en distintos grupos de organismos. Es un proceso esencial durante la embriogénesis en los metazoarios y permite mantener la homeostasis celular en los adultos. Se considera un proceso celular importante en los mamíferos debido a la necesidad de integrar señales inductoras tanto fisiológicas como patológicas de la muerte celular. Ahora se sabe que falta de la inducción de la muerte celular puede llevar a enfermedades como el cáncer y la autoinmunidad, así como su activación excesiva a las enfermedades degenerativas y la inmunodeficiencia (Danial y Korsmeyer, 2004).

Muchos estímulos que inducen la apoptosis activan a un grupo de enzimas denominadas “caspasas”. Constituyen un grupo de proteasas de cisteína que son sintetizadas como zimógenos y su activación es consecuencia de 2 ó más cortes proteolíticos. Las caspasas se han dividido en iniciadoras (8 y 9) y efectoras (3 y 7) (Waxman y Schwartz, 2003).

Se han descrito dos vías principales de apoptosis dependientes de las caspasas: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Figura 3).

La vía extrínseca es inducida por la unión de ligandos a los receptores de la superfamilia de TNF (Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés) o “receptores de muerte” tales como los receptores para TNF (TNF-RI y RII), el receptor para CD95/Fas o los receptores del factor TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF, por sus siglas en inglés). La estimulación de los receptores de muerte induce la formación del complejo inductor de muerte o “DISC” (por sus siglas en inglés) característico para cada receptor. Este complejo recluta y permite la activación de la caspasa 8 la cual propaga la señal de la muerte por dos vías al menos: por la activación directa de otras caspasas efectoras y por la proteólisis de la proteína Bid que se transloca a la membrana externa mitocondrial e induce su permeabilización (Kroemer y Martin, 2005).

La apoptosis inducida por estímulos de estrés es iniciada por la mitocondria. Provocan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos al citosol como el citocromo c, algunas caspasas, el factor AIF, la proteína Smac, la endonucleasa G y la proteasa de serina Omi. En esta vía intrínseca, la salida del citocromo c induce la formación del “apoptosoma” un complejo de proteínas (formado por el propio citocromo c, dATP, la pro-caspasa 9, la proteína de andamiaje Apaf-1) que estimula y amplifica la activación de la caspasa 9 y los eventos apoptóticos posteriores (Kroemer y Martin, 2005).

La liberación de los factores apoptóticos de la mitocondria está regulada por las proteínas de la familia de Bcl-2 (por la translocación denominada leucemia de células B -2, por sus siglas en inglés). Este grupo de proteínas incluye miembros proapoptóticos, como Bid y Bax que promueven la liberación de los factores apoptóticos de la mitocondria y miembros antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 que bloquean la salida de dichos factores (Kirkin *et al.*, 2004).

Existen otras familias de proteínas que regulan la apoptosis: las proteínas inhibidoras de apoptosis o IAP's (por sus siglas en inglés), las proteínas FLIP (proteínas inhibidoras de la caspasa FLICE, por sus siglas en inglés) y las proteínas CARP (proteínas RING asociadas a las caspasas 8 y 10, por sus siglas en inglés).

Las proteínas IAP's de los mamíferos inhiben la apoptosis mitocondrial y la inducida por los receptores de muerte y la alteración de su expresión se ha relacionado

con la tumorigénesis y la quimioresistencia. Las IAP's pueden inhibir directa o indirectamente a las caspasas. La proteína XIAP por ejemplo, inhibe directamente la activación de la caspasa 9; sin embargo, no puede inhibir a la caspasa 8, pero si a la caspasa 3. Otra proteína IAP, la survivina, se expresa durante el desarrollo embrionario y en etapa adulta sólo se expresa en células tumorales. Algunas IAP's, como c-IAP-1 y -2 poseen actividad de ligasas de ubiquitina que facilita su auto-ubiquitinación y su degradación en respuesta a algunos estímulos apoptóticos (Waxman y Shwartz, 2003).

Los factores antiapoptóticos FLIP's tiene dominios efectores de muerte semejantes a los de la caspasa 8. Esta característica hace que compitan por el reclutamiento de la caspasa 8 al DISC y bloquean la apoptosis mediada por los receptores de muerte (Golks *et al.*, 2005). La muerte inducida por receptores puede ser inhibida también debido a la expresión de receptores falsos, como los receptores DcR1 y 2 para el ligando TRAIL y el receptor DcR3 para el ligando Fas. Los receptores DcR1 y 2 para el ligando TRAIL no se expresan en las células tumorales, pero si en las normales. En contraste, el receptor DcR3 para el ligando Fas está sobre-expresado en las células tumorales del pulmón y del colon (Danial y Korsmeyer, 2004).

Las caspasas de la vía extrínseca (que poseen un dominio efector de muerte) son reguladas negativamente por las proteínas CARP's. Éstas poseen un dominio RING y dirigen a las caspasas su degradación por ubiquitinación y son degradadas de manera rápida durante la apoptosis. Se encuentran sobre-expresadas en líneas celulares tumorales y en neoplasias y cuando se inhibe su expresión en las primeras, se restaura la capacidad para llevar a cabo la apoptosis debida a las caspasas de la vía extrínseca (McDonald y El-Deiry, 2004).

En contraste con las respuestas apoptóticas provocadas por los receptores de TRAIL y de Fas, la señalización por el receptor de TNF induce la sobrevivencia y proliferación celular. La parte citoplásmica de los receptores de TNF recluta a la proteína adaptadora TRAF (factor asociado al receptor de TNF, por sus siglas en inglés) que permite la activación del factor transcripcional NFκB. Éste a su vez puede inhibir la apoptosis de varias formas: induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como TRAF's, IAP's, receptores falsos para TRAIL, FLIP, proteínas de la familia de Bcl-2 como Bcl-X_L y A1/Bfl-1. A su vez, cuando c-IAP-1 se une al DISC del TNF-R1 puede

inducir la ubiquitinación y la degradación de TRAF, por lo tanto inhibe la inducción del factor NFκB y potencia la apoptosis inducida por TNF (Li *et al.*, 2002).

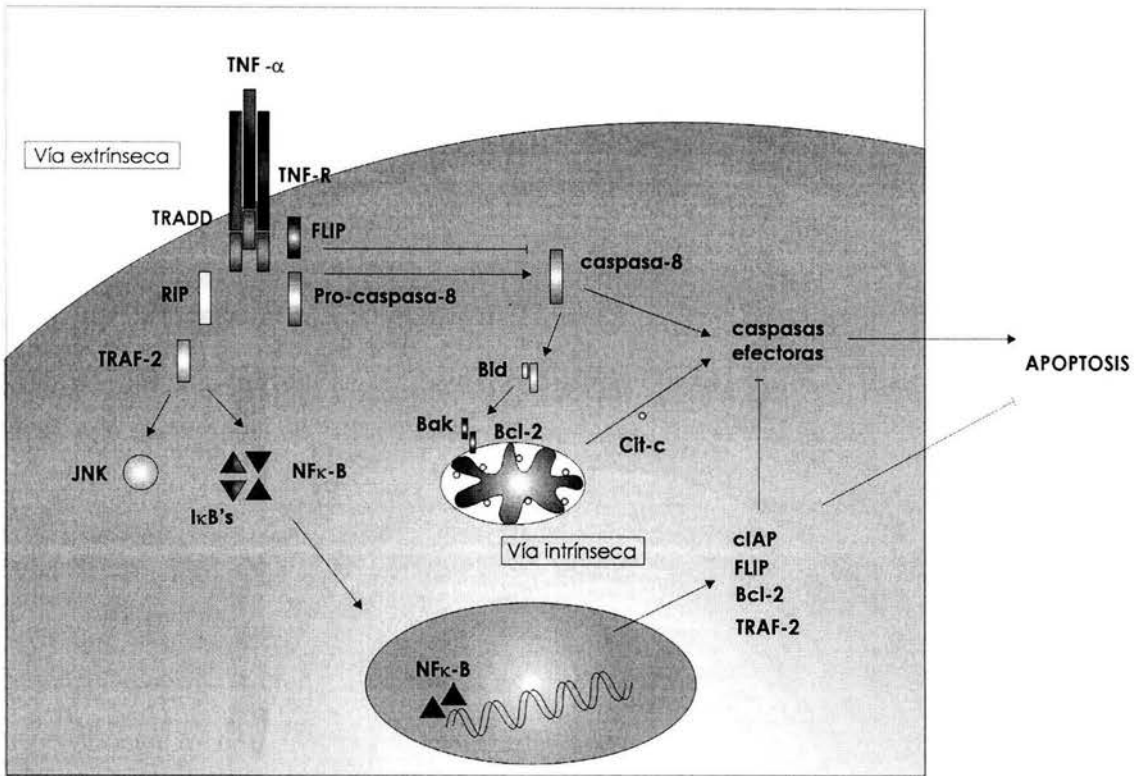


Figura 3. Esquema de las vías de la apoptosis en los mamíferos.

ANTECEDENTES

Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en México por esta enfermedad y la tercera causa de muerte en el mundo. El CaCu es curable cuando se detecta en fases iniciales (Waxman y Schwartz, 2003).

Se ha observado la presencia del virus del papiloma humano (VPH) en la mayoría de las muestras de cervix de pacientes con CaCu. Se ha propuesto que después de la infección del VPH a las capas basales de epitelio cervical, deben pasar años para que la enfermedad progrese hacia la neoplasia. Este periodo largo permitiría entonces la

acumulación de diferentes mutaciones que a su vez lleven al desarrollo del CaCu (Lazo, 1999; DeVita *et al.*, 2001).

Se ha identificado la alteración en la expresión de algunos genes en el CaCu. Asimismo, los estudios citogenéticos y moleculares han sugerido que las alteraciones en los cromosomas 1, 3, 5, 11 entre otros, pueden tener un papel en la tumorigénesis cervical (Crawford *et al.*, 1998; Lazo, 1999; Chung *et al.*, 2002; Sherbet y Patil, 2003).

Expresión de moléculas relacionadas con la apoptosis en CaCu

Se ha determinado la expresión de proteínas involucradas en la apoptosis en muestras de pacientes con CaCu. Shebert y Patil (2003) mencionan que la expresión de p53 aumenta del estadio I al estadio III del CaCu y que las mutaciones de este gen son poco frecuentes en esta neoplasia. También se ha reportado la sobre-expresión de la ciclina D1 (Kedzia *et al.*, 2001) y de la proteína apoptótica SMAC (Espinosa *et al.*, 2004) en el CaCu.

Por otra parte, la incidencia de mutaciones en el gen supresor tumoral PTEN incrementa conforme progresa el CaCu (Harima *et al.*, 2001). El producto de este gen es una fosfatasa que regula la fosforilación de la cinasa Akt (Sherbet y Patil, 2003). Finalmente, se ha estudiado la expresión de algunas de las proteínas reguladoras de la familia de Bcl-2 en las biopsias de pacientes de CaCu. Las proteínas Bcl-2, Mcl-1 y Bax están asociadas con un pronóstico bueno en el CaCu (Crawford *et al.*, 1998).

Expresión de los TIMPs en el CaCu

Algunos investigadores han reportado la expresión de las MMP's y de los TIMP's en líneas celulares y en muestras de pacientes con CaCu (Nuovo *et al.*, 1995; Garzetti *et al.*, 1996; Gilles *et al.*, 1996; Davidson *et al.*, 1999; Asha Nair *et al.*, 2003). El incremento en la expresión de estas proteínas con respecto al tejido sano sugiere su participación en el proceso carcinogénico. Sin embargo, no se conocen las funciones que los TIMP's podrían llevar a cabo. Asimismo, la expresión y/o la participación del TIMP-4 en este proceso carcinogénico se desconoce. Con base en estos antecedentes, se propuso la siguiente hipótesis para este proyecto de investigación:

Hipótesis

El TIMP-4 participa en la carcinogénesis del cervix mediante la regulación de procesos clave como la apoptosis, migración y proliferación celulares.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del TIMP-4 en la apoptosis, la proliferación y la migración de las líneas celulares derivadas del CaCu.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar la presencia del mRNA para el TIMP-4 en biopsias derivadas de pacientes con cervix sano y con CaCu.
2. Analizar la relación entre la presencia del mRNA para el TIMP-4 en las muestras de las pacientes con CaCu y algunas características clínicas de esta patología.
3. Establecer un sistema de sobre-expresión del TIMP-4 en una línea celular derivada de CaCu.
4. Determinar si el TIMP-4 modifica la proliferación, la apoptosis y la migración de las células del CaCu.
5. Investigar las posibles vías de transducción de señales involucradas en los efectos del TIMP-4 en una línea celular del CaCu.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu), HeLa, CaSki y SiHa se obtuvieron de la ATTC (American Tissue Cell, MD, USA) y la línea celular CaLo fue un amable regalo del Dr. Alejandro García. Las células fueron cultivadas en monocapa en un medio DMEM (Dulveco's modified Eagle Medium) que contenía suero bovino fetal (SBF) al 10% (V/V, GIBCO, Bethesda, MD, USA) e incubadas a 37°C en un atmósfera húmeda con CO₂ (V/V).

Muestras clínicas

El tejido cervical se obtuvo de pacientes a los cuales se les efectuó una histerectomía en el Instituto Nacional de Cancerología (México) por enfermedad y en ausencia de ésta. Antes de aislar las muestras se obtuvo un consentimiento por escrito de cada paciente. Las muestras cervicales se clasificaron histopatológicamente por un patólogo.

Histología

La clasificación histopatológica de las muestras se realizó de acuerdo a la FIGO (Federación internacional de ginecología y obstetricia, Apéndice 4). El estudio incluyó 32 muestras, 7 muestras estadio IB, 9 del estadio IIB, 10 del estadio IIIB y un grupo control de muestras de tejido epitelial escamoso normal (n=6).

Extracción del mRNA

El RNA total se extrajo con el reactivo Trizol (Life Sciences, Bethesda, MD, USA) a partir de 10 mg de muestra de tejido o de 1 millón de células cultivadas, de acuerdo al proveedor. Se confirmó la pureza del RNA con la relación 260 nm/280 nm y se estableció su integridad en geles de agarosa como se ha descrito previamente (Sambrook *et al.* 2002).

Síntesis cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El análisis por RT-PCR se realizó de acuerdo a lo reportado previamente. La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total con hexámeros al azar y con la transcriptasa reversa de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las reacciones contenían 0.25 µl de la polimerasa Amplitaq Gold (Applied Biosystems, Ca, USA), 2.5 µl del buffer de reacción 10X, 0.5 µl de la mezcla de dNTP's 10 mM, 1 µl del oligonucleótido sentido 10 µM, 1 µl del oligonucleótido antisentido 10 µM y 1-2 µl del cDNA para un volumen final de 25 µl. Los oligonucleótidos para amplificar el TIMP-4 fueron: en sentido 5' CCAGAGGTCAGGTGGTAA 3' y en antisentido 5' ACAGC CAGAAGCAGTATC 3'. Los oligonucleótidos para GAPDH fueron: en sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3' y en antisentido 5' TTGTCATGGATGACCT TGGC 3'. Los parámetros para los ciclos de la PCR para GAPDH fueron los siguientes: 10 minutos para activar la enzima a 95°C seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Los parámetros de los ciclos de la PCR para TIMP-4 fueron: 10 minutos para activar la enzima a 95°C seguidos de 3 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 68°C y 1 minuto a 72°C, 3 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C. Para obtener el marco de lectura abierto del TIMP-4 humano (675pb) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: sentido: 5' GCGGAAGC TTCCCAGCATGCCTGGGAGCCCTCGGCCC 3' y antisentido: 5' CTCCCGA ATTCGGCTGAACGATGTCAACAAACTCTTTCC 3'. Los oligonucleótidos empleados para los inhibidores de NFκB, las IκB's, fueron los siguientes: para IκBα: sentido 5' CTACACCTTGCCTGTGAGCA 3' y antisentido 5' CAGGGAGGCAGACATAC CAT 3'; para IκBβ: sentido 5' TCCGACTTGGAGAAGGAAGA 3' y antisentido 5' CGGA CCATCTCCACATCTTT 3'; para IκBε: sentido 5' GCTGCTGTGTACC GACTGAA 3' y antisentido 5' CTAGGGCACCAGAAGAGCAC 3' y para IκBγ; sentido 5' AGGTG GAGCACCTGAAGAGA 3' y antisentido 5' CAGAGCCTGG CATTCCCTTAG 3'. Los oligonucleótidos que se utilizaron para las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las IAP's, fueron los siguientes: para la Survivina: sentido 5' GCCATG AATTCATGGGTGCCCCGACGTTGC 3' y antisentido 5' AGCTCTCTAGAGA

GGCCTCAATCCATGGCA 3'; para la XIAP: sentido 5' GCACGAGCAGGGTT TCTTTATACTGGTG 3' y antisentido 5' CTTCTTCACAATACATGGCAGGG TTCCTC 3'; para cIAP-1 sentido 5' GAATACTCCCTGTGATTAATGGTGCCGTGG 3' y antisentido 5' TCTCTTGCTTGTAAGACGTCTGTGTCTTC 3' y para cIAP-2: sentido 5' GAATACTCCCTGTGATTAATGCTGCCGTGG 3' y antisentido 5' TCT CTTGCTTGTAAGACGTCTGTGTCTTC 3'. Los oligonucleótidos empleados para amplificar los mRNA's de las proteínas FLIP fueron los siguientes: sentido 5' AGGAT GTCTGCTGAAGTCA 3' para FLIP_R y FLIP_S y para FLIP_R el antisentido 5' AACGG TTTCATGCTGGGATTCC 3' y para FLIP_S 5' TCACATGGAACAATTTCCAAGA ATT 3'.

Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes se obtuvieron con un cámara digital (Kodak DC 290, DF, México). Los datos de la expresión del mRNA del TIMP-4 fueron expresados como la relación de los valores densitométricos (Scion Image Software, MD, USA) de la expresión del TIMP-4 de las células HeLa vs. la muestra específica de tumor. Los productos de las PCR del TIMP-4 fueron normalizados con aquellos obtenidos para la amplificación del mRNA de GAPDH, empleado como gen de referencia interna. Las cuantificaciones de la expresión de cada gen fueron repetidas por lo menos dos veces. Los niveles relativos de TIMP-4 fueron considerados como bajos si estaban incluidos en el percentil 25avo y como altos cuando los valores excedían este valor de percentil 25avo. Los percentiles se obtuvieron a partir de la distribución de los valores de expresión del TIMP-4.

Análisis estadístico

Muestras de tejido de las pacientes

Los valores de expresión del TIMP-4 se compararon con los parámetros patológicos del tumor para determinar cualquier correlación. Las diferencias fueron analizadas para valorar la diferencia significativa utilizando la prueba ANOVA's (edad y tamaño del tumor) y la prueba Chi cuadrada (Etapa FIGO, histología tumoral, menopausia y estado actual). Se empleó el paquete Intercooled Stata Versión 7.0 (TX,

USA) para los análisis y se consideró estadísticamente significativo un valor de P menor a 0.05.

Ensayos de viabilidad celular

Se realizó la prueba estadística t de student para comparar y analizar las diferencias entre las líneas celulares con los distintos estímulos apoptóticos. Se utilizó el paquete Intercooled Stata Versión 7.0 (TX, USA) y se consideró estadísticamente significativo un valor de P menor a 0.05.

Clonación del marco de lectura abierto del TIMP-4 humano

El producto de la PCR del marco de lectura abierto (ORF) del TIMP-4 obtenido de las células Caski se subclonó en el vector pTZ57R/T (MBI Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El plásmido obtenido se denominó pTZ57R/T-TIMP-4 y se digirió con la enzima Eco RI (GIBCO) y el producto de la digestión se subclonó en el vector retroviral pLXSN (CLONTECH, Anexo 1). El nuevo plásmido se denominó pLXSN-TIMP-4 (Anexo 1).

Transfección estable de las células CaLo con vectores retrovirales

Las células CaLo se crecieron al 50% de confluencia en medio de cultivo DMEM con 8% de SBF. Se transfectaron con los vectores retrovirales pLXSN y pLXSN-TIMP-4 con el liposoma Escort (SIGMA). Se seleccionaron durante un mes con Geneticina (800 $\mu\text{g/ml}$). Se verificó la sobre-expresión del mRNA del TIMP-4 por RT-PCR como se mencionó anteriormente y de la proteína TIMP-4 en el medio de cultivo y extractos totales celulares por Western Blot (Anexo 2). Las líneas celulares obtenidas se denominaron “CC” (por CaLo-pLXSN, control) y “CT” (por CaLo-pLXSN-TIMP-4, TIMP-4).

Viabilidad Celular en las células CaLo

Deprivación de SBF

Las líneas celulares CaLo-pLXSN (CC) y CaLo-pLXSN-TIMP-4 (CT) se sembraron en placas de 24 pozos (20,000 células por pozo) y se incubaron 24 h con medio DMEM con SBF 8%. Las células se lavaron con PBS 1X y con medio sin SBF y se incubaron durante 5 días con 0 y 8% de SBF. Se agregó MTT y se incubaron 3 h a 37°C. La tinción se solubilizó con DMSO y se leyó la absorbencia a 570 nm. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió por lo menos 3 veces. El porcentaje de viabilidad y el porcentaje de desviación estándar se expresó en relación a las células CaLo-pLXSN con el porcentaje de SBF correspondiente.

Sensibilidad a fármacos

Las líneas celulares CC y CT se sembraron en placas de 24 pozos (20,000 células por pozo) y se incubaron 24 h con medio DMEM con SBF 8%. Las células se lavaron con PBS 1X y con medio sin SBF y se incubaron durante: 48 h con etopósido (SIGMA, 300 μ M), 36 h con TNF α (SIGMA, 10 ng/ml) y 7 h con TRAIL (RD Systems, 20 ng/ml). Las células se lavaron con PBS 1X frío y se fijaron con etanol al 70% a -20°C 15 minutos. Se tiñeron con cristal violeta (0.1%, P/V en agua destilada) durante 20 minutos y la tinción se solubilizó con ácido acético al 33%. Se midió la absorbencia a 570 nm en un lector de ELISA. El porcentaje de viabilidad y el porcentaje de desviación estándar se expresó en relación a las células CC sin tratamiento.

Viabilidad celular en las células CaLo y HeLa con TIMP-4 recombinante humano

Las líneas celulares CaLo y HeLa se sembraron en placas de 24 pozos (20,000 células por pozo) y se incubaron 24 h con medio DMEM con SBF 8%. Las células se lavaron con PBS 1X y con medio sin SBF y se incubaron durante 48 h con TIMP-4 recombinante humano (RD Systems) 10 nM. Posteriormente, a las células HeLa se les agregó TNF α (20 ng/ml) y se fijaron después de 48 h. Se midió la viabilidad celular como se mencionó anteriormente con cristal violeta. Las células CaLo, se incubaron con TRAIL (20 ng/ml) durante 7 horas y se determinó la viabilidad celular con MTT.

Extracción de proteínas totales

Se sembraron 500,000 células en cajas de 25 cm² y se incubaron 24 h. Las células se lavaron y se incubaron con medio sin SBF durante 0, 2.5 y 5 días o con TNF α (20 ng/ml) por 36 h. Las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con buffer RIPA (NP40 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidores de proteasas y PMSF 1000 μ g/ml en PBS 1X). Se incubó 10 minutos en hielo y se centrifugó a 10,000 r.p.m a 4°C.

Extracción de proteínas de membranas celulares

Se sembraron 1 millón de células en cajas de 75 cm² y después de 24 h se lavaron y se incubaron con TNF α (20 ng/ml) por 36 h. Algunas cajas se incubaron hasta confluencia antes de agregar el TNF α (20 ng/ml). Las células se lisaron con 1 ml de buffer de lisis frío (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tritón 100X 1%, SDS 0.05%, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100 μ M, B-glicerofosfato 10 mM, pirofostato 1mM, leupeptina 20 μ g/ml, bacitricina 500 μ g/ml, inhibidor de tripsina 50 μ g/ml y PMSF 1000 μ g/ml). Se incubaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante contiene las proteínas membranales.

Extracción de proteínas citosólicas y mitocondriales

500,000 células de cada línea celular se sembraron en cajas de 25 cm² y se incubaron 24 h. Se lavaron con PBS 1X y con medio sin SBF y se incubaron durante 36 h con TNF α (20 ng/ml). Las células se lavaron con PBS 1X frío y se lisaron con el buffer de extracción (sacarosa 250 mM, KCl 70 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ (pH 7.2) 1.4 mM, digitonina 200 μ g/ml, PMSF 100 mM e inhibidores de proteasas) 5 minutos a -20°C. Se centrifugó a 4,000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es la fracción citosólica y el botón se resuspendió en 2 volúmenes de buffer de lisis mitocondrial (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 0.2% Tritón 100X, 0.3% NP40, PMSF 100 mM e inhibidores de proteasas) 5 minutos a -20°C. Se centrifugó 20 minutos a 10,000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante es la fracción mitocondrial.

Extracción de proteínas nucleares

Se sembraron 500,000 células en cajas de 25 cm² y se incubaron 24 h. Las células se lavaron y se incubaron con medio sin SBF con TNF α (20 ng/ml) por 36 h. Se lavó con PBS 1X frío y se lisaron con buffer "A" (Hepes pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1mM, inhibidores de proteasas y PMSF 100 mM) 15 minutos en hielo. Se agregaron 14 μ l de NP40 10% e inmediatamente se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es la fracción citosólica. El botón se resuspendió en 50 μ l de buffer "C" (Hepes 25 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, Glicerol 20%, DTT 1 mM, NP40 0.1%, inhibidores de proteasas y PMSF 100 mM) y se agitó por 30 minutos a 4°C. Se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es el extracto nuclear.

Inmunoprecipitaciones

Se inmunoprecipitaron 200 μ g de proteína membranal obtenida de las células CC y CT de acuerdo al protocolo de Keller y colaboradores (2003).

Western blot

Las proteínas se cuantificaron usando un micro-método de Bradford. 10-50 μ g de proteína, se separaron en un gel de poliacrilamida al 12-15% en condiciones desnaturalizantes y se transferieron a membranas de PVDF. Se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. El anticuerpo unido se detectó usando quimioluminiscencia elevada (Roche) con películas AR X-Omat (Kodak).

Análisis densitométrico

Las densitometrías mostradas se obtuvieron a través del análisis de las bandas de los geles de agarosa y poliacrilamida con el software NIH Scion Image. Los valores obtenidos se muestran como unidades densitométricas arbitrarias.

Citometría de flujo

Las células CaLo-pLXSN y CaLo-pLXSN-TIMP-4 se cultivaron 5 días sin suero. Su contenido de DNA fue determinado como lo describieron Vindelov y Christensen

(1994). Las células se fijaron con etanol al 80% y lavadas 2 veces con PBS 1X. Se aislaron los núcleos de 1 millón de células para cada condición y se incubaron con Ioduro de propidio durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad. Los datos fueron obtenidos con el programa de computo Cell Quest y analizados con el programa Mod Fit (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Detección de Anexina-V-FICT por citometría de flujo

Las células CaLo-pLXSN y CaLo-pLXSN-TIMP-4 se incubaron durante 5 días con medio sin SBF y se analizaron para detectar el cambio de la fosfatidilserina en la membrana celular de acuerdo al protocolo del proveedor (BD Pharmigen). Brevemente, 1 millón de células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se resuspendieron en 1 ml de buffer de unión. 100 µl de cada condición se incubaron con 5 µl de Anexina-FICT y 5 µl de ioduro de propidio (BD Pharmigen) en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 400 µl del buffer de unión a cada condición y se analizaron en el citómetro de flujo.

Tinción con bromuro de etidio

Las células CC y CT se cultivaron en cajitas de 35 mm de diámetro sobre un cubreobjeto y se incubaron con TNF α (20 ng/ml) durante 48 horas, como se mencionó anteriormente. Se fijaron con etanol al 70% durante 15 min a -20°C. Se lavó con PBS 1X y se incubaron con 5 µl RNAsa (SIGMA, 10 mg/ml) en 1mL de PBS 1X durante 1 h a 37°C. Se lavó con PBS 1X y se incubó con 5 µl de una dilución 1:100 de Bromuro de etidio (SIGMA, 10 mg/ml) en 1mL de PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 1X, tres veces y se montaron con PBS:glicerol para observarlas en el microscopio de fluorescencia.

Ensayos de gen reportero

Se utilizó la fosfatasa alcalina como gen reportero para el factor de transcripción NF κ B (BD Pharmigen). Las células CC y CT se sembraron en cajas de 12 pozos al 50% de confluencia. Al día siguiente se transfectaron con los plásmidos siguientes por triplicado:

- a) control negativo: pSEAP2-Basic Vector

b) control positivo: pSEAP2-Control Vector

c) pNFkB-SEAP

y cada uno de los vectores anteriores se co-transfectó con el plásmido pHM6/LacZ (Roche) para utilizar la expresión de la enzima β -galactosidasa como control interno de transfección. También se emplearon las células sin transfectar como control.

Después de 48 horas de la transfección, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina en el medio de cultivo de las células de acuerdo al protocolo del proveedor (Kit BD Great EscAPE SEAP). Brevemente, se colocaron 50 μ l del medio de cultivo de cada pocito y se incubaron con 50 μ l del buffer de dilución 1X a 65°C, 1 h. Se enfrió colocando en hielo por 2 a 3 minutos. Se agregaron 100 μ l de buffer de prueba y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 μ l del sustrato CSDP y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se expuso a una película fotográfica (KODAK, Hyperfilms) de 4 a 18 h. Sólo las células CC y CT transfectadas con los vectores pSEAP2-Control-Vector y pNFkB-SEAP mostraron actividad de fosfatasa alcalina.

El resultado obtenido se normalizó con la expresión de la enzima β -galactosidasa. Para analizar dicha expresión se empleó el kit de Promega “ β -galactosidase enzyme assay system with reporter lysis buffer”. Brevemente, después de retirar el medio de cultivo de los pocitos para medir la fosfatasa alcalina, las células se lavaron con PBS 1X dos veces y se lisaron con 400 μ l del buffer 1X RBL durante 30 minutos en rotación. Con un gendarme se recuperó el lisado y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a 4°C. 50 μ l de cada sobrenadante se incubaron con 50 μ l del buffer de prueba 2X durante 3 horas a 37°C. Se leyó la absorbencia a 420 nm. Con el promedio de los resultados obtenidos para cada co-transfección se normalizó la actividad de la fosfatasa alcalina. Se consideró la eficiencia de la transfección de las células CC como el 100%.

Ensayos de migración celular

Ensayos de “herida”

5×10^5 células de cada línea se sembraron en cajas de 35 cm de diámetro. 24 horas después se realizó una línea recta que señaló el diámetro de cada cajita con una pipeta de

2 ml, se lavó con PBS 1X y se incubó por 4 días con los medio de cultivo con 8% de SBF, con HGF (10 ng/ml) y con medio derivado de los fibroblastos en cultivo (“medio condicionado”) con 0 y 1% de SBF. Se contaron todas las células que invadieron la línea en cada condición, después de 4 días. Este experimento se realizó por triplicado. Se muestra la relación entre las células control CC (valor arbitrario de 1 de migración) y las células CT.

Ensayos en cámaras de migración

Se utilizaron las cámaras comerciales de Millipore de 96 pozos. Se sembraron 2×10^4 células en la parte superior de cada cámara y se utilizaron los medios de cultivo mencionados para el ensayo de migración de “herida” como quimio-atrayentes en la parte inferior de cada cámara. Las células se fijaron y tiñeron después de 4 días. El experimento se realizó por triplicado.

RESULTADOS

Expresión del mRNA en las muestras de pacientes y en líneas celulares de CaCu

Con el fin de determinar los niveles de expresión del TIMP-4 en las muestras de pacientes y en algunas líneas celulares derivadas del CaCu, se realizaron reacciones de RT-PCR semi-cuantitativo. Se observó la acumulación del mRNA para el TIMP-4 en las líneas celulares derivadas de CaCu HeLa, CaSki, SiHa y CaLo (Figura 4). La cantidad del transcrito para el TIMP-4 fue distinta para cada línea celular.

Asimismo, se analizó la acumulación del mRNA para el TIMP-4 en 26 muestras de pacientes con CaCu y en 6 biopsias de cervix normal. Se normalizó la expresión en las muestras con la de la línea celular HeLa y con un control interno de cantidad de RNA, el mRNA para la enzima GAPDH.

En la figura 4, se muestra la ausencia del mRNA para el TIMP-4 en las muestras de cervix normal. En contraste, el 88% de las muestras de pacientes con CaCu presentaron el transcrito para el TIMP-4. No obstante, no se encontró ninguna relación entre la expresión del mRNA del TIMP-4, la histología, la menopausia, el tamaño tumoral, el estadio de la FIGO (Apéndice 4) o el status de la enfermedad (ver Tabla I del artículo publicado, apéndice V). Las curvas de sobre-vida fueron similares para ambos grupos ($p=0.23$ prueba de “log rank”).

Se establecieron percentiles de acuerdo a la distribución de los datos de expresión del TIMP-4 y con base en el percentil 25 se separaron a las pacientes en 2 grupos, aquellas con baja expresión (94 o menos unidades densitométricas arbitrarias, 6 pacientes) y aquellas con expresión alta (172 o más unidades densitométricas arbitrarias, 20 pacientes). No se encontró ninguna relación entre la expresión del TIMP-4 y la histología, la menopausia, el tamaño tumoral o el status de la enfermedad (Tabla II). Los tiempos de sobre-vida fueron similares para ambos grupos. Sin embargo, se observó una relación entre los estadios de la FIGO y la expresión del TIMP-4. Las muestras de las pacientes con estadios de la FIGO II y III presentaron un nivel mayor del mRNA del TIMP-4 ($p=0.013$ prueba de Chi cuadrada) (Tabla II).

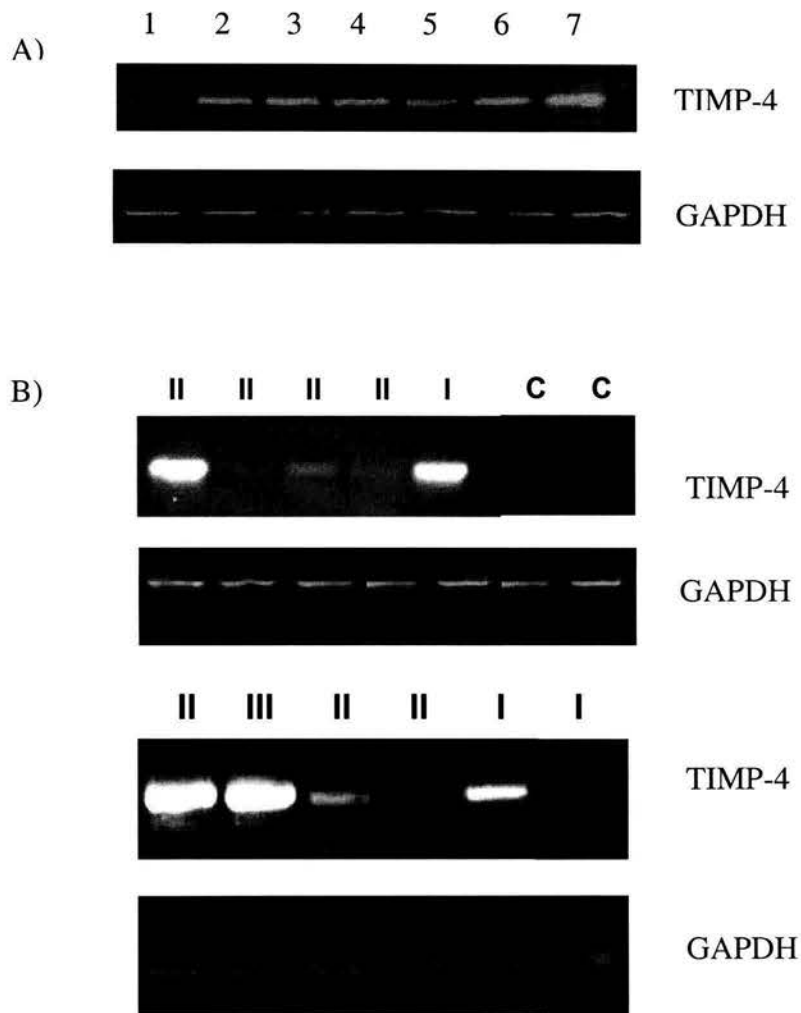


Figura 4. mRNA del TIMP-4 obtenido de las líneas celulares y de muestras del tejido de pacientes con CaCu. A) RT-PCR para TIMP-4 y para GAPDH de los mRNA's obtenido de las líneas celulares de CaCu: 1)HeLa, 2) SiHa, 3) CaSki y 4) CaLo y de 3 muestras distintas de pacientes con CaCu de los estadios I (5), II (6) y III (7), respectivamente. B) RT-PCR para el TIMP-4 y para GAPDH de algunas muestras de tejido de las pacientes con CaCu. El mRNA para la GAPDH se empleó como control interno de expresión. Los estadios de la FIGO se presentan en números romanos.

Variable	No. Pacientes (n=23)	TIMP-4 Alto (n= 20)	TIMP-4 Bajo (n= 3)	<i>P</i>
Edad	53.45 (32-82)	52.85(32-82)	53.3(35-70)	0.794
Estadio FIGO				
IB	6	6	0	0.013
IIB	7	4	3	
IIIB	10	10	0	
Histología				
Carcinoma escamoso	19	16	6	0.492
Adenocarcinoma	2	2	0	
C. adenoescamoso	2	2	0	
Menopausia	2	2	0	0.792
Pre-menopausia	6	5	1	
Post-menopausia	15	13	2	
Tamaño tumoral	n=19	n=15	n=4	
< 5 cm	6	4	2	0.66
>5-<10 cm	10	7	2	
>10-<15 cm	1	1	0	
>15 cm	2	2	0	

Tabla II. Niveles de expresión del TIMP-4 y su relación con algunas características clínicas de CaCu. El valor *P* se refiere a la diferencia obtenida entre los grupos de cada rubro con las pruebas estadísticas mencionadas (estadio de la FIGO, histología tumoral y menopausia, fueron obtenidas con Chi cuadrada y la edad y el tamaño tumoral con la prueba ANOVA) con respecto al nivel de expresión del TIMP-4. Se consideró estadísticamente significativo un valor de *P* menor a 0.05.

Sistema de sobre-expresión del TIMP-4

Se estableció un sistema de sobre-expresión basado en vectores retrovirales con el fin de estudiar las posibles funciones del TIMP-4 en la línea celular de CaCu, CaLo. El marco de lectura abierto del TIMP-4 se obtuvo por RT-PCR empleado oligonucleótidos específicos y se subclonó en el vector pLXSN (Apéndice 2). Posteriormente, las células CaLo se transfectaron de manera estable con los vectores pLXSN y pLXSN-TIMP-4 y se verificó la sobre-expresión después de un mes de selección por RT-PCR y Western blot en extractos totales y proteínas del medio de cultivo. El mRNA del TIMP-4 incrementó aproximadamente 3.7 veces (Apéndice 3) en la línea celular denominada CT (pLXSN-TIMP-4) con respecto a la línea celular CC (pLXSN). La proteína TIMP-4 incrementó 3,9 veces en los extractos totales celulares de la línea CT. En el medio de cultivo, sólo se observó el TIMP-4 en la línea CT; sin embargo, por el método de detección empleado, no se encontró la proteína en la línea CC (Figura 5). Se emplearon las nuevas líneas CC y CT para estudiar las funciones del TIMP-4.

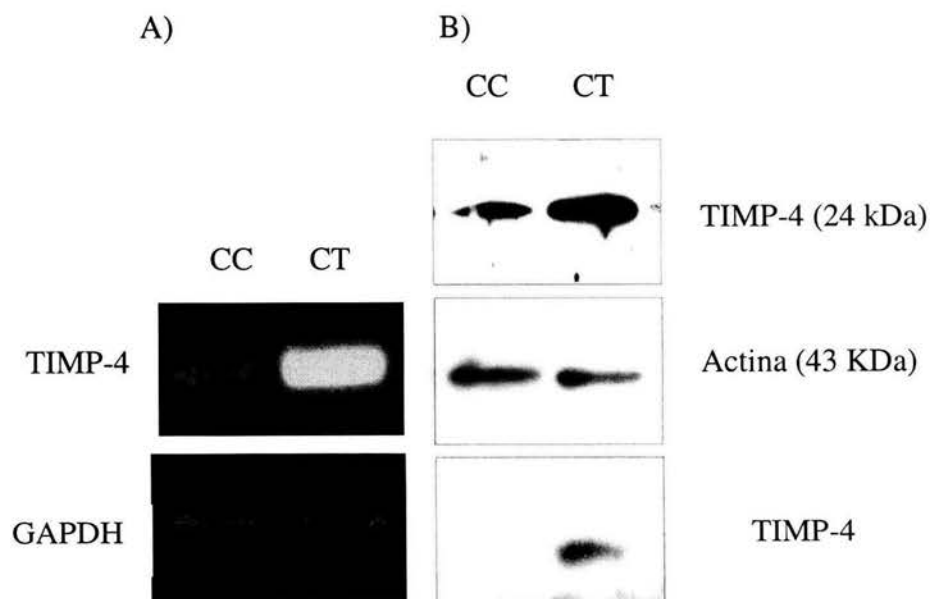


Figura 5. A) RT-PCR del mRNA para GAPDH y para TIMP-4 de las líneas celulares CC y CT. B) Western blot del TIMP-4 en extractos totales (panel superior) y proteínas del medio de cultivo (panel inferior) y para actina de las células CC y CT.

Debido a que los TIMP's participan en la carcinogénesis de maneras distintas se investigó el efecto de la sobre-expresión del TIMP-4 en la migración, la proliferación y la muerte de las células CaLo derivadas de CaCu.

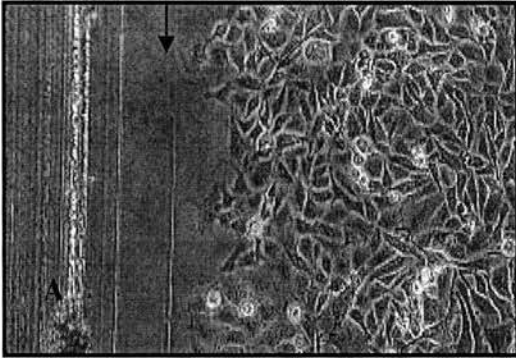
Migración en las líneas celulares CC y CT

Para determinar si la sobre-expresión de TIMP-4 en las células CaLo tiene un efecto en la migración, se realizaron 2 experimentos denominados de “herida” y uno de migración a través de cámaras con membranas de policarbonato (Millipore). Encontramos que las células CaLo que sobre-expresan TIMP-4 (CT) tienen una capacidad de migración mayor que las células transfectadas con el vector vacío pLXSN (CC) en las siguientes condiciones de cultivo: con 8% de suero bovino fetal (SBF), con HGF (factor de crecimiento de hepatocitos, (10ng/ml, sin SBF), y cultivadas en medio condicionado de fibroblastos con 0 y 1% de SBF (Tabla III y Figura 6).

Condición de cultivo	CC	CT
8% SBF	1	2.7
HGF (10ng/ml)	1	3.1
Medio condicionado fibroblastos s/SBF	1	3.4
Medio condicionado de fibroblastos, 1% SBF	1	4.7

Tabla III. Proporción de migración de las células CC y CT. La tabla muestra el resultado de uno de los experimentos de “herida” durante 4 días bajo las condiciones de cultivo señaladas. Se consideró el valor “1” de migración al número de células de la línea CC que se contaron en toda el área raspada. La proporción que se muestra refleja la cantidad de células que migraron en la línea CT con respecto a la CC.

8% SBF



MC 1% SBF

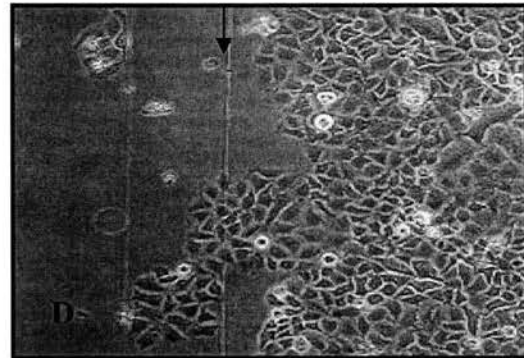
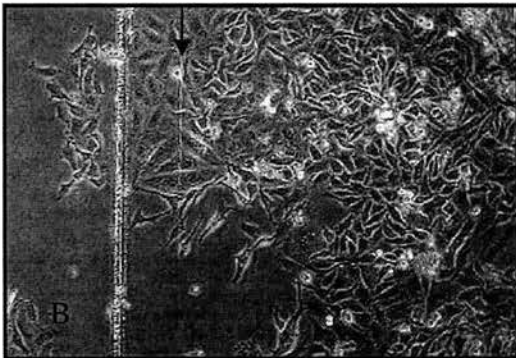
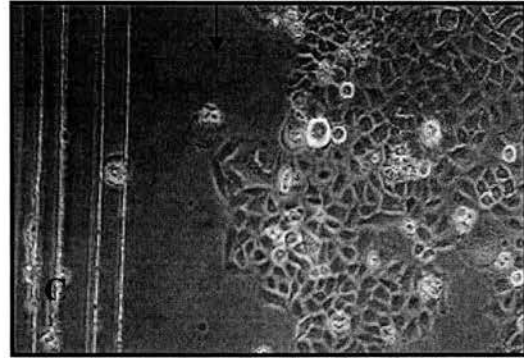


Figura 6. Ensayo de migración de “herida” de las células CC y CT. Las células CC y CT se cultivaron durante 4 días a las concentraciones de SBF indicadas (MC: medio condicionado de fibroblastos). Se contaron las células en las áreas raspadas bajo un microscopio óptico y se tomaron las fotografías mostradas (10X). A) y C) línea celular CC y B) y D) línea celular CT. La flecha muestra el área raspada (a su izquierda).

La sobre-expresión del TIMP-4 sensibiliza a células CaLo a diferentes estímulos apoptóticos

Se investigó si la sobre-expresión del TIMP-4 en las células CaLo modifica la sensibilidad a la muerte celular inducida por distintos estímulos (la privación de factores de crecimiento (SBF), el factor $TNF\alpha$, el ligando TRAIL y el etopósido) con ensayos de viabilidad con MTT y cristal violeta.

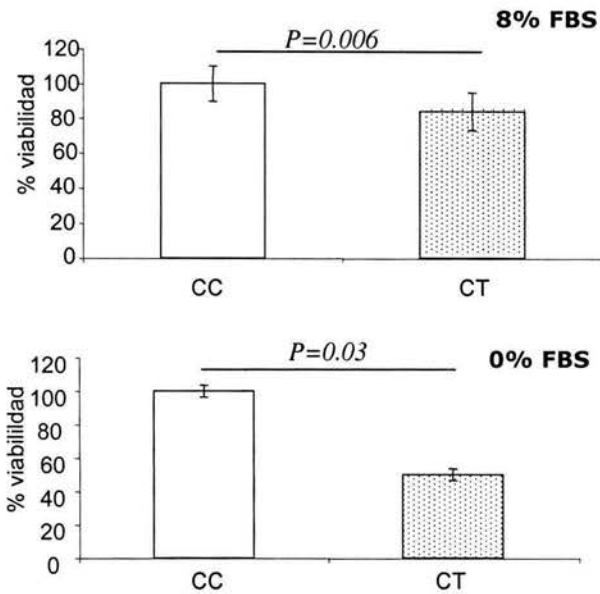
Debido a que el suero bovino fetal (SBF) comúnmente utilizado en el cultivo de las líneas celulares contiene una cantidad indeterminada de TIMP's (Hayakawa *et al.*, 1994), los experimentos se realizaron sin SBF.

En la gráfica 1 se muestra que las células CT que sobre-expresan TIMP-4, presentan una viabilidad 50% menor que la de las células CC después de 5 días en ausencia de factores de crecimiento ($p=0.03$). Cabe mencionar que se observó una viabilidad menor, no significativa estadísticamente, en las células CT aún en presencia de 8% de SBF. Se considero 100% de viabilidad a aquella de las células CC cultivadas en presencia de 8% de SBF o ausencia de suero durante 5 días.

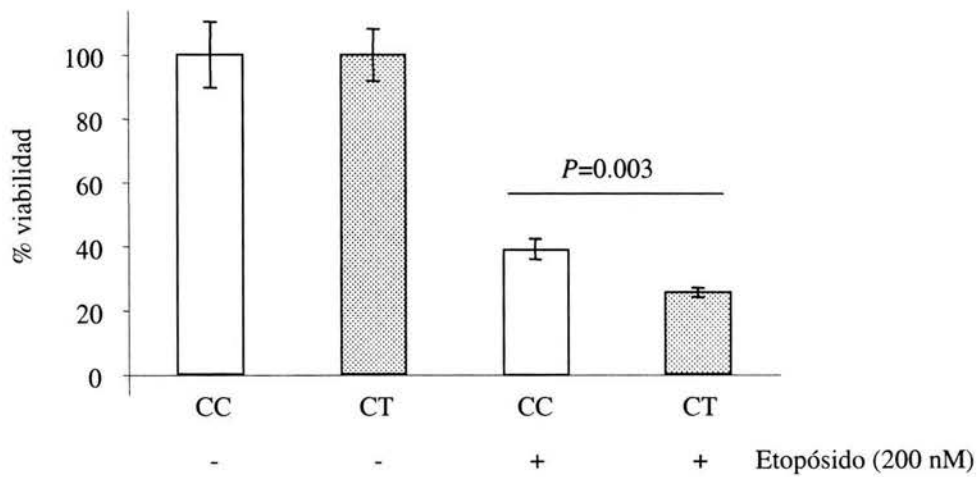
La viabilidad de las células CT también fue menor cuando se cultivaron en presencia de etopósido (200 nM) durante 48 horas (Gráfica 2).

La inducción de apoptosis con el ligando TRAIL (20 ng/ml) fue 50% mayor en las células CT después de 7 horas (Gráfica 3).

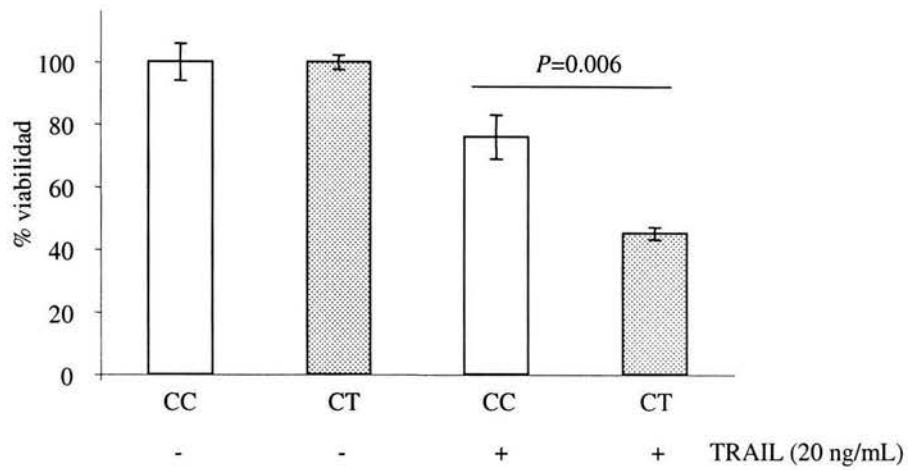
El factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$ (20 ng/ml) también provocó una disminución en la viabilidad en las células CT del 40% con respecto a las CC después de 36 horas (Gráfica 4).



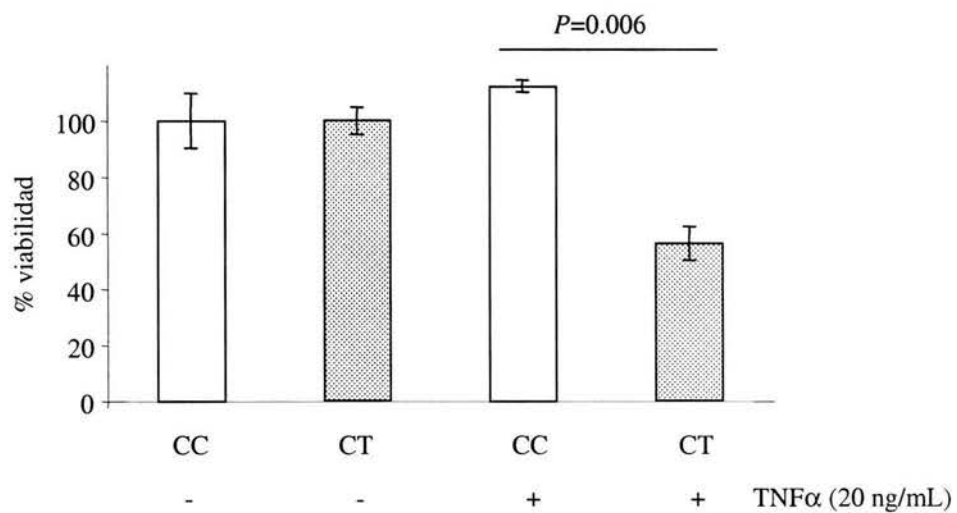
Gráfica 1. Ensayos de viabilidad de las células CC y CT durante 5 días a la concentración de SBF indicada. Se considero 100% de viabilidad a aquella de la línea celular CC en ambas concentraciones de SBF.



Gráfica 2. Ensayo de viabilidad celular de las células CC y CT tratadas con etopósido (200nM, 48 hrs.).



Gráfica 3. Ensayo de viabilidad de las células CC y CT expuestas al ligando TRAIL (20 ng/ml) durante 7 horas.

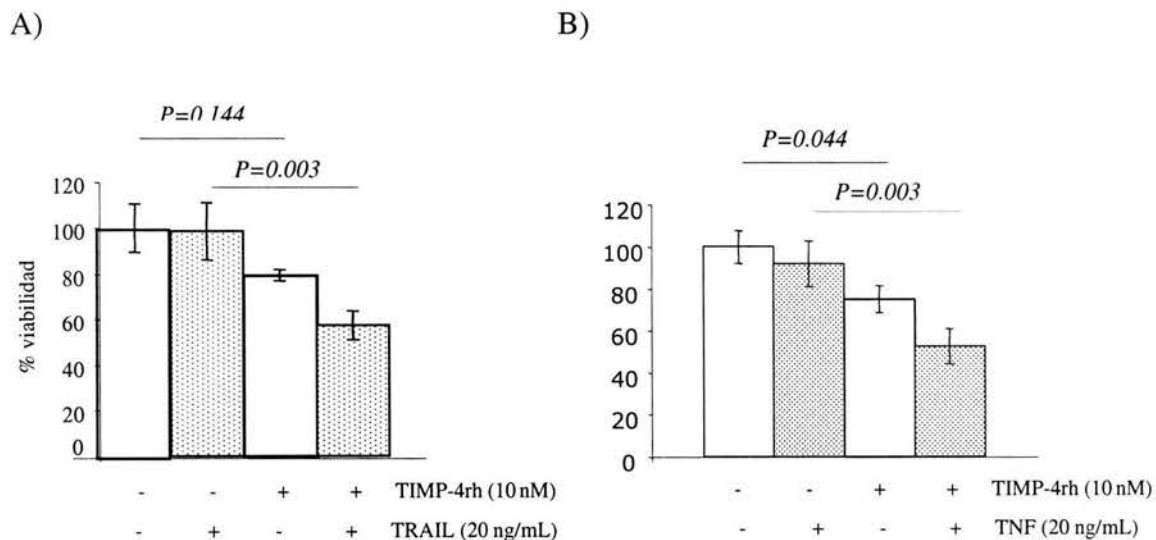


Gráfica 4. Ensayo de viabilidad de las células CC y CT expuestas al factor TNFα (20 ng/ml) durante 36 horas.

El efecto del TIMP-4rh en las líneas celulares CaLo y HeLa

Para comprobar los resultados obtenidos con el sistema de sobre-expresión estable del TIMP-4 se cultivaron las líneas celulares CaLo y HeLa durante 24 horas en ausencia de SBF. Posteriormente, se agregó TIMP-4 recombinante humano (TIMP-4rh, 10 nM) y se incubaron 48 horas. Las células CaLo se cultivaron con el ligando TRAIL (20 ng/ml) durante 7 horas. Se observó que la viabilidad (MTT) de las células tratadas con TIMP-4rh fue menor. Además las células CaLo pretratadas con TIMP-4rh fueron mas sensibles a la muerte por TRAIL (Gráfica 5, A).

Las células HeLa se incubaron con el factor TNF α (20 ng/ml) durante 48 hrs. Al igual que las células CaLo, las células HeLa presentaron una viabilidad menor en presencia del TIMP-4rh y una mayor sensibilidad a la muerte inducida por TNF α (Gráfica 5, B).



Gráfica 5. Ensayo de viabilidad (MTT) de las células CaLo (A) y HeLa (B) con TIMP-4 recombinante humano en ausencia de SBF. Después de 48 horas en presencia del TIMP-4rh, las células se incubaron con el factor TNF α (20 ng/ml) durante 48 horas (HeLa) o con el ligando TRAIL (20 ng/ml) por 7 horas (HeLa).

Los resultados anteriores sugirieron que el TIMP-4 inhibe la proliferación celular y/o que induce la apoptosis.

Análisis del ciclo celular en las líneas celulares CC y CT

Se realizaron distintos ensayos para determinar si los cambios en la viabilidad celular en las células que sobre-expresan TIMP-4 se debían a alteraciones en la progresión del ciclo celular y/o en la apoptosis,

Los cambios en la progresión del ciclo celular de las células CC y CT fueron determinados por citometría de flujo y se muestran en la tabla IV. Cuando las células se cultivaron en presencia de SBF, los porcentajes en las fases G0/G1, S y G2/M fueron similares para ambas líneas. En ausencia de SBF hay un pequeño aumento en el porcentaje de células CT en la fase G2/M y una disminución en la fase S, con respecto a las células CC (Tabla IV). Estos resultados sugirieron que los cambios notorios en la viabilidad celular pueden deberse principalmente a una mayor apoptosis en las células CT.

Fase del ciclo celular	CC 8% SBF	CT 8% SBF	CC 0% SBF	CT 0% SBF
G0-G1	51.52 %	49.58%	49.55%	45.25%
S	35.56%	35.03%	36.06%	29.96%
G2-M	12.925	15.39%	14,39%	24,79%

Tabla IV. Porcentajes de la población de células en cada fase del ciclo celular determinado por la detección del ioduro de propidio por citometría de flujo en las líneas CC y CT después de 5 días en cultivo a la concentración de SBF indicada.

Características de la muerte inducida por el TIMP-4 en las células Calo

Se analizaron algunas características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis inducida por el TIMP-4 en las células CC y CT con dos estímulos distintos: a) la privación de los factores de crecimiento y b) la activación de los receptores de muerte con el factor TNF α o el ligando TRAIL.

a) Privación de los factores de crecimiento

1) Detección de la anexina V

Se determinó el número de células apoptóticas a través de la detección del fosfolípido fostatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática por citometría de flujo (BD Pharmigen). Se encontró un 30% de células CC y un 59% de células CT positivas a la anexina después de 5 días en ausencia del SBF (Figura 7). La tinción paralela con yoduro de propidio permite identificar células que se encuentran en una fase tardía de la apoptosis o en necrosis. En la población de las células CC el 5% fue positiva a anexina V y en el grupo de células CT el 35%. Los resultados anteriores sugieren un porcentaje mayor de apoptosis en las células CT que en las CC.

2) Activación de caspasas

Se analizó la presencia y activación de las proteasas caspasas durante un curso temporal de 0, 2.5 y 5 días en ausencia del SBF en extractos protéicos totales de las líneas celulares CC y CT (Figura 8).

Se observó el precursor de la caspasa 9 (46 KDa) en los extractos de ambas líneas CC y CT en todos los tiempos estudiados. Las formas cortadas de dicha enzima (35 y 10 KDa) se observan a los 2.5 y 5 días en ambas líneas celulares.

El precursor de la caspasa 3 (32 KDa) se observó en los extractos de ambas líneas celulares durante todo el curso temporal. La proteína PARP (poli (ADP)-ribosa polimerasa) sustrato de la caspasa 3, se observó en ambas líneas celulares CC y CT en el tiempo 0 (89 KDa); sin embargo, posteriormente no se detectó. La forma cortada de PARP se detectó a los 2.5 y 5 días de privación de los factores de crecimiento en ambas líneas celulares CC y CT (24 KDa).

La pro-caspasa 8 (47 KDa) se detectó en los extractos de las dos líneas celulares CC y CT durante el curso temporal. La subunidad p30 se encontró en las ambas líneas en el tiempo 0, pero no en los subsiguientes. Sorprendentemente, la activación total de la caspasa 8 se observó en la línea celular CT en el tiempo 0 (subunidad de 17 KDa).

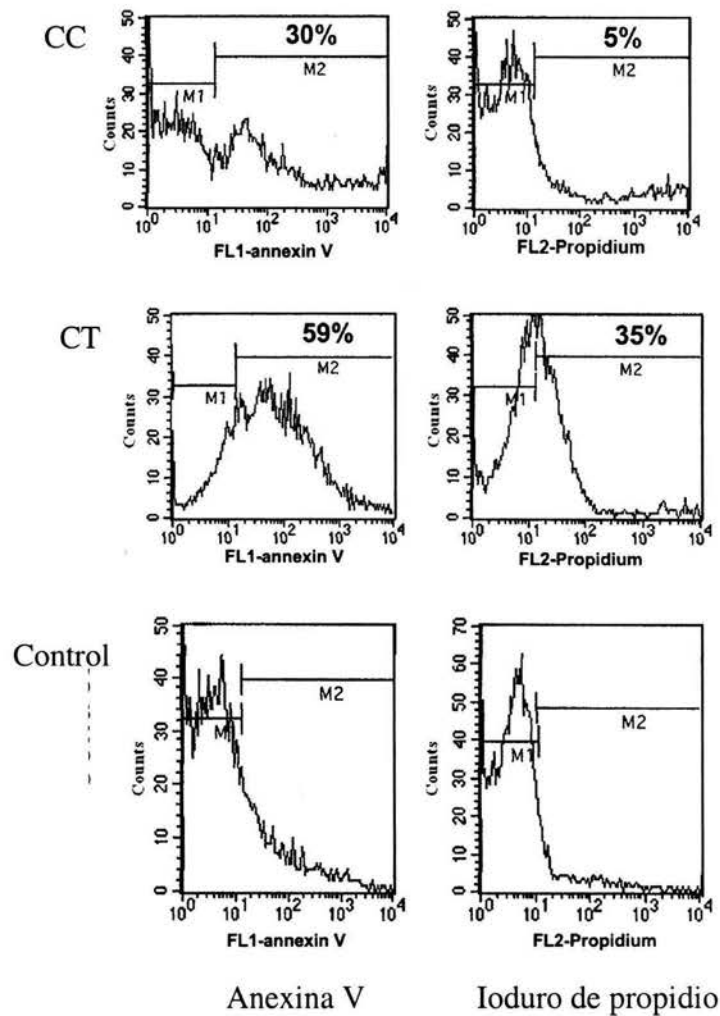


Figura 7. Detección de la Anexina en la superficie de las células CC y CT por citometría de flujo. Las células CC y CT se cultivaron en ausencia de SBF durante 5 días y se analizó el cambio de la fosfatidil-serina (unida a Anexina V). Las células CC en cultivo en presencia de SBF se muestran como control.

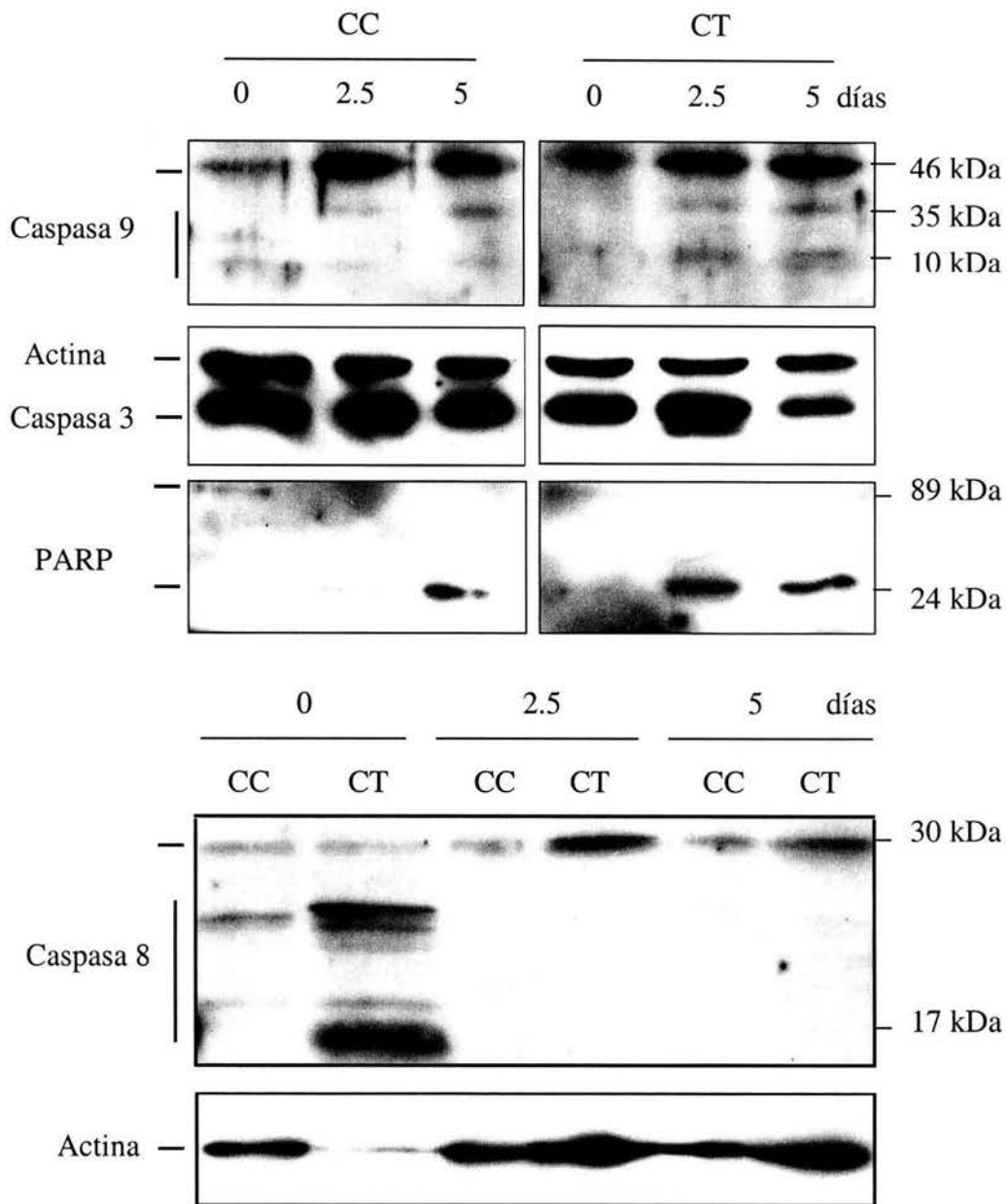


Figura 8. Activación de caspasas en las células CC y CT cultivadas en ausencia de SBF. Western blot's que muestran la activación de las caspasas durante el curso temporal mostrado en ausencia de SBF. La actina se utilizó como control de carga.

b) Activación de los receptores de muerte

1) Morfología apoptótica

Las líneas celulares CC y CT se estimularon como se mencionó previamente con el ligando TRAIL (20 ng/ml) durante 7 horas y se observó su morfología bajo el microscopio óptico invertido (Figura 9). Las células con morfología apoptótica observada en ambas líneas coincide con los resultados de viabilidad celular antes mostrados.

2) Tinción con de los núcleos con bromuro de etidio

Se determinó la fragmentación del DNA en los núcleos en las líneas celulares CC y CT con una tinción con bromuro de etidio cuando se trataron con el ligando TRAIL (20 ng/ml) durante 7 horas. Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia y se encontró una mayor fragmentación del DNA en los núcleos de las células CT incubadas con el ligando TRAIL (Figura 10).

Inhibición de la activación de la vía de Akt

Una de las principales vías de transducción de señales inducida por los factores de crecimiento en las células de los mamíferos es la vía de la cinasa Akt. En presencia de los factores de crecimiento la cinasa Akt se encuentra fosforilada y promueve el crecimiento celular, la proliferación e inhibe la apoptosis a través de varios mecanismos (Elstrom *et al.*, 2004). Debido a que el TIMP-4 induce la muerte celular en ausencia de los factores de crecimiento, se investigó si la cinasa Akt se desfosforila antes en las células CT que en las CC.

Se realizó un curso temporal en ausencia de suero en ambas líneas celulares y la presencia y la fosforilación de Akt fueron evaluados en los extractos totales. Se observó que la proteína Akt fosforilada está presente en ambas líneas celulares CC y CT en el tiempo 0. Sin embargo, después de 20 min en ausencia de factores de crecimiento no se detectó en ninguna de las líneas celulares (Figura 11). Estos resultados sugieren que probablemente la inhibición de la vía de Akt no es el mecanismo empleado por el TIMP-4 para inhibir el crecimiento celular e inducir la apoptosis.

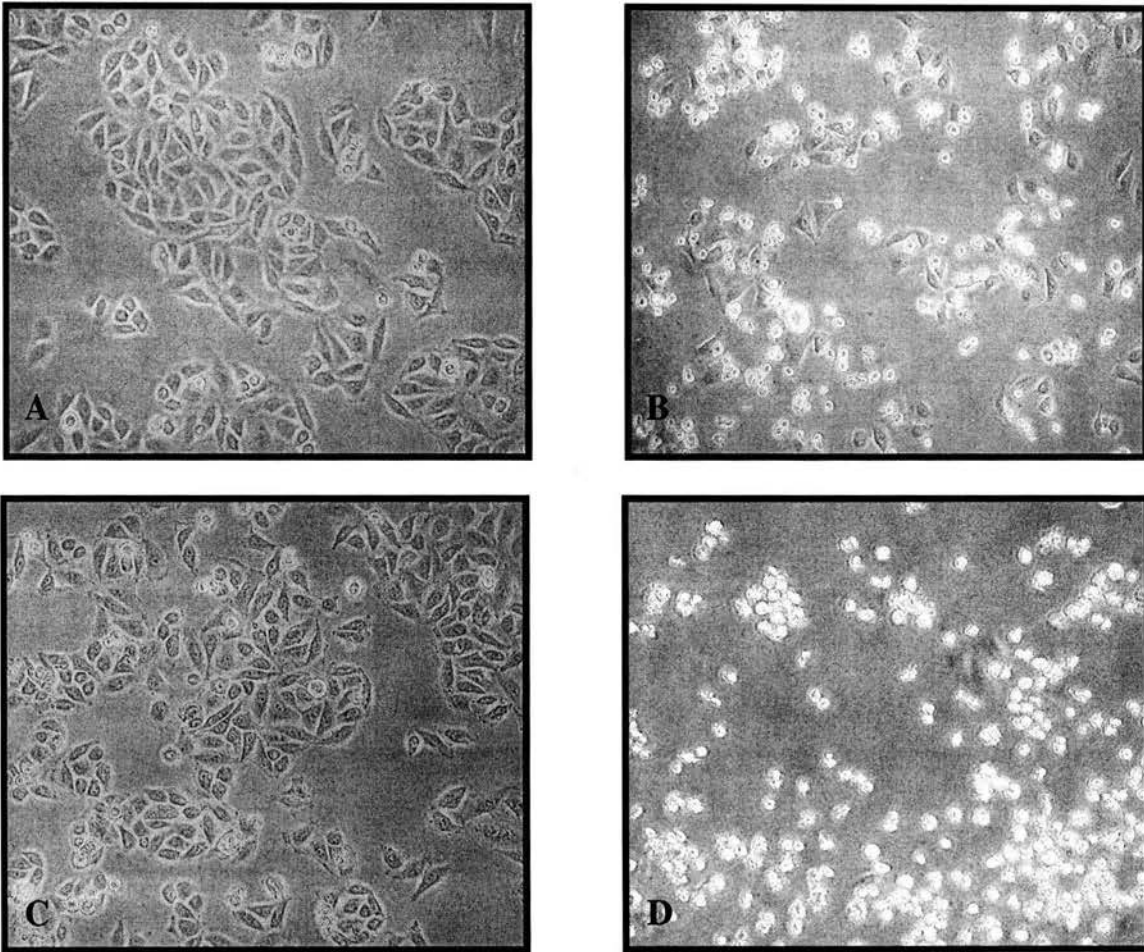


Figura 9. Morfología de las células CC y CT. Las células CC y CT se cultivaron en ausencia de SBF y se les agregó TRAIL (20 ng/ml, 7h.). (Fotografías con un lente objetivo 20X). A) células CC control, B) células CC con TRAIL, C) células CT control y D) células CT con TRAIL.

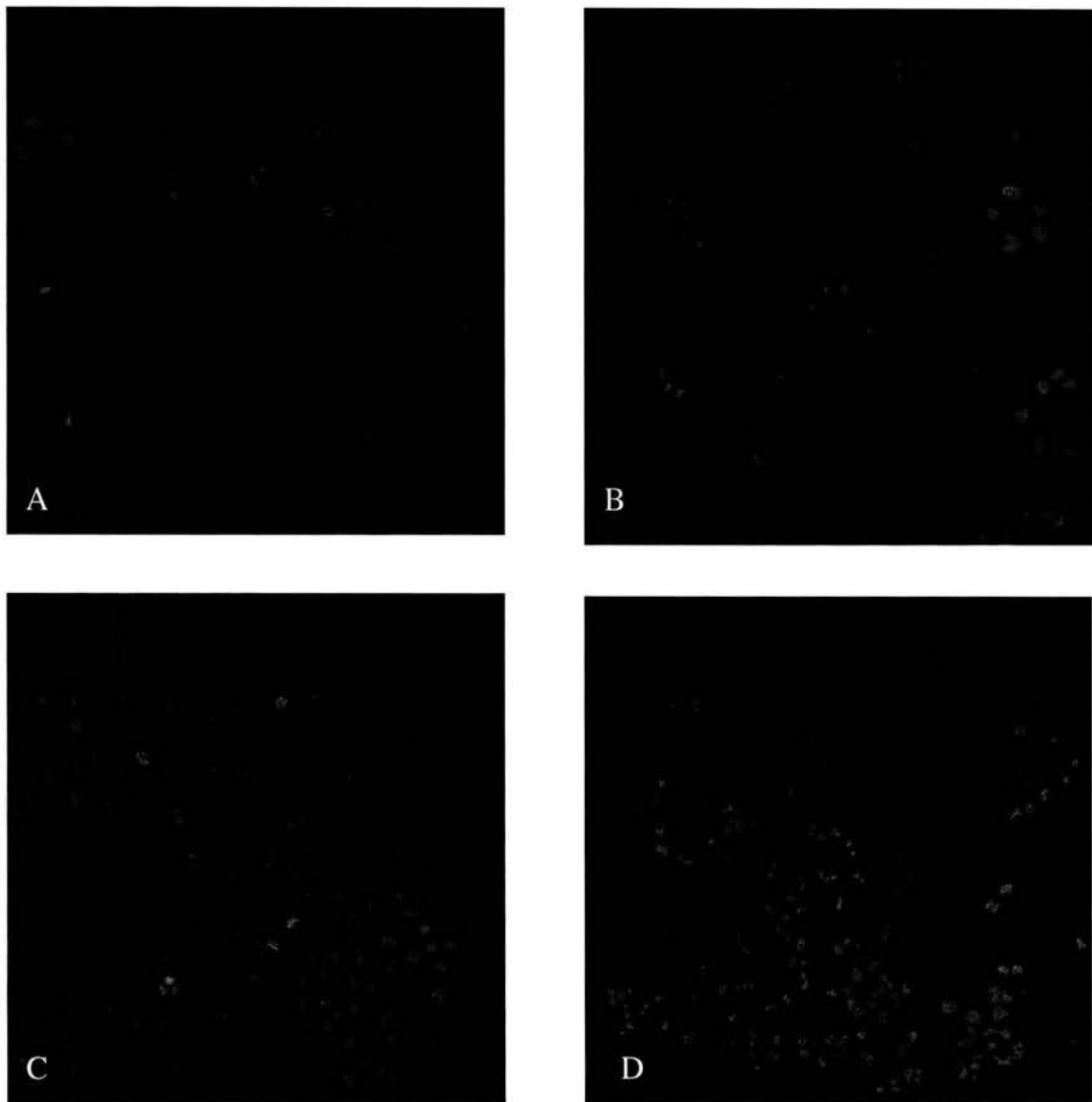


Figura 10. Tinción de núcleos de las células CC y CT con bromuro de etidio. Las células CC y CT se cultivaron en ausencia de SBF durante 24 horas y se les agregó TRAIL (20 ng/ml, 7h.) (Fotografías tomadas con un lente objetivo 20X, microscopía de fluorescencia). A) células CC control, B) células CC con TRAIL, C) células CT control y D) células CT con TRAIL.

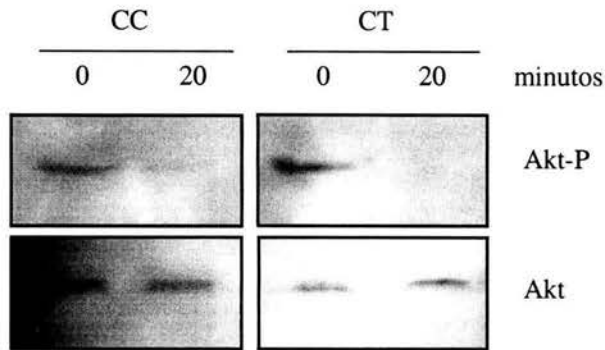


Figura 11. Fosforilación de la cinasa Akt en las células CC y CT. Western blot de la cinasa Akt fosforilada (Akt-P) y no fosforilada (Akt) en extractos protéicos totales de las células CC y CT cultivadas en ausencia de SBF durante el tiempo indicado.

Análisis de los componentes del complejo inductor de muerte

Se ha propuesto que las proteínas presentes en el complejo inductor de muerte de los receptores (DISC) influye en el “destino” de las células en presencia de un estímulo apoptótico (Danial y Korsmeyer, 2004). Como se mostró anteriormente, la caspasa 8 se encuentra activa en las células CT que sobre-expresan TIMP-4 en ausencia de algún estímulo apoptótico. Debido a lo anterior, se analizó la presencia de las proteínas que conforman el DISC en extractos protéicos membranales y totales de las líneas celulares CC y CT.

En condiciones de cultivo convencionales (8% SBF), las células CC y CT expresan los receptores para TNF, los TNF-RI y RII. Sin embargo, las proteínas adaptadoras TRADD y TRAF-2 están presentes en menor cantidad en las células CT que en las CC (Figura 12).

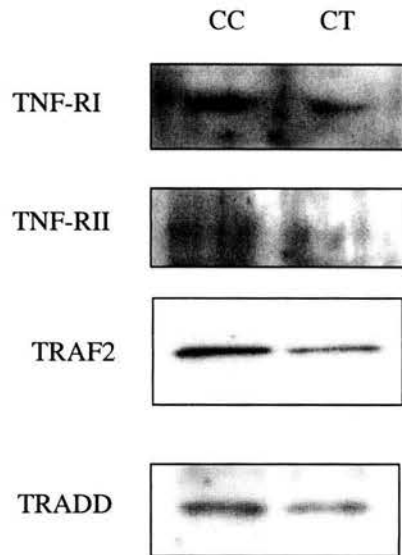


Figura 12. Proteínas del complejo inductor de muerte (DISC) de las células CC y CT. Western blot para los receptores de TNF, TNF-RI y RII y para las proteínas TRAF2, TRADD (extractos membranales) de las células CC y CT cultivadas con 8% de SBF.

La vía del factor transcripcional NF κ B

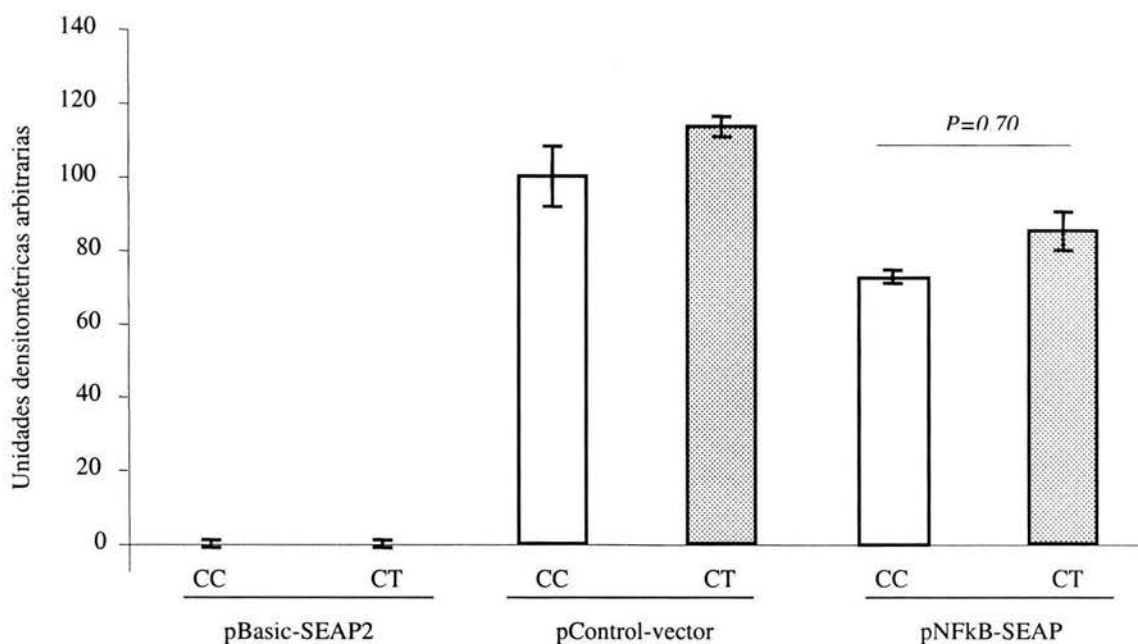
a) Actividad transcripcional

Los receptores de muerte del TNF pueden inducir la activación de la pro-caspasa-8 así como la vía de señalización del factor transcripcional NF κ B. Esta vía se ha relacionado principalmente con la supervivencia celular y la proliferación y se pensó que podría estar alterada o disminuida en las células que sobre-expresan TIMP-4. Para investigar lo anterior, se midió la actividad transcripcional de factor NF κ B con un ensayo de gen reportero con la fosfatasa alcalina. Se utilizó el vector pHM6/*LacZ* como control de transfección interno, midiendo la actividad de β -galactosidasa.

Se midió la actividad de fosfatasa alcalina en ambas líneas celulares CC y CT sin transfectar, transfectadas con el vector pBASIC-SEAP2 (control de transfección sin el gen de la fosfatasa alcalina), con el vector pCONTROL-SEAP (control positivo de transfección que contiene el gen de la fosfatasa alcalina bajo un promotor del virus SV40)

y con el vector que lleva el gen para la fosfatasa alcalina humana bajo un promotor formado por 4 sitios κ B, el plásmido pNF κ B-SEAP (Clontech).

Se encontró que la actividad de NF κ B es prácticamente igual en las células CC y CT (Gráfica 4), a pesar de que la eficiencia de transfección es mayor en las células CT. Estos resultados sugieren que la vía de sobrevivencia inducida por el factor NF κ B es activa en ambas líneas celulares CC y CT.



Gráfica 4. Actividad del factor transcripcional NF κ B en las células CC y CT. Ensayo de gen reportero en el que se muestra la actividad de fosfatasa alcalina (unidades densitométricas arbitrarias) en el medio de cultivo de las células CC y CT en ausencia de SBF. Se muestran las células transfectadas con el vector pBasic-SEAP2 (control negativo), con el vector pControl-SEAP (control positivo) y con el vector pNF κ B-SEAP.

b) Las proteínas de la familia de IκB

La actividad del factor NFκB está regulada por la unión a las proteínas IκB's (Karin y Lin, 2002). Se analizó la acumulación del mRNA para IκBα, IκBβ, IκBε y Bcl-3 así como la presencia de estas proteínas en los extractos totales obtenidos de las células CC y CT.

La expresión del mRNA para IκBα, IκBβ y Bcl-3, normalizada con el mRNA de la GAPDH, es mayor en las células CT que en las CC. El mRNA para IκBε está presente en igual cantidad en las células CC y CT (Figura 13, B).

La proteína IκBα se encontró en mayor cantidad en la células CT que en las células CC. Sin embargo, la cantidad de IκBβ es menor en las células CT que en las CC (Figura 13, A). La proteína Bcl-3 está presente en ambos tipos celulares. Estos resultados sugieren que el factor NFκB está activo en ambos líneas celulares CC y CT.

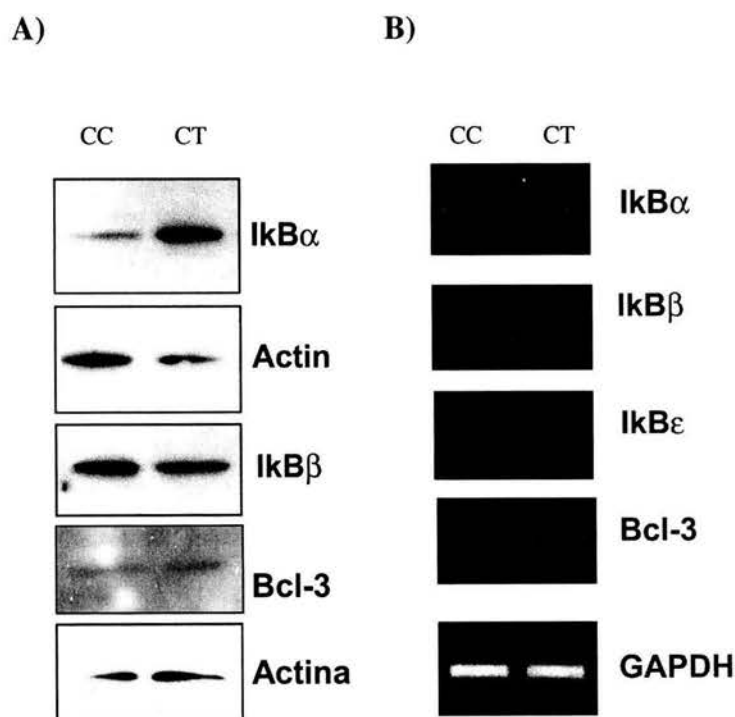


Figura 13. Presencia de los mRNA's y las proteínas IκB's en las células CC y CT. RT-PCR (B) y Western blot (A) de los mRNA's y de los extractos protéicos totales obtenidos de las células CC y CT cultivados con SBF al 8%.

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis, IAP's

Las IAP's son proteínas que regulan la muerte celular por lo que podrían estar implicadas en la apoptosis inducida por el TIMP-4. Además, la expresión de los genes para cIAP-1 y cIAP-2 es regulada por el factor NFκB. Por estas razones, se investigó la acumulación del mRNA para cIAP-1, survivina y XIAP en las células CC y CT.

La cantidad del mRNA para XIAP y para la survivina, normalizando con respecto al mRNA de la GAPDH, es similar en las células CC y CT. La expresión del mRNA para c-IAP-1 fue mayor en las células CT con respecto a las CC. Además, se observó que las proteínas XIAP y cIAP-1 están presentes en las células CC y CT (Figura 14).

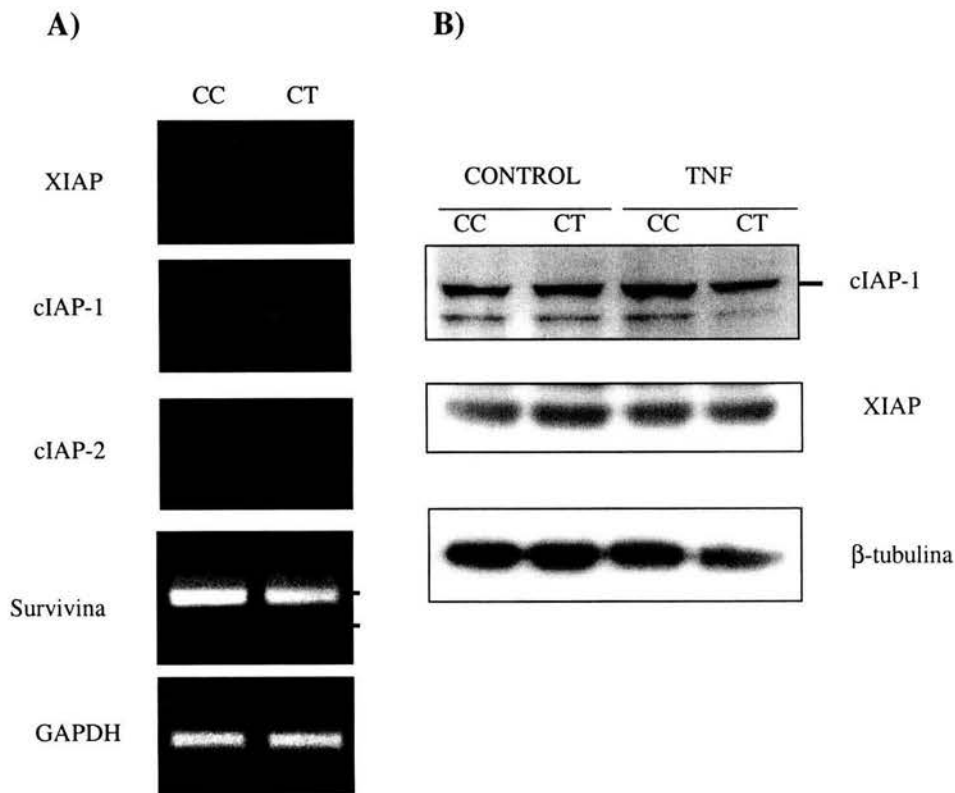


Figura 14. Presencia de los mRNA's de las IAP's y de la proteínas XIAP y cIAP-1 en las células CC y CT cultivadas con SBF al 8%. A) RT-PCR's de los mRNA's indicados y B) Western blot de la proteínas cIAP-1 y XIAP en las células CC y CT control (8% SBF) y tratadas con TNF α (20 ng/ml, 36h.)

Las proteínas semejantes a caspasas, FLIP's

La muerte celular inducida por la vía de los receptores puede ser regulada por las proteínas FLIP. La expresión de éstas es regulada también por el factor NFκB. Debido a que las células CT son más sensibles a la apoptosis inducida por el ligando TRAIL y el factor TNFα, se investigó la expresión de los mRNA's y de las proteínas FLIP.

La acumulación del mRNA de FLIP_R y de FLIP_S fue menor en las células CT que en las CC, normalizando con el mRNA para la GAPDH. Las proteínas FLIP_S se encontró en la misma proporción en ambas líneas celulares; sin embargo, la proteína FLIP_R se observó en menor cantidad en las células CT (Figura 15). Estos hallazgos sugieren que la sensibilidad a la apoptosis en las células CT puede ser consecuencia en parte de la ausencia de FLIP_R.

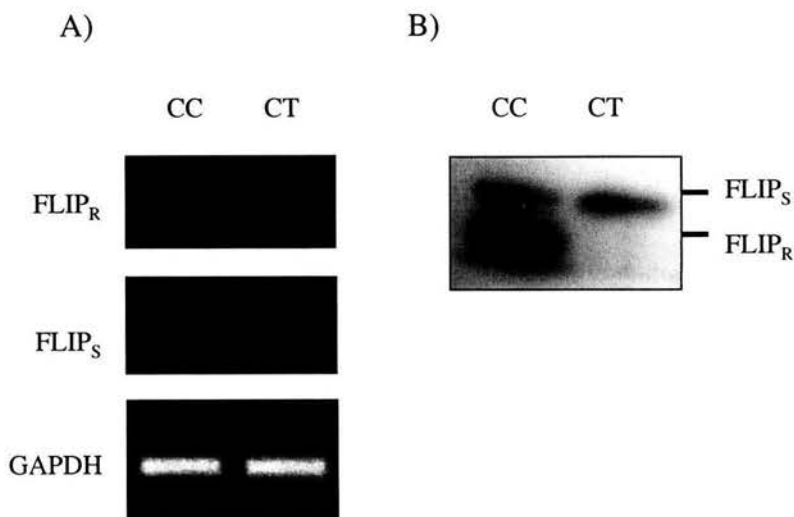


Figura 15. Presencia de los FLIP's en las células CC y CT. A) RT-PCR de los mRNA's de FLIP_R y FLIP_S de las células CC y CT. B) Western blot de los FLIP_R y FLIP_S en extractos protéicos de las células CC y CT.

Las proteínas de la familia de Bcl-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la muerte celular por la vía de la mitocondria. Estas proteínas son reguladas a nivel transcripcional y postranscripcional y se ha propuesto que la relación de los miembros antiapoptóticos y los apoptóticos influye en la vida de las células (Lowe *et al.*, 2004). Además, se ha estudiado la expresión de Bcl-2, Bax y Mcl-1 en muestras de pacientes con CaCu y se consideran de pronóstico bueno (Chung *et al.*, 2002). Debido a lo anterior, se analizó la expresión de algunos de los miembros de esta familia en los extractos protéicos de las células CC y CT.

Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (extractos mitocondriales y citosólicos) y Mcl-1 (extracto citosólico) están presentes en menor cantidad en las células CT que en las control CC. Sorprendentemente, los miembros apoptóticos de esta familia, las proteínas Bak (extracto mitocondrial) y Bid (extractos citosólicos) presentan un incremento en su expresión en las células CT que en las CC (Figura 16). Estos resultados sugieren que la sensibilidad a la apoptosis de las células Calo que sobre-expresan TIMP-4 puede deberse en parte a una menor relación entre los miembros antiapoptóticos y los apoptóticos de la familia de Bcl-2.

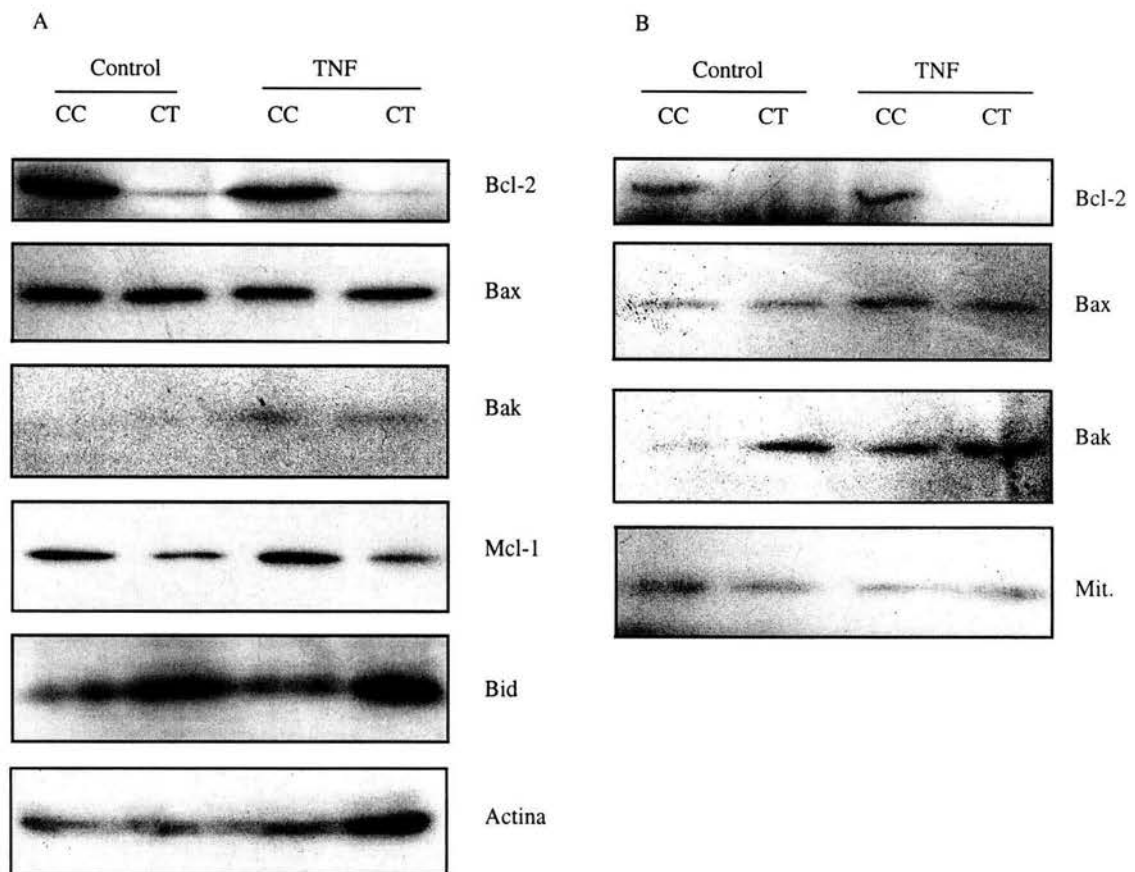


Figura 16. Presencia de las proteínas de la familia de Bcl-2 en las células CC y CT. Western blot en A) extractos citosólicos y B) extractos mitocondriales de las células CC y CT cultivadas con 8% (control) y en presencia de TNF α (20 ng/ml, 36h). La actina y un anticuerpo anti-mitocondria (“mit”) se emplearon como controles de carga.

DISCUSIÓN

Expresión de las MMP's y los TIMP's en CaCu

La expresión del TIMP-4 se ha relacionado con la progresión tumoral y la inhibición de la apoptosis en los cánceres de mamá y endometrial. Sin embargo, en los gliomas y en el tumor de Wilms se le ha propuesto un efecto antitumoral. Al igual que los demás TIMP's, el TIMP-4 podría inducir efectos distintos en las células provenientes de diferentes tejidos.

Varios trabajos han demostrado la expresión de las MMP's (2, 9 y 14) y de los TIMP's (1-3) en las muestras de pacientes con CaCu (Nuovo *et al.*, 1995; Garzetti *et al.*, 1996; Gilles *et al.*, 1996; Asha Nair *et al.*, 2003; Sheu *et al.*, 2003). Los TIMP's 1 y 2 se encuentran sobre-expresados en las células tumorales de muestras de pacientes con carcinoma escamoso cervical; no obstante, no se ha encontrado una relación clara con los parámetros clínicos estudiados y esta sobre-expresión. También se ha observado que las enzimas MMP-2 y 9 tienen una mayor actividad gelatinolítica en estadios más avanzados de CaCu. Sin embargo, en estos trabajos no se han estudiado las posibles funciones de los TIMP's.

Los TIMP's son proteínas multifuncionales que regulan la proliferación, la muerte y la migración de las células, así como la angiogénesis. Esas funciones pueden ser dependientes o independientes de su capacidad para inhibir a las MMP's. Se ha propuesto que la función de cada TIMP depende del contexto celular en que se encuentre, de la concentración, del tiempo y de la presencia de un posible receptor (Jiang *et al.*, 2002). En un fase inicial, los TIMP's podrían actuar como factores de crecimiento e inhibidores de la apoptosis (Nemeth y Goolsby, 1993; Wang *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Posteriormente, en etapas avanzadas, los TIMP's podrían inhibir la progresión tumoral debido a su actividad anti-MMP's y la inhibición de la angiogénesis (Edwards, 2001; Handsley y Edwards, 2005).

En esta investigación, se determinó la expresión del mRNA para el TIMP-4 de novo en las muestras de las pacientes con CaCu. Los niveles de expresión mayores del TIMP-4 se encontraron en los estadios clínicos más avanzados (Tabla II). Sin embargo, los análisis estadísticos no mostraron que el TIMP-4 sea un factor pronóstico (prueba de

log rank). Podría pensarse que la sobre-expresión del TIMP-4 es un cambio que ocurre en estadios tempranos y que se mantiene conforme avanza la neoplasia. El análisis de la expresión del TIMP-4 en neoplasias intraepiteliales y en displasias cervicales permitiría explorar esta idea. Cabe mencionar, que el número de muestra fue pequeño y que una aumento en éste permitiría un mejor análisis estadístico.

Adicionalmente, se determinó que algunas líneas celulares derivadas de CaCu expresan el mRNA para TIMP-4. La acumulación de este transcrito, con respecto al control interno GAPDH, fue menor en las células HeLa y CaLo que en las células Siha y Caski (Figura 4). Estos resultados sugieren que el TIMP-4 podría ser un auxiliar en el diagnóstico en el CaCu y que esta proteína podría participar en la progresión del CaCu.

Se decidió estudiar las posibles funciones del TIMP-4 en líneas celulares derivadas del CaCu. Se eligió la línea celular derivada de una paciente mexicana con CaCu, denominada CaLo (Caceres-Cortes *et al.*, 2001), para establecer un sistema de sobre-expresión del TIMP-4 basado en vectores retrovirales comerciales. Las nuevas líneas celulares obtenidas se denominaron CC (pLXSN) y CT (pLXSN-TIMP-4).

El efecto del TIMP-4 en las células de CaCu.

Los experimentos con las líneas celulares CC y CT se realizaron en ausencia de suero, debido a que se ha determinado que en éste se presenta cierta cantidad de los TIMP's (Hayakawa *et al.*, 1992 y 1994).

La migración celular

Se analizó la capacidad de migración de las células CaLo, CC y CT. Se observó que las células CT poseen una capacidad de migración mayor que las CC bajo distintas condiciones (Figura 6 y Tabla III). En contraste, algunos estudios han mostrado que el TIMP-4 inhibe la migración celular (Guo *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos los TIMP's pueden promover la migración celular. Roeb y sus colaboradores (1999 y 2005) mostraron que la sobre-expresión del TIMP-1 provoca un incremento en la migración de las células de hepatoma. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el TIMP-1 lleva a a cabo esta función. Podría pensarse que si el TIMP-4 provoca la migración de las células de CaCu, esta función podría promover la

carcinogénesis del cervix. Además, el hallazgo anterior podría relacionarse con la presencia de esta proteína en las muestras de pacientes con CaCu invasor.

Varios trabajos han mostrado que el TIMP-4 inhibe el crecimiento tumoral. El grupo de Eric Shi, sobre-expresó el TIMP-4 en las células de cáncer de mama y mostró que éste inhibe la formación de tumores en un modelo de ratonas desnudas. Cabe mencionar, que las células de cáncer de mama que sobre-expresaban TIMP-4 eran las células que infiltraban en los tejidos (Wang *et al.*, 1997).

La viabilidad celular

Se investigó si este inhibidor presentaba un efecto sobre la viabilidad en las células de CaCu. Los resultados obtenidos muestran que hay una mayor sensibilidad a la muerte cuando el TIMP-4 se sobre-expresa en las células CaLo. Este efecto fue observado cuando las células CaLo se trataron con varios estímulos apoptóticos, como la privación de factores de crecimiento, el etopósido, el ligando TRAIL y el factor TNF α , a concentraciones reportadas en la literatura (Gráficas 1-4).

Para corroborar estos resultados, las líneas celulares CaLo y HeLa se incubaron con TIMP-4 recombinante humano y posteriormente con el ligando TRAIL o el factor TNF α para inducir muerte, como en los experimentos llevados a cabo en el sistema de sobre-expresión. Se observó que las células incubadas previamente con el TIMP-4 recombinante humano son más sensibles a la muerte, en concordancia con los resultados obtenidos con el sistema de sobre-expresión (Gráfica 5). Ahonen y sus colaboradores (2003) mostraron que el TIMP-3 recombinante induce apoptosis a una concentración de 25 nM. En concordancia, se observó que el TIMP-4 recombinante sensibiliza a la apoptosis a una concentración de 10 nM. Estos resultados apoyan la idea de que la función efectuada por los TIMP's depende de su concentración (Ahonen *et al.*, 2003 y Jiang *et al.*, 2002).

Se ha mostrado que la pérdida de la expresión del TIMP-4 se asocia con el desarrollo del tumor de Wilms. Cuando se re-estableció la expresión del TIMP-4 en las células tumorales derivadas de esta neoplasia (como en un riñón sano), se inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de ratonas desnudas (Celiker *et al.*, 2001). Tummalapalli y colaboradores (2001) observaron que el TIMP-4 promueve la apoptosis de los fibroblastos de corazón. Sin embargo, el TIMP-4 no tiene este efecto sólo en las células tumorales. Recientemente, Guo y sus colaboradores (2004) demostraron que el TIMP-4 induce la apoptosis de las células de músculo liso vasculares sin modificar su

proliferación.

Los resultados obtenidos en la presente investigación pueden sumarse a los hallazgos anteriores: en ciertos tipos celulares, el TIMP-4 puede inhibir el crecimiento celular; sin embargo, no se conoce el mecanismo. En este proyecto, se inició el análisis de la(s) posible(s) vía(s) de transducción inducidas por el TIMP-4.

El TIMP-4 induce apoptosis en las células CaLo

Se analizaron algunas características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis para determinar si el efecto del TIMP-4 en las células CaLo se debe a la inducción de la muerte o a cambios en la proliferación celular.

Los resultados obtenidos muestran la morfología apoptótica de las células, así como el cambio del fosfolípido fostatidil-serina en la membrana plasmática y la activación de las caspasas en las células que sobre-expresan TIMP-4 (Figuras 7, 8, 9 y 10).

Paralelamente, se analizó la progresión en el ciclo celular de las líneas CC y CT. En concordancia con los resultados reportados (Guo *et al.*, 2004), se observaron pocos cambios en la proporción de células en las diferentes fases del ciclo entre ambas líneas celulares (Tabla IV). Los resultados obtenidos sugieren que el TIMP-4 inhibe el crecimiento celular debido a que promueve o induce la apoptosis.

Proteínas apoptóticas en las células CC y CT

La sobre-expresión del TIMP-4 sensibiliza a las células CaLo a la apoptosis por estímulos que activan las 2 vías descritas para este tipo de muerte. Por lo anterior, se investigó la presencia de las proteínas pertenecientes a varias familias que regulan la apoptosis.

1. La vía de la cinasa Akt

Se pensó que un mecanismo utilizado por el TIMP-4 para inducir la apoptosis por la ausencia de SBF podría ser la inhibición de la vía de Akt (Vivanco y Sawyers, 2002). Sin embargo, se encontró que después de 20 minutos de cultivo en ausencia de SBF, la cinasa Akt está desfosforilada en ambas líneas celulares (Figura 11). Estos resultados sugirieron que la vía de Akt no está implicada en la vía de transducción inducida por el TIMP-4.

2. La familia de las IAP's

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las IAP's, regulan la activación de las caspasas. Se observó que las células que sobre-expresan TIMP-4 tienen más mRNA para cIAP-1 y c-IAP-2. La cantidad de proteína c-IAP-1 en los extractos de proteínas totales fue similar en ambas líneas celulares CC y CT (Figura 14). La expresión nuclear de la proteína cIAP-1 se ha relacionado con la resistencia a la radioterapia en las células de CaCu (Imoto *et al.*, 2002). Sin embargo, las células que sobre-expresan el TIMP-4 son más sensibles a otros estímulos apoptóticos, por lo que sería interesante evaluar el efecto de la radiación como estímulo apoptótico en este sistema.

Por otra parte, el mRNA y la proteína XIAP están presentes en mayor cantidad en las células CT. Las IAP's, como se discutirá, también regulan la formación de los complejos inductores de muerte por la vía de apoptosis extrínseca y el destino de las células y su expresión es regulada por la vía del factor transcripcional NFκB (Wang *et al.*, 1998; Danial y Korsmeyer, 2004).

3. La familia de Bcl-2

La sobre-expresión de Bcl-2 es común en varios tipos de cáncer y en particular, de las proteínas Bcl-2, Mcl-1 y Bax en muestras de pacientes con CaCu (Crawford *et al.*, 1998). Estas proteínas regulan la integridad de la membrana mitocondrial y la apoptosis; además pueden interactuar con otras proteínas fuera de la mitocondria y regular otras vías de transducción de la señal como se discutirá más adelante (Regula *et al.*, 2002; Kirkin *et al.*, 2004).

En este estudio se encontró que las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 están presentes en menor cantidad en las células CaLo que sobre-expresan TIMP-4 (Figura 16). De manera inversa, las proteínas apoptóticas Bak y Bid incrementan en las células CT (Figura 16). La modulación de la expresión de estas proteínas podría explicar en parte porque las células CT son más sensibles a la apoptosis por diferentes estímulos. En concordancia con estos resultados, Jiang y sus colaboradores (2001) encontraron que el TIMP-4 induce la sobre-expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L en las células de cáncer de mama. Además, otros TIMP's, regulan los niveles de estas proteínas (Lambert *et al.*, 2003).

4. Los FLIP's

Se observó que la acumulación de los mRNA para los FLIP_R y FLIP_S es menor en las células CT. A nivel de proteína se observó que FLIP_R también disminuye en las células que sobre-expresan TIMP-4 (Figura 15). La actividad de las caspasas 8 y 10 es regulada en parte por las proteínas FLIP que compiten por la unión a la proteína adaptadora FADD en los complejos de los receptores de muerte (Scaffidi *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2004; Kreuz *et al.*, 2004; Golks *et al.*, 2005). Como consecuencia de lo anterior, las células CT podrían ser más sensibles a TRAIL y TNF α y presentar una mayor activación de la caspasa 8 debido a la menor cantidad de FLIP.

5. El complejo inductor de muerte en las células CaLo

Las células CaLo que sobre-expresan TIMP-4 son más sensibles a la muerte inducida por TRAIL y TNF α probablemente debido a que presentan una mayor actividad de caspasa 8 (Figura 12). Esto sugiere que las células CT son más sensibles a la apoptosis debido a una mayor activación de la vía de los receptores de muerte.

El DISC está conformado por proteínas adaptadoras que se unen a la parte citoplásmica de los receptores de muerte las cuales participan en la activación de la pro-caspasa-8. En algunas células la activación de esta caspasa es suficiente para inducir la apoptosis ("células tipo I"). Sin embargo, en las "células tipo II", la caspasa 8 corta a la proteína Bid de la familia de Bcl-2, ésta se transloca a la mitocondria e induce la liberación de factores apoptóticos. Como se mencionó, las células CT presentan una mayor cantidad de la proteína Bid, lo cual podría potenciar la apoptosis estimulada por los ligandos de los receptores con la inducida por la mitocondria. Por otra lado, se sabe también que algunos receptores de muerte además pueden inducir la proliferación celular en ciertas circunstancias. Se piensa que la decisión entre ambos efectos se debe en parte a la formación de complejos distintos (Danial y Korsmeyer, 2004).

Se analizó la presencia de los componentes del complejo inductor de muerte, el DISC, para determinar alguna diferencia entre las líneas celulares CC y CT. Se observó una disminución en la cantidad de las proteínas adaptadoras TRAF-2 y TRADD en las células CT con respecto a las CC (Figura 12). Se ha propuesto que se forma un complejo inicial en el receptor de TNF-R1 ("complejo I") conformado por las proteínas TRADD, TRAF-2, cIAP-1, y la cinasa RIP. Este complejo I recluta y activa a las cinasas IKK's (cinasas de I κ B's), las cuales fosforilan a los inhibidores del factor transcripcional NF κ B, los I κ B's, permitiendo que NF κ B induzca la sobrevivencia celular. Posteriormente, TRADD se disocia del receptor y se une a FADD y a la caspasa 8 ("complejo II"). En

este modelo el resultado entre la activación de los complejos I y II depende de la presencia de las FLIP's (Micheau y Tschopp, 2003).

En la presente investigación se encontró que se modula la expresión de los mRNA's y de algunas de las proteínas de los genes blanco del factor NFκB en las células CaLo que sobre-expresan el TIMP-4 (Figuras 12 a 15). Debido a esto, se pensó que la vía de este factor transcripcional se encuentra alterada. Se midió la actividad transcripcional de NFκB con un ensayo de gen reportero con fosfatasa alcalina y se encontró que no hay diferencia significativa entre ambas líneas celulares (Gráfica 6). Estos resultados que el TIMP-4 no inhibe la vía de señalización del factor NFκB y que no es este el mecanismo por el cual sensibiliza o induce la apoptosis.

Posible vía de muerte celular inducida por el TIMP-4

Una forma en la que el TIMP-4 podría sensibilizar a la apoptosis podría ser a través de la inhibición o de la reducida formación del complejo I y la modulación de la expresión de los genes inducidos por el factor NFκB. Se ha observado que este factor regula la expresión de una lista creciente de genes, entre ellos los genes de cIAP-1, cIAP-2, TRAF-2 y FLIP. De manera similar a otros tipos celulares, en las células CT se observó la modulación de la expresión de estos genes. En un trabajo previo se mostró que el TIMP-2 recombinante induce la proliferación de las células de carcinoma de pulmón A549 debido a la activación de la vía del factor NFκB (Lizarraga *et al.*, 2004). Estos hallazgos sugieren que la vía del factor NFκB puede ser regulada comúnmente por los TIMP's y que en el caso de las células de CaCu que sobre-expresan TIMP-4 se activa paralelamente a la vía de la caspasa 8 para evitar o inhibir la apoptosis.

Otra posibilidad que sensibilizaría a las células que sobre-expresan TIMP-4 a la apoptosis sería la preferencia y/o la excesiva presencia de complejos tipo II (TRADD, FADD y caspasa 8) sobre los complejos tipo I (TRADD, TRAF-2, cIAP-1 y RIP) debido a que hay menor cantidad del inhibidor FLIP.

Por otra parte, en algunos casos se ha observado que Bcl-2 se requiere para activar NFκB. Bcl-2 se une a la proteína Raf e induce la vía de las cinasas MEKK e IKKβ. Esta última fosforila al inhibidor de NFκB, el IκB, el cual es degradado por el proteasoma y se libera el factor transcripcional NFκB (Regula *et al.*, 2002). Además, se observó que las células CT expresan mas inhibidor IκBα, cuya transcripción es regulada por el mismo NFκB (Figura 13). Con base en los resultados obtenidos en esta investigación puede pensarse que la baja expresión de Bcl-2 podría contribuir en parte a la menor activación

de las cinasas que activan a NFκB en las células que sobre-expresan el TIMP-4.

Al parecer existe una asociación entre la expresión de los TIMP's y de las proteínas de Bcl-2. Se ha observado una relación entre la sobre-expresión del TIMP-1 y la de Bcl-2 en las células de cáncer de mama (Li *et al.*, 1999b). Además se sabe que el TIMP-1 promueve la proliferación y sobrevivencia celulares porque activa la vía de PI3K y Akt y regula la actividad de Bad y la expresión de Bcl-X_L (Lambert *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2005). Asimismo, la expresión del TIMP-4 también se asocia con la expresión de las proteínas Bcl-2 en las células CaLo y en las de cáncer de mama (Jiang *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que los TIMP's podrían regular el crecimiento celular y la apoptosis porque modulan la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2.

El TIMP-4 no es el único TIMP que induce apoptosis. Bond y sus colaboradores (2002) demostraron que la sobre-expresión del TIMP-3 induce la activación de las caspasas 8 y 9 en las células 293 del riñón de embrión humano. Estos resultados sugieren que la activación de las caspasas puede ser un efecto común en la inducción de la apoptosis por los TIMP's. Además, encontraron que el TIMP-3 provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo *c* y que la sobre-expresión de Bcl-2 inhibe la apoptosis. En esta investigación se mostró que Bcl-2 está disminuido en las células que sobre-expresan TIMP-4 por lo que podría pensarse que la apoptosis tipo II puede ser un mecanismo común para ambos TIMP's.

Algunos trabajos han mostrado que el TIMP-3 induce la estabilización de los receptores de muerte (Smith *et al.*, 1997; Ahonen *et al.*, 2003) y que este efecto provoca que las células sean más sensibles a la muerte por la privación de los factores de crecimiento. En concordancia, en esta investigación se observó que las células que sobre-expresan TIMP-4 son más sensibles a la muerte por ausencia de los factores de crecimiento. Sin embargo, se encontró que la misma cantidad de los receptores para TNF I y II en los extractos protéicos membranales de las células CC y CT.

Ahonen y sus colaboradores (2003) proponen que el TIMP-3 induce la apoptosis debido a que inhibe a las MMP's que procesan a los receptores de muerte. Es decir, que la función apoptótica del TIMP-3 es dependiente de su actividad inhibitoria de las MMP's. Sin embargo, se ha mostrado que los TIMP's que carecen de esta función pueden inducir la proliferación (Hayakawa *et al.*, 1994). En el caso del TIMP-4 sería interesante elucidar si su función reguladora de la apoptosis depende de su capacidad inhibitoria. Sin embargo, tal vez este no sea el caso ya que Celiker y sus colaboradores (2001) encontraron que el TIMP-4 que inhibe el crecimiento en un modelo de tumor de Wilms se encuentra localizado dentro de las células, en la región perinuclear. Anteriormente, se había mostrado que el TIMP-1 y el TIMP-3 se localizan también

dentro de las células y la expresión del primero es regulada por el ciclo celular (Wick y col., 1994, Zhao y col., 1998). Los hallazgos anteriores sugieren que la localización celular de los TIMP's puede regular sus funciones (Jiang y col., 2002). A este respecto, es interesante mencionar que las células CT secretan el TIMP-4, a diferencia de las CC (Figura 5). Es posible entonces que los efectos del TIMP-4 en las células CaLo puedan ser debidos a alguna función de este inhibidor a nivel de la matriz extracelular o de la membrana plasmática.

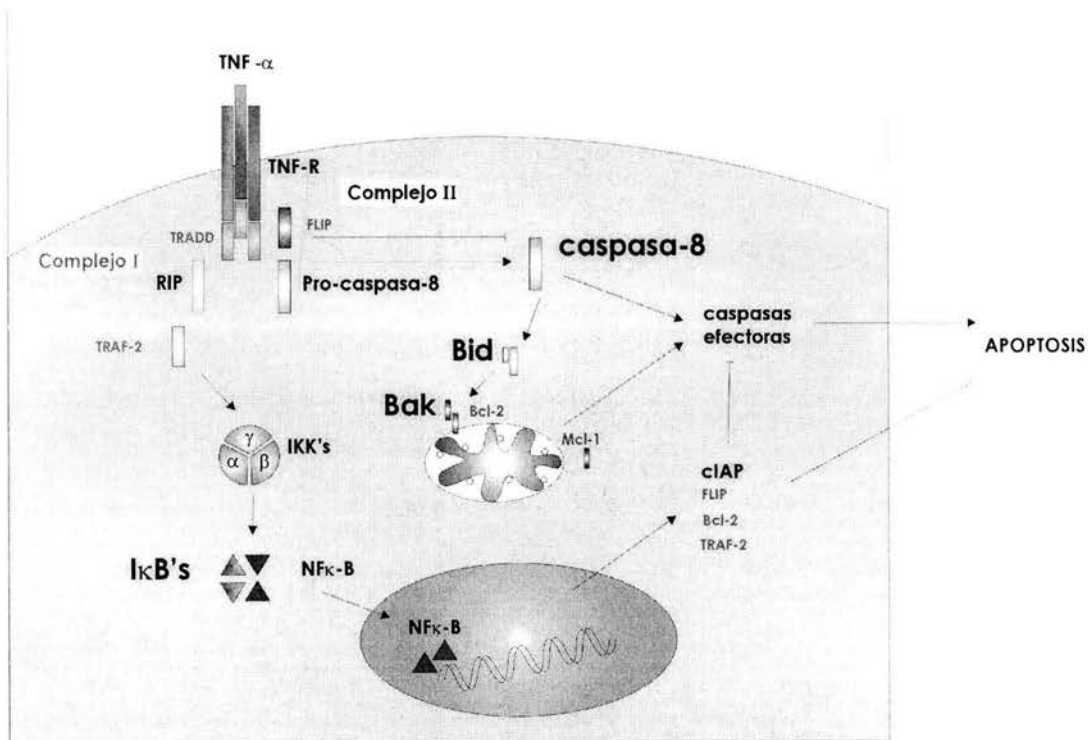


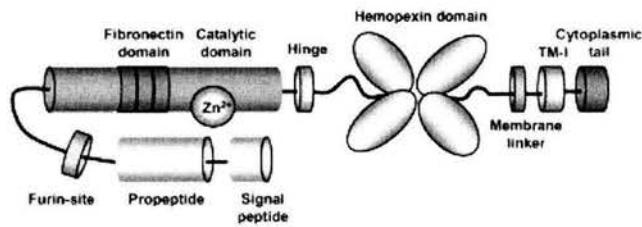
Figura 17. Posible mecanismo de inducción de la apoptosis por el TIMP-4 en las células CaLo.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se analizó la expresión del TIMP-4 en líneas celulares y en muestras de pacientes con CaCu. No se encontró el mRNA para el TIMP-4 en las biopsias de las pacientes control; sin embargo, se encontró un incremento de este transcrito relacionado a la progresión de esta a neoplasia (estadios de la FIGO). Esta es la primera ocasión en la que se evalúa la presencia del mRNA para el TIMP-4 en el CaCu y con base en estos resultados, se investigó la participación del TIMP-4 en el proceso carcinogénico del cervix. Se encontró que la sobre-expresión del TIMP-4 y el TIMP-4 recombinante sensibilizan a las células CaLo a la apoptosis inducida por estímulos que activan la vía intrínseca y la extrínseca. Se analizó la expresión de algunas proteínas que regulan la apoptosis. Sorprendentemente, las células CT presentan a la caspasa 8 activa en ausencia de cualquier estímulo apoptótico. Las proteínas antiapoptóticas, FLIP_R, Bcl-2 y Mcl-1 están disminuidas en las células CaLo que sobre-expresan TIMP-4. Las proteínas TRAF-2 y TRADD, componentes del complejo I que activa la vía del factor NFκB, estuvieron presentes en menor cantidad en las células que expresan el TIMP-4. A pesar de una mayor cantidad del inhibidor del factor transcripcional NFκB, las proteína IκBα, la actividad transcripcional fue semejante en las líneas celulares CC y CT, por lo que es probable que esta vía permanezca activa en las células CC y CT. Además, las proapoptóticas de la familia de Bcl-2, Bak y Bid están presentes en mayor cantidad en las células CT lo cual podría potenciar también la muerte celular. Finalmente, las células CaLo que sobre-expresan TIMP-4 presentan una capacidad de migración mayor, lo cual podría relacionarse con el incremento en la expresión de este inhibidor en las muestras de tejido de las pacientes con CaCu.

APÉNDICE 1.

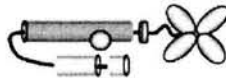
**Clasificación de las MMP's humanas con base en sus dominios estructurales.
Tomado de (Folgueras *et al.*, 2004).**



Archetypal MMPs

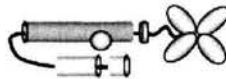
Collagenases

Collagenase-1 (MMP-1)
Collagenase-2 (MMP-8)
Collagenase-3 (MMP-13)



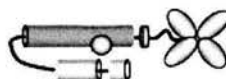
Stromelysins

Stromelysin-1 (MMP-3)
Stromelysin-2 (MMP-10)



Other MMPs

Metalloelastase (MMP-12)
MMP-19
Enamelysin (MMP-20)
MMP-27 (MMP-22, C-MMP)



Matrilysins

Matrilysin (MMP-7)
Matrilysin-2 (MMP-26)



Gelatinases

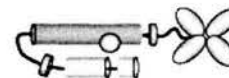
Gelatinase A (MMP-2)
Gelatinase B (MMP-9)



Furin-activatable MMPs

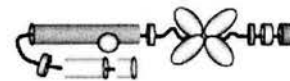
Secreted

Stromelysin-3 (MMP-11)
MMP-21 (X-MMP)
Epiplisin (MMP-28)

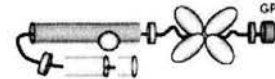


Membrane-bound

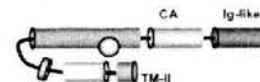
MT1-MMP (MMP-14)
MT2-MMP (MMP-15)
MT3-MMP (MMP-16)
MT5-MMP (MMP-24)



MT4-MMP (MMP-17)
MT6-MMP (MMP-25)

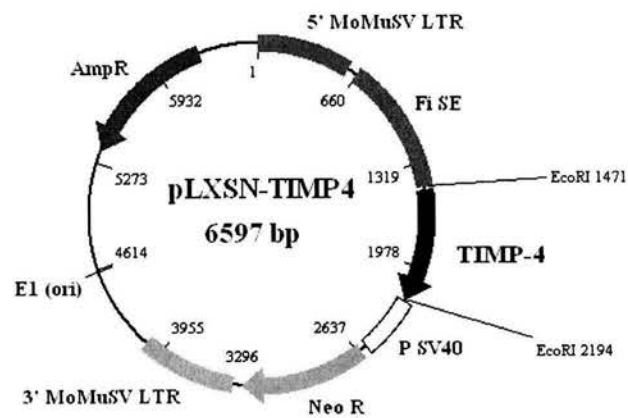
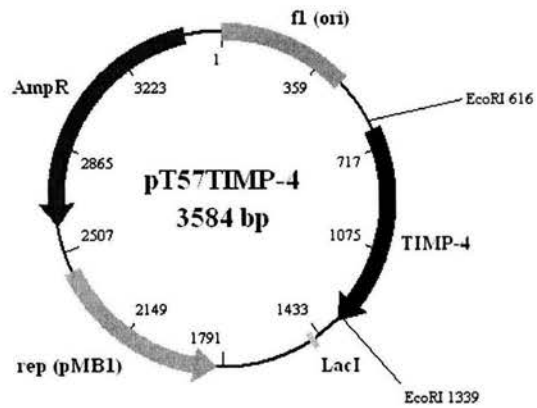


MMP-23A
MMP-23B



APÉNDICE 2.

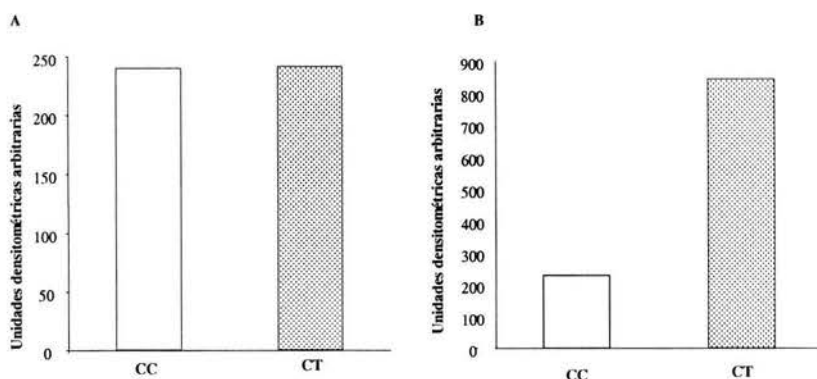
En este anexo se muestran los mapas de los vectores que se construyeron para clonar el ORF del TIMP-4 (pT57TIMP-4) y para sobre-expresarlo en las células CaLo.



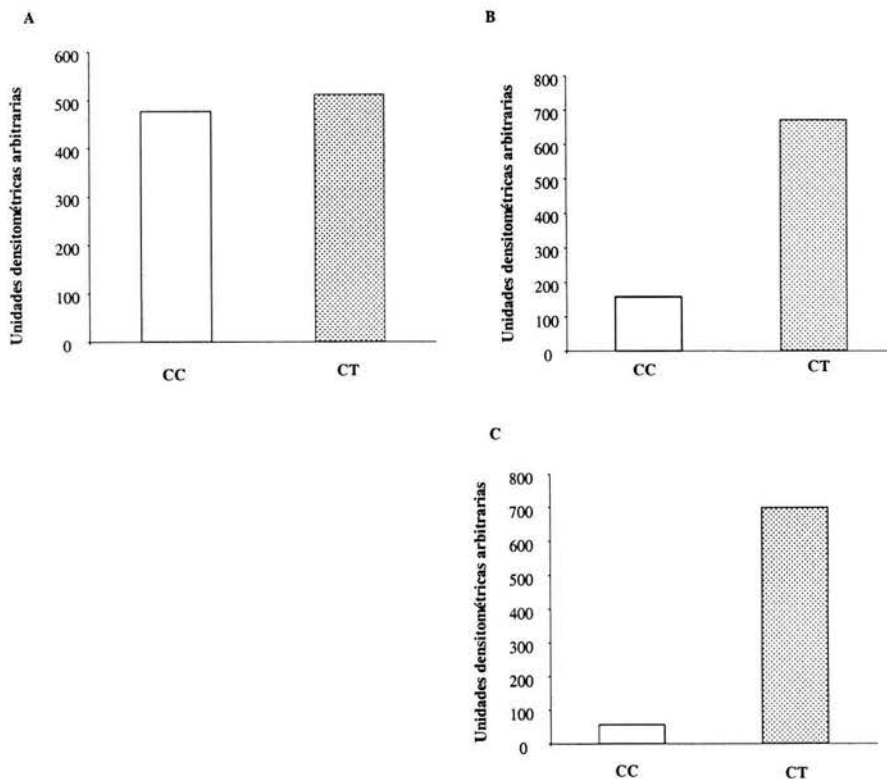
APÉNDICE 3.

En este apéndice se muestran las gráficas de los valores densitométricos (“unidades densitométricas arbitrarias”) obtenidos con el programa NIH Scion Image del sistema de sobre-expresión del TIMP-4 en las células CaLo transfectadas con los vectores pLXSN y pLXSN-TIMP-4.

Se muestra la densitometría del RT-PCR para A) GAPDH y para B) TIMP-4.



Se muestra la densitometría de los Western blot para A) actina, B) TIMP-4 en extractos totales y C) TIMP-4 en las proteínas del medio de cultivo.



APÉNDICE 4.

Estadios del carcinoma del cervix con base en la FIGO

Estadio I.

Carcinoma estrictamente confinado al cervix.

Estadio IA: cáncer invasor identificado microscópicamente.

Estadio IA1: invasión del estroma menor de 3 mm de profundidad y de 7 mm de diámetro.

Estadio IA2: invasión del estroma mayor de 3 mm pero menor de 5 mm de profundidad y menor de 7 mm de diámetro.

Estadio IB: lesiones confinadas al cervix o lesiones preclínicas mayores al estadio IA.

Estadio IB1: lesiones clínicas menores de 4 cm.

Estadio IB1: lesiones clínicas mayores de 4 cm.

Estadio II.

Carcinoma que se extiende más allá del cervix, pero no extendido a la pared pélvica.

Comprende la vagina, pero no más allá del tercio inferior.

Estadio IIA: no involucra los parametrios. Involucra hasta los dos tercios superiores de la vagina.

Estadio IIB: involucra los parametrios, pero no la pared pélvica lateral.

Estadio III.

Carcinoma que se ha extendido a la pared pélvica. En la examinación rectal no hay un espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor comprende el tercio inferior de la vagina.

Estadio IIIA: no se extiende a la pared pélvica pero involucra el tercio inferior de la vagina.

Estadio IIIB: extensión a la pared pélvica, o hidronefrosis o riñón no funcional

Estadio IV.

Carcinoma que se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o clínicamente involucra la mucosa de la vejiga y/o del recto.

Estadio IVA: el tumor se extiende hacia los órganos pélvicos adyacentes.

Estadio IVB: el tumor se extiende a los órganos distantes.

Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4 is Expressed in Cervical Cancer Patients

FLORIA LIZARRAGA, MAGALI ESPINOSA, VILMA MALDONADO and JORGE MELENDEZ-ZAJGLA

Subdirección de Investigación Básica. Instituto Nacional de Cancerología, D.F. Mexico

Abstract. *Background: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) play a critical role in extracellular matrix remodeling, which is involved in tumor growth and metastasis. Elevated TIMP levels are reported in association with cancer progression. In particular, it has been shown that TIMP-1 and -2 levels are increased in cervical cancer patients. We analyzed, for the first time, TIMP-4 expression in cervical tumor samples. Materials and Methods: Semiquantitative RT-PCR was performed in 26 tumor and 6 normal cervical samples. Results: The study included 32 samples, 7 IB samples, 9 IIB samples, 10 IIIB samples and a control group (n=6) of normal cervical squamous epithelial tissues. Whereas none of the control samples expressed TIMP-4, 24 (88%) of the 26 cervical cancer samples expressed the inhibitor. Higher TIMP-4 levels were found in advanced stage disease (p=0.016, Chi-square test). Conclusion: TIMP-4 is expressed de novo in cervical cancer. Higher inhibitor expression levels were found in stages II and III.*

Extracellular matrix (ECM) remodeling is an essential process during cancer invasion, angiogenesis and metastasis. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases that degrade all ECM components and play a key role in these processes (1). The expression of MMPs is highly regulated at transcription, translation and latent enzyme secretion, pro-enzyme activation and inactivation levels. The tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), a multifunctional four member protein family, regulate MMPs after their secretion to the extracellular environment. Thus, net MMPs activity is a result of the balance between enzymes levels and their physiological inhibitors (2). To date, four types of TIMPs have been

identified. TIMP-1, -2 and -4 are secreted in soluble forms, whereas TIMP-3 is bound to ECM proteins (3).

Increased MMP expression and ECM proteolytic degradation have been detected in a wide range of cancers and correlate with primary tumor invasion and metastasis (1). Consistently, tumor cell invasion and metastasis can be inhibited by up-regulation of TIMPs expression (4). It has been demonstrated that *in vivo* injection of TIMPs inhibits tumor cell invasion and metastasis in animal models (4). In addition, several studies have demonstrated that over-expression of TIMPs inhibits primary tumor growth in some cell types (5). However, the TIMPs are a family of proteins that may affect a broad spectrum of cellular behaviors. In fact, TIMPs regulate apoptosis and angiogenesis, present growth stimulatory activity in several cell lines and promote carcinogenesis in murine models (6).

TIMP-4 was the last identified and cloned tissue inhibitor (7). Unlike other TIMPs, tissue-specific expression of TIMP-4 is limited to the heart, pancreas, kidney and brain in adult humans (7). The role of TIMP-4 in some cancers has been suggested in some investigations. It has been shown that TIMP-4 mRNA and protein are expressed in human mammary carcinoma in contrast to healthy tissue samples (8). In endometrial carcinoma, TIMP-4 is over-expressed and this elevated expression correlates with myometrial invasion (9). On the other hand, TIMP-4 mRNA expression was found in human glioma tumor cells samples and shows negative correlation with malignancy (10). These paradoxical effects underlie the complex role of these inhibitors in cancer.

Cervical cancer is the second most common female malignancy worldwide. This disease is curable when detected early, but conventional cytological and histological techniques are insufficient to predict the course of the disease. Therefore, it is necessary to understand and evaluate several factors contributing to cervix tumor progression. Nair *et al.* have shown basement membrane dissolution as the disease progresses from low-grade squamous epithelial lesion to high-grade squamous epithelial lesion (11). Consistently, several studies have shown an increase in MMP-2, MMP-9 and MMP-14

Correspondence to: Vilma Maldonado or Jorge Melendez-Zajgla, Laboratorio de Biología Molecular, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando # 22. Tlalpan 14080, México, D.F. Mexico. Tel: (525) 56280425 (525) 56280427, Fax: (525) 56280426, (525) 56280432, e-mail: jorgezajgla@ssa.gob.mx

Key Words: TIMP-4, cervical cancer.

Table I. *TIMP-4* positivity in cervical cancer tumor samples.

Variable	No. Patients (n=26)	TIMP-4 Positive (n=23)	TIMP-4 Negative (n=3)	P
Age	53.45 (32-82)	58.82(32-82)	50 (37-66)	0.99
FIGO stage				
IB	7	6	1	1.00
IIB	9	7	2	
IIIB	10	10	0	
Histology of tumors				
Squamous cell	22	19	3	0.48
Adenocarcinoma	2	2	0	
Adenosquamous	2	2	0	
Menopause	7	6	1	0.38
Pre-menopause	3	2	1	
Post-menopause	16	15	1	
Current status ^a				
Disease-free	11	9	2	1.00
Persistent disease	13	12	1	
Dead	2	2	0	
Tumor size	n=19	n=16	n=3	
< 5 cm	6	5	1	0.69
>5-<10 cm	10	8	2	
>10-<15 cm	1	1	0	
>15 cm	2	2	0	

^a Median time follow-up 15.3 months

expression in samples, but also augmented TIMP-1 and -2 levels (12). These results suggest that ECM proteins may participate in cervical carcinogenesis. Since the changes in ECM turnover seem to be a factor contributing to cervical cancer progression, we sought to analyze the TIMP-4 mRNA expression in cervical carcinoma samples.

Materials and Methods

Cell culture The cervical cancer cell lines HeLa, CasKi and SiHa were obtained from ATCC (MD, USA) and the CaLo cell line was a kind gift from Dr. Alejandro Garcia. Cells were cultured as a monolayer in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% (V/V) fetal bovine serum (GIBCO, Bethesda, MD, USA) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% (V/V) CO₂, as reported previously (13).

Clinical samples. Cervical tissue was collected from patients undergoing hysterectomy for malignant and various non-malignant diseases of the cervix at the Instituto Nacional de Cancerologia (Mexico). Written consent was obtained from patients before the samples were collected. Cervical samples were histopathologically graded by a pathologist.

HeLa CasKi SiHa CaLo

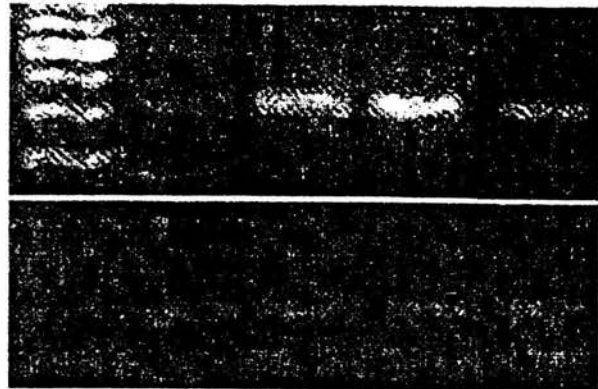


Figure 1. *TIMP-4* mRNA expression in cervical cancer cell lines. Upper panel: RT-PCR analysis of HeLa, CasKi, SiHa and CaLo cervical cancer cell lines. To the left molecular weight marker (100 bp ladder, Invitrogen). Lower panel: RT-PCR of GAPDH, used as a mRNA load control.

Histology. Histopathological grading was done according to the FIGO (International Gynecology and Obstetric Federation) classification system. The study included 32 samples, 7 IB samples, 9 IIB samples, 10 IIIB samples and a control group (n=6) of normal cervical squamous epithelial tissues (Table I).

mRNA extraction. Total RNA was extracted from 10 mg of tissue samples or 10⁶ cultured cells with Trizol reagent (Life Sciences, Bethesda, MD, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA purity was confirmed with 260nm/280nm ratio and its integrity was established with agarose gels, as described previously (14).

cDNA synthesis and polymerase chain reaction. RT-PCR analysis was performed as described previously (15). Briefly, cDNA synthesis was done from 1 mg of total RNA with random hexamers and reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). TIMP-4 and GAPDH mRNA PCR reactions contained 0.25 ml amplitaq gold polymerase (Applied Biosystems, CA, USA), 2.5 µl 10X reaction buffer, 0.5 µl dNTP mix 10 mM, 1 µl sense primer 10 µM, 1 µl anti-sense primer 10 µM and 1-2 ml cDNA for 25 µl final volume. TIMP-4 primers were: sense 5' CCAGAGGTCAGGTGGTAA 3' and anti-sense 5' ACAGCCAGAAGCAGTATC 3'. GAPDH primers were: sense 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3' and antisense 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'. PCR cycle parameters for GAPDH were as follows: 10 minutes enzyme activation at 95°C followed by 30 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C and 30 seconds at 72°C. PCR cycle parameters for TIMP-4 were as follows: 10 minutes enzyme activation at 95°C followed by 3 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 68°C and 1 minute at 72°C, 3 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 65°C and 1 minute at 72°C, 25 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 58°C and 1 minute at 72°C. Amplicons generated were electrophoresed in 0.8% agarose gels stained with ethidium bromide. The images were captured using a digital camera system (Kodak DC290, DF, Mexico). The TIMP-4 mRNA expression data are expressed as a ratio between densitometry values (Scion Image software, MD, USA) of TIMP-4 gene expression derived from HeLa cells versus the specific tumor sample. PCR

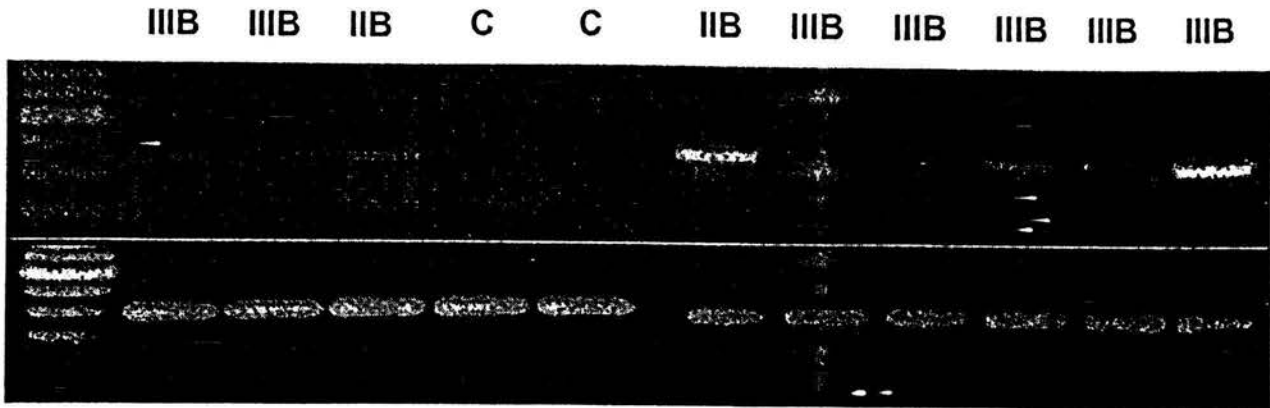


Figure 2. TIMP-4 mRNA expression in cervical cancer patients. Upper panel: RT-PCR analysis of TIMP-4 mRNA. To the left molecular weight marker (100 bp ladder, Invitrogen). FIGO stage is shown at the top of the panel. Lower panel: RT-PCR of GAPDH, used as a load control.

products were normalized to those obtained from GAPDH (mRNA) amplification, used as internal reference gene. Gene expression measurements were repeated at least two times. TIMP-4 relative levels were qualified as low if included in the 25th percentile, and high when the values exceeded those values. Percentiles were obtained from the distribution values of the TIMP-4 expression.

Statistical analysis. TIMP-4 expression values were compared with pathological tumor parameters in order to detect any correlation. Differences were tested for statistical significance using ANOVA's (age and tumor size) and Chi-square tests (FIGO stage, histology of tumors, menopause and current status). The statistical package Intercooled Stata ver. 7.0 (TX, USA) was used for analyses and statistical significance was indicated when the p value was less than 0.05.

Results

First, we performed semiquantitative RT-PCR analyses of TIMP-4 expression in a panel of cervical cancer cell lines, including the widely employed SiHa, Caski and HeLa cells. As shown in Figure 1, all the cell lines tested expressed the transcript for TIMP-4, although different levels were observed in each line.

Next, we analyzed TIMP-4 mRNA levels using the same approach in 26 tumoral and 6 normal cervical samples. In order to provide accurate determinations, we normalized the relative expression in each sample to a cervical cancer cell line control. To verify equal RNA input, GAPDH mRNA was amplified simultaneously. Figure 2 shows a representative panel of results, which are presented in Table I.

As expected from the restricted expression of TIMP-4 reported (7, 16), normal cervical samples do not express mRNA for TIMP-4. In contrast, 24 (88%) of the 26 cervical cancer biopsies had detectable levels of this transcript. There was no correlation between TIMP-4 positivity and histology, menopause, tumor size, FIGO stage or disease status (Table I). Survival times were similar for both groups ($p=0.23$ log rank

test). Next, we establish arbitrary cut-off points based on the 25th percentile, derived from the TIMP-4 expression distribution in our samples. These cut-offs separated patients with low (94 arbitrary units, 6 patients) and high (172 arbitrary units, 20 patients) TIMP-4 expression. There was no correlation with histology, menopause, tumor size or disease status (Table II). Survival times were similar for groups with low or high TIMP-4 expression ($p=0.64$, $p=0.39$, respectively, log rank test). Nevertheless, a clear correlation was found between FIGO cancer staging and TIMP-4 expression. Samples from patients with cervical cancer in stages II and III presented higher TIMP-4 levels ($p=0.016$ Chi-square test) (Table II).

Discussion

Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) are multifunctional proteins with both matrix metalloproteinase (MMP) inhibitory effects and growth-regulatory activity. Due to these multiple functions, TIMPs have complex roles in cancer.

Recently, the presence of TIMP-1 and -2 mRNA has been shown in cervical cancer cell lines (17) and cancer samples (11, 18). Immunoreactivity for TIMP-1 and -2 increases during cervical cancer progression, in particular for TIMP-2 (11, 18). The TIMP-2 levels in these tumors correlate with the stage of the menstrual cycle (19) and it is a poor prognosis factor (20). There are no reports in cervical cancer concerning the other two members of this family.

TIMP-4, the latest cloned member of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases family, presents the most restricted pattern of tissue expression, including only kidney, placenta, colon and testes (7). Nevertheless, it has been demonstrated that this inhibitor is up-regulated in gliomas (10), endometrial (9) and breast cancer (21, 22), thus showing a possible participation in the carcinogenic process. *In vitro* and *in vivo*

Table II. *TIMP-4* expression levels in cervical cancer tumor samples.

Variable	No. Patients (n=26)	TIMP-4 High (n=20)	TIMP-4 Low (n=6)	P
Age	53.45 (32-82)	52.85(32-82)	53.3(35-70)	0.794
FIGO stage				
IB	7	6	1	0.013
IIB	9	4	5	
IIIB	10	10	0	
Histology of tumors				
Squamous cell	22	16	6	0.492
Adenocarcinoma	2	2	0	
Adenosquamous	2	2	0	
Menopause	7	6	1	0.792
Pre-menopause	3	2	1	
Post-menopause	16	12	4	
Current status ^a				
Disease-free	11	7	4	0.42
Persistent disease	13	11	2	
Dead	2	2	0	
Tumor size	n=19	n=15	n=4	
< 5 cm	6	4	2	0.66
>5-<10 cm	10	7	3	
>10-<15 cm	1	1	0	
>15 cm	2	2	0	

^a Median time follow-up 15.3 months

evidence have shown that TIMP-4 inhibits invasion, metastasis and tumor growth of breast cancer cells (23), but only when its cDNA is transfected directly to the cells. Contrary to that, systemic delivery of TIMP-4 by electroporation-mediated intramuscular injection of naked TIMP-4 DNA stimulates tumorigenesis of breast cancer cells in nude mice (8). These opposing results may be derived from the anti-apoptotic properties of TIMP-4 which are, at least partially, derived from the up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X(L) proteins, from clonal differences in the cells used or for TIMP-4 inactivation in blood, allowing for lower levels of the inhibitor in the tumor. Recently, Jian *et al.* (6) proposed a biphasic role of TIMPs in cancer. In early stages TIMPs could support carcinogenesis by means of stimulating growth and protecting cells from apoptosis, as reported by various authors (24-27). In later stages, when the cells have acquired enough mutations to obviate the need for these functions, the anti-metalloproteinase activity may play a major inhibitory role in cancer progression (28, 29). Thus, over-expression in a particular cancer could reflect early expressional changes of TIMP and not necessarily correlate with progression. In this

paper, we present evidence that TIMP-4 is expressed *de novo* in cervical cancer patients. Higher TIMP-4 levels were found in advanced stage disease. Nevertheless, we could not find statistical support for TIMP-4 as a prognostic factor, when a log rank test was used. As mentioned before, this could be due to an expressional change in early stages that is conserved and enhanced during cancer progression. Analyzing early samples of intraepithelial carcinomas or even cervical dysplasias could help to clarify this point. On the other hand, the limited number of samples could be hampering the statistical analysis. We are currently increasing sampling and following time in order to exclude this possibility. More interestingly, this report supports the possibility of using TIMP-4 as a diagnostic marker in cervical cancer. As in the previous case, analysis of samples from intracervical neoplasia and dysplasia samples should be performed to address this question.

Acknowledgements

We thank Dr. Alejandro Garcia for the kind gift of the CaLo cell line. This work was supported by grant CONACYT-2002-C01-42040/A-1 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, Mexico to J.Melendez-Zajgla.

References

- 1 Stamenkovic I: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10: 415-33, 2000.
- 2 Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H and Thorgeirsson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-22, 1997.
- 3 Brew K, Dinakarandian D and Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-83, 2000.
- 4 Brand K: Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Curr Gene Ther* 2: 255-71, 2002.
- 5 Mannello F and Gazzanelli G: Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 6: 479-82, 2001.
- 6 Jiang Y, Goldberg ID and Shi YE: Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21: 2245-52, 2002.
- 7 Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C and Shi YE: Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271: 30375-80, 1996.
- 8 Jiang Y, Wang M, Celiker MY, Liu YE, Sang QX, Goldberg ID and Shi YE: Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Res* 61: 2365-70, 2001.
- 9 Tunuguntla R, Ripley D, Sang QX and Chegini N: Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 89: 453-9, 2003.
- 10 Graft LL, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Knauper V, Lafleur MA, Forsyth PA and Edwards DR: Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br J Cancer* 85: 55-63, 2001.

- 11 Asha Nair S, Karunakaran D, Nair MB and Sudhakaran PR: Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 123-31, 2003.
- 12 Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, Chow SN, Huang SC and Hsu SM: Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res* 63: 6537-42, 2003.
- 13 Hernandez P, Olivera P, Duenas-Gonzalez A, Perez-Pastenes MA, Zarate A, Maldonado V and Melendez-Zajgla J: Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 48: 488-92, 2001.
- 14 Bandala E, Espinosa M, Maldonado V and Melendez-Zajgla J: Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 62: 13-9, 2001.
- 15 Melendez J, Maldonado V, Bingle CD, Selman M and Pardo A: Cloning and expression of guinea pig TIMP-2. Expression in normal and hyperoxic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L737-43, 2000.
- 16 Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT, Hawkes SP, Khokha R, Schultz GA and Edwards DR: Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 401: 213-7, 1997.
- 17 Nuovo GJ: *In situ* detection of PCR-amplified metalloproteinase cDNAs, their inhibitors and human papillomavirus transcripts in cervical carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 71: 1056-60, 1997.
- 18 Davidson B, Goldberg I, Liokumovich P, Kopolovic J, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Reder I, Ben-Baruch G and Reich R: Expression of metalloproteinases and their inhibitors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 17: 295-301, 1998.
- 19 Formenti S, Felix J, Salonga D, Danenberg K, Pike MC and Danenberg P: Expression of metastases-associated genes in cervical cancers resected in the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. *Clin Cancer Res* 6: 4653-7, 2000.
- 20 Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G and Reich R: MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma - a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA *in situ* hybridization. *Gynecol Oncol* 73: 372-82, 1999.
- 21 Span PN, Lindberg RL, Manders P, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, Beex LV and Sweep CF: Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol* 202: 395-402, 2004.
- 22 Zhao YG, Xiao AZ, Park HI, Newcomer RG, Yan M, Man YG, Heffelfinger SC and Sang QX: Endometase/matrixlysin-2 in human breast ductal carcinoma *in situ* and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer Res* 64: 590-8, 2004.
- 23 Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM and Shi YE: Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 14: 2767-74, 1997.
- 24 Guede L, McMarlin AJ, Kingma DW, Bennett TA, Stetler-Stevenson M and Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma *via* divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 158: 1207-15, 2001.
- 25 Wang T, Yamashita K, Iwata K and Hayakawa T: Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 201-5, 2002.
- 26 Guede L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A and Stetler-Stevenson M: *In vitro* suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102: 2002-10, 1998.
- 27 Nemeth JA and Goolsby CL: TIMP-2, a growth-stimulatory protein from SV40-transformed human fibroblasts. *Exp Cell Res* 207: 376-82, 1993.
- 28 Sounni NE, Janssen M, Foidart JM and Noel A: Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 55-61, 2003.
- 29 Sang QX: Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 8: 171-7, 1998.

Received May 4, 2004

Accepted October 4, 2004

REFERENCIAS

- Ahonen, M., A. H. Baker y V. M. Kahari (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Research* **58**(11): 2310-5.
- Ahonen, M., M. Poukkula, A. H. Baker, M. Kashiwagi, H. Nagase, J. E. Eriksson y V. M. Kahari (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* **22**(14): 2121-34.
- Anand-Apte, B., M. S. Pepper, E. Voest, R. Montesano, B. Olsen, G. Murphy, S. S. Apte y B. Zetter (1997). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **38**(5): 817-23.
- Asha Nair, S., D. Karunagaran, M. B. Nair y P. R. Sudhakaran (2003). Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **129**(2): 123-31.
- Bai, S., H. Liu, K. H. Chen, P. Eksarko, H. Perlman, T. L. Moore y R. M. Pope (2004). NF-kappaB-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Arthritis and Rheumatism* **50**(12): 3844-55.
- Baker, A. H., M. Ahonen y V. M. Kahari (2000). Potential applications of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) overexpression for cancer gene therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **465**: 469-83.
- Baker, A. H., S. J. George, A. B. Zaltsman, G. Murphy y A. C. Newby (1999). Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *British Journal of Cancer* **79**(9-10): 1347-55.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb y D. Hanahan (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* **2**(10): 737-44.
- Bernhard, E. J., S. B. Gruber y R. J. Muschel (1994). Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(10): 4293-7.
- Bigg, H. F., C. J. Morrison, G. S. Butler, M. A. Bogoyevitch, Z. Wang, P. D. Soloway y C. M. Overall (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does

not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Research* **61**(9): 3610-8.

- Bigg, H. F., Y. E. Shi, Y. E. Liu, B. Steffensen y C. M. Overall (1997). Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *Journal of Biological Chemistry* **272**(24): 15496-500.
- Blavier, L., P. Henriët, S. Imren y Y. A. Declerck (1999). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **878**: 108-19.
- Bond, M., G. Murphy, M. R. Bennett, A. C. Newby y A. H. Baker (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**(16): 13787-95.
- Butler, G. S., M. Hutton, B. A. Wattam, R. A. Williamson, V. Knauper, F. Willenbrock y G. Murphy (1999). The specificity of TIMP-2 for matrix metalloproteinases can be modified by single amino acid mutations. *Journal of Biological Chemistry* **274**(29): 20391-6.
- Caceres-Cortes, J. R., J. A. Alvarado-Moreno, K. Waga, R. Rangel-Corona, A. Monroy-Garcia, L. Rocha-Zavaleta, J. Urdiales-Ramos, B. Weiss-Steider, A. Haman, P. Hugo, R. Brousseau y T. Hoang (2001). Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Research* **61**(16): 6281-9.
- Celiker, M. Y., M. Wang, E. Atsidaftos, X. Liu, Y. E. Liu, Y. Jiang, E. Valderrama, I. D. Goldberg y Y. E. Shi (2001). Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* **20**(32): 4337-43.
- Chung, T. K., T. H. Cheung, W. K. Lo, S. F. Yim, M. Y. Yu, S. Krajewski, J. C. Reed y Y. F. Wong (2002). Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Letters* **180**(1): 63-8.
- Cornelius, L. A., L. C. Nehring, E. Harding, M. Bolanowski, H. G. Welgus, D. K. Kobayashi, R. A. Pierce y S. D. Shapiro (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *Journal of Immunology* **161**(12): 6845-52.
- Coussens, L. M., C. L. Tinkle, D. Hanahan y Z. Werb (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* **103**(3): 481-90.

- Crawford, R. A., C. Caldwell, R. K. Iles, D. Lowe, J. H. Shepherd y T. Chard (1998). Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *British Journal of Cancer* **78**(2): 210-4.
- Danial, N. N. y S. J. Korsmeyer (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**(2): 205-19.
- Davidson, B., I. Goldberg, J. Kopolovic, L. Lerner-Geva, W. H. Gotlieb, G. Ben-Baruch y R. Reich (1999). MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecologic Oncology* **73**(3): 372-82.
- DeVita, V. T., S. A. Rosenberg y S. Hellman (2001). *Cancer : principles & practice of oncology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Edwards, D. R. (2001). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*. N. J. y. A. Clendemann, K., Humana Press: 67-84.
- Elstrom, R. L., D. E. Bauer, M. Buzzai, R. Karnauskas, M. H. Harris, D. R. Plas, H. Zhuang, R. M. Cinalli, A. Alavi, C. M. Rudin y C. B. Thompson (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Research* **64**(11): 3892-9.
- Espinosa, M., D. Cantu, C. M. Lopez, J. G. De la Garza, V. A. Maldonado y J. Melendez-Zajgla (2004). SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors. *BMC Cancer* **4**: 84.
- Folgueras, A. R., A. M. Pendas, L. M. Sanchez y C. Lopez-Otin (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *International Journal of Developmental Biology* **48**(5-6): 411-24.
- Garzetti, G. G., A. Ciavattini, G. Lucarini, G. Goteri, C. Romanini y G. Biagini (1996). The 72-kDa metalloproteinase immunostaining in cervical carcinoma: relationship with lymph nodal involvement. *Gynecologic Oncology* **60**(2): 271-6.
- Gilles, C., M. Polette, J. Piette, C. Munaut, E. W. Thompson, P. Birembaut y J. M. Foidart (1996). High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. *International Journal of Cancer* **65**(2): 209-13.
- Golks, A., D. Brenner, C. Fritsch, P. H. Krammer y I. N. Lavrik (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280**(15): 14507-13.

- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji y U. P. Thorgeirsson (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* **74**(2): 111-22.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen y Y. E. Shi (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Journal of Biological Chemistry* **271**(48): 30375-80.
- Groft, L. L., H. Muzik, N. B. Rewcastle, R. N. Johnston, V. Knauper, M. A. Lafleur, P. A. Forsyth y D. R. Edwards (2001). Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *British Journal of Cancer* **85**(1): 55-63.
- Guedez, L., A. J. McMarlin, D. W. Kingma, T. A. Bennett, M. Stetler-Stevenson y W. G. Stetler-Stevenson (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *American Journal of Pathology* **158**(4): 1207-15.
- Guedez, L., W. G. Stetler-Stevenson, L. Wolff, J. Wang, P. Fukushima, A. Mansoor y M. Stetler-Stevenson (1998). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Journal of Clinical Investigation* **102**(11): 2002-10.
- Guo, Y. H., W. Gao, Q. Li, P. F. Li, P. Y. Yao y K. Chen (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 suppresses vascular smooth muscle cell migration and induces cell apoptosis. *Life Sciences* **75**(20): 2483-93.
- Handsley, M. M. y D. R. Edwards (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer* **115**(6): 849-60.
- Harima, Y., S. Sawada, K. Nagata, M. Sougawa, V. Ostapenko y T. Ohnishi (2001). Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *International Journal of Oncology* **18**(3): 493-7.
- Hayakawa, T. (1994). Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Structure and Function* **19**(3): 109-14.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima y K. Iwata (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters* **298**(1): 29-32.
- Hernandez-Barrantes, S., M. Toth, M. M. Bernardo, M. Yurkova, D. C. Gervasi, Y. Raz, Q. A. Sang y R. Fridman (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase

(TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *Journal of Biological Chemistry* **275**(16): 12080-9.

- Hoegy, S. E., H. R. Oh, M. L. Corcoran y W. G. Stetler-Stevenson (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **276**(5): 3203-14.
- Hojilla, C. V., F. F. Mohammed y R. Khokha (2003). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *British Journal of Cancer* **89**(10): 1817-21.
- Imoto, I., H. Tsuda, A. Hirasawa, M. Miura, M. Sakamoto, S. Hirohashi y J. Inazawa (2002). Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Research* **62**(17): 4860-6.
- Jiang, Y., I. D. Goldberg y Y. E. Shi (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* **21**(14): 2245-52.
- Jiang, Y., M. Wang, M. Y. Celiker, Y. E. Liu, Q. X. Sang, I. D. Goldberg y Y. E. Shi (2001). Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Research* **61**(6): 2365-70.
- Karin, M. y A. Lin (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**(3): 221-7.
- Kedzia, W., M. Schmidt, P. Jasinski y M. Spaczynski (2001). [Integrin alpha-6 in cervix neck squamous cell carcinoma HPV 16/18 positive and negative]. *Ginekologia Polska* **72**(4): 207-11.
- Keller, D. M., S. X. Zeng y H. Lu (2003). Interaction of p53 with cellular proteins. *Methods in Molecular Biology* **234**: 121-33.
- Kirkin, V., S. Joos y M. Zornig (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**(2-3): 229-49.
- Koshiba, T., R. Hosotani, M. Wada, Y. Miyamoto, K. Fujimoto, J. U. Lee, R. Doi, S. Arii y M. Imamura (1998). Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* **82**(4): 642-50.
- Koyama, S. (2004). Significance of cell-surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors on gastric epithelium and infiltrating mucosal lymphocytes in progression of Helicobacter pylori-associated gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **39**(11): 1046-53.

- Kreuz, S., D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich y H. Wajant (2004). NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *Journal of Cell Biology* **166**(3): 369-80.
- Kroemer, G. y S. J. Martin (2005). Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* **11**(7): 725-30.
- Lafleur, M. A., M. D. Hollenberg, S. J. Atkinson, V. Knauper, G. Murphy y D. R. Edwards (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochemical Journal* **357**(Pt 1): 107-15.
- Lambert, E., C. Boudot, Z. Kadri, M. Soula-Rothhut, M. L. Sowa, P. Mayeux, W. Hornebeck, B. Haye y E. Petitfrere (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochemical Journal* **372**(Pt 3): 767-74.
- Lazo, P. A. (1999). The molecular genetics of cervical carcinoma. *British Journal of Cancer* **80**(12): 2008-18.
- Li, G., R. Fridman y H. R. Kim (1999a). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Research* **59**(24): 6267-75.
- Li, X., Y. Yang y J. D. Ashwell (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* **416**(6878): 345-7.
- Li, Y. Y., C. F. McTiernan y A. M. Feldman (1999b). Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovascular Research* **42**(1): 162-72.
- Liu, X. W., M. E. Taube, K. K. Jung, Z. Dong, Y. J. Lee, S. Roshy, B. F. Sloane, R. Fridman y H. R. Kim (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Research* **65**(3): 898-906.
- Liu, Y. E., M. Wang, J. Greene, J. Su, S. Ullrich, H. Li, S. Sheng, P. Alexander, Q. A. Sang y Y. E. Shi (1997). Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *Journal of Biological Chemistry* **272**(33): 20479-83.
- Lizarraga, F., V. Maldonado y J. Melendez-Zajgla (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 growth-stimulatory activity is mediated by nuclear factor-

kappa B in A549 lung epithelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **36**(8): 1655-63.

- Luparello, C., G. Avanzato, C. Carella y I. Pucci-Minafra (1999). Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **54**(3): 235-44.
- McDonald, E. R., 3rd y W. S. El-Deiry (2004). Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(16): 6170-5.
- Micheau, O. y J. Tschopp (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2): 181-90.
- Murphy, A. N., E. J. Unsworth y W. G. Stetler-Stevenson (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology* **157**(2): 351-8.
- Nagase, H. y J. F. Woessner, Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* **274**(31): 21491-4.
- Nemeth, J. A. y C. L. Goolsby (1993). TIMP-2, a growth-stimulatory protein from SV40-transformed human fibroblasts. *Experimental Cell Research* **207**(2): 376-82.
- Nuovo, G. J., P. B. MacConnell, A. Simsir, F. Valea y D. L. French (1995). Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Research* **55**(2): 267-75.
- Ohta, S., E. W. Lai, A. L. Pang, F. M. Brouwers, W. Y. Chan, G. Eisenhofer, R. de Krijger, L. Ksinantova, J. Breza, P. Blazicek, R. Kvetnansky, R. A. Wesley y K. Pacak (2005). Downregulation of metastasis suppressor genes in malignant pheochromocytoma. *International Journal of Cancer* **114**(1): 139-43.
- Patterson, B. C. y Q. A. Sang (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *Journal of Biological Chemistry* **272**(46): 28823-5.
- Pilka, R., H. Domanski, S. Hansson, P. Eriksson y B. Casslen (2004). Endometrial TIMP-4 mRNA is high at midcycle and in hyperplasia, but down-regulated in malignant tumours. Coordinated expression with MMP-26. *Molecular Human Reproduction* **10**(9): 641-50.
- Pozzi, A., P. E. Moberg, L. A. Miles, S. Wagner, P. Soloway y H. A. Gardner (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1

knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(5): 2202-7.

- Regula, K. M., K. Ens y L. A. Kirshenbaum (2002). IKK beta is required for Bcl-2-mediated NF-kappa B activation in ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **277**(41): 38676-82.
- Ritter, L. M., S. H. Garfield y U. P. Thorgeirsson (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**(2): 494-9.
- Roeb, E., A. K. Bosserhoff, S. Hamacher, B. Jansen, J. Dahmen, S. Wagner y S. Matern (2005). Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinases: relevance to intracellular signaling pathways. *World J Gastroenterol* **11**(8): 1096-104.
- Roeb, E., R. Winograd, B. Breuer, H. Nguyen y S. Matern (1999). Increased TIMP-1 activity results in increased expression of gelatinases and altered cell motility. *Journal of Cellular Biochemistry* **75**(2): 346-55.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer y M. E. Peter (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal* **17**(6): 1675-87.
- Seo, D. W., H. Li, L. Guedez, P. T. Wingfield, T. Diaz, R. Salloum, B. Y. Wei y W. G. Stetler-Stevenson (2003). TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* **114**(2): 171-80.
- Sherbet, G. V. y D. Patil (2003). Genetic abnormalities of cell proliferation, invasion and metastasis, with special reference to gynaecological cancers. *Anticancer Research* **23**(2B): 1357-71.
- Sheu, B. C., H. C. Lien, H. N. Ho, H. H. Lin, S. N. Chow, S. C. Huang y S. M. Hsu (2003). Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Research* **63**(19): 6537-42.
- Smith, M. R., H. Kung, S. K. Durum, N. H. Colburn y Y. Sun (1997). TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* **9**(10): 770-80.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Tummalapalli, C. M., B. J. Heath y S. C. Tyagi (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* **80**(4): 512-21.
- Tunuguntla, R., D. Ripley, Q. X. Sang y N. Chegini (2003). Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* **89**(3): 453-9.
- Vindelov, L. y I. Christensen (1994). [Flow cytometric analysis of DNA and its use in clinical and experimental oncology]. *Gematologija i Transfuziologija* **39**(6): 8-12.
- Vivanco, I. y C. L. Sawyers (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel y A. S. Baldwin, Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**(5383): 1680-3.
- Wang, M., Y. E. Liu, J. Greene, S. Sheng, A. Fuchs, E. M. Rosen y Y. E. Shi (1997). Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* **14**(23): 2767-74.
- Wang, T., K. Yamashita, K. Iwata y T. Hayakawa (2002). Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**(1): 201-5.
- Waxman, D. J. y P. S. Schwartz (2003). Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy. *Cancer Research* **63**(24): 8563-72.
- Wick, M., C. Burger, S. Brusselbach, F. C. Lucibello y R. Muller (1994). A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *Journal of Biological Chemistry* **269**(29): 18953-60.
- Yoshiji, H., S. R. Harris, E. Raso, D. E. Gomez, C. K. Lindsay, M. Shibuya, C. C. Sinha y U. P. Thorgeirsson (1998). Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *International Journal of Cancer* **75**(1): 81-7.
- Young, D. A., B. W. Phillips, C. Lundy, R. K. Nuttall, A. Hogan, G. A. Schultz, K. J. Leco, I. M. Clark y D. R. Edwards (2002). Identification of an initiator-like element essential for the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4) gene. *Biochemical Journal* **364**(Pt 1): 89-99.

Zhang, J., Y. J. Cao, Y. G. Zhao, Q. X. Sang y E. K. Duan (2002). Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Molecular Human Reproduction* **8**(7): 659-66.

Zhao, W. Q., H. Li, K. Yamashita, X. K. Guo, T. Hoshino, S. Yoshida, T. Shinya y T. Hayakawa (1998). Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *Journal of Cell Science* **111** (Pt 9): 1147-53.