

61



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DETERMINACION DE LA EXPRESION DE PROTEASAS Y SU CORRELACION CON INVASIVIDAD EN CELULAS TRANSFECTADAS CON EL GEN RAS NORMAL Y MUTADO.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**JUANA BEATRIZ GUZMAN SORIANO**

200364



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA.**

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEASAS Y SU  
CORRELACIÓN CON INVASIVIDAD EN CÉLULAS  
TRANSFECTADAS CON EL GEN RAS NORMAL Y MUTADO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BÍOLOGA

P R E S E N T A :

JUANA BEATRIZ GUZMÁN SORIANO.

MÉXICO, D.F. 2001

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: PROF. RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO.

Vocal: PROF. RODRÍGUEZ PENAGOS MIREYA.

Secretario: PROF. PÉREZ CÁRDENAS ZEFERINO ENRIQUE.

1er. Suplente: PROF. BELTRAN PEÑA ELDA MARÍA GUADALUPE.

2do. Suplente: PROF. ORTEGA MUÑOS RAQUEL.

Sitio donde se desarrolló el tema:

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN BÁSICA.**

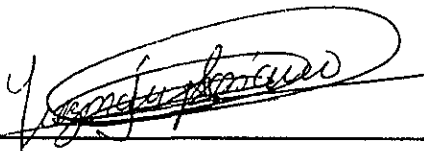
Asesor del tema:



---

BIÓL. ZEFERINO ENRIQUE PÉREZ CÁRDENAS.

Sustentante:



---

JUANA BEATRIZ GUZMÁN SORIANO.



**Las cosas magnificas han sido logradas por los que han creído  
en algo dentro de ellos superior a las circunstancias.**

**B. Barton**

A mis padres:

MARÍA ELENA Y NICOLÁS.

A mi hermana y hermanos:

Rosa Maria, Carlos, Enrique, Jose Luis y Arturo

A mis abuelos:

Rufina, Miguel, Juanat y Juliot.

A:

Gerardo, Cecilia, Isabel, Paz y Elvira.

A:

Diana, Ricardo, Gerardo, Fabis, Cristian, Andrea, Arturo,  
Fernanda, Alberto, Gabi y David.

Al Dr. Miguel Romero Lira:

Por el apoyo, los consejos y la confianza.

A mis amigas y amigo:

Emmi, Mariana, Elisa, Blanca, Delia, Nora Zaide, y Carlos.

A todos mis compañeros (as) que me han apoyado en todo momento:

Alma, Blanca Angelica, Alejandra, Marisela, Claudia, Josefina,  
Adriana, Ines, Vilma, Maria de Jesus, Kati, Lucia, Mariano,  
Ernesto, Francisco A., Diana, Cesar y Emma.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres:

Por las observaciones que enriquecieron de forma importante el presente trabajo.

A la Dra. Mireya Rodríguez Penagos:

Por sus consejos y el tiempo dedicado a la revisión de éste trabajo.

Al M. en C. Enrique Pérez:

Gracias por ser mi asesor, amigo y soportarme todo este tiempo.



ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
I. Participación del oncogen <i>ras</i> en la transformación celular.	6
1. Características estructurales y localización celular de las proteínas <i>ras</i> .	6
2. Actividades de p21 <sup>ras</sup> .	8
3. Activación de otros efectores por <i>ras</i> .	8
4. Mutaciones activas en p21 <sup>ras</sup> .	9
II. Participación de la proteólisis en la invasividad tumoral.	10
1. Características generales de las metaloproteasas.	12
2. Regulación de las metaloproteasas (MMPs).	15
<b>ANTECEDENTES</b>	17
<b>HIPÓTESIS</b>	19
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	20
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	21
I. Plásmidos transfectados.	21
II. Cultivo celular.	22
III. Medida de proliferación y viabilidad celular.	23
IV. Ensayos de colonización sobre agar semisólido.	24
V. Western blot de <i>Ras</i> .	24
VI. Ensayo de tumorigenicidad.	25
VII. Cultivo sobre gelfoam y obtención del medio condicionado.	26

## ÍNDICE

---

VIII. Obtención del medio condicionado de los cultivos celulares.	26
IX. Zimogramas del medio condicionado de los explantes y cultivos celulares.	26
X. Geles desnaturalizantes del medio condicionado.	28
XI. Análisis histológico.	29
XII. Análisis estadístico.	29
<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
1. Caracterización de las células transfectadas con <i>ras</i> .	55
2. Secreción de las metaloproteasas en los cultivos celulares.	57
2.1. Actividad de las MMP-2 y MMP-9.	58
2.2. Presencia de otras MMPs en los cultivos celulares.	59
3. Tumorigenicidad inducida por <i>ras</i> .	60
4. Tumorigenicidad y actividad proteolítica.	61
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>66</b>

---

**ABREVIATURAS**

AP-1: Factor de transcripción AP-1.

APMA: Acetato p-aminofenilmercúrico.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

EGF: Del inglés Epidermal Growth Factor. Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Del inglés Epidermal Growth Factor Receptor. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

GAP-1: Proteína activadora de GTPasa.

GFRs: Del inglés Guanine Factors Release. Factores liberadores de nucleótidos de guanina.

GRB-2: Proteína adaptadora de nucleótidos de guanina.

kDa: kiloDaltones.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos.

MAPKK: Proteína cinasa de proteína cinasa activada por mitógenos.

MB: Membrana basal.

MEC: Matriz extracelular.

MMPs: Del inglés Matrix metalloproteinases. Metaloproteasas de matriz.

*Mr*: Movilidad relativa.

PAGE: Del inglés Polyacrilamide Gel Electrophoresis. Electroforesis o en geles de poliacrilamida.

PBS: Del inglés Phosphate Buffer Solution. Solución amortiguadora de fosfatos.

PDGF: Del inglés Platelet-derived Growth Factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDGFR: Del inglés Platelet-derived Growth Factor Receptor. Receptor de crecimiento derivado de plaquetas.

SHC: Proteína adaptadora de *ras*.

SOS: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina.

TIMP: Del inglés Tissue inhibitor of Matrix Metalloproteinase. Inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz.

U.D.: Unidad densitométrica.

---

## RESUMEN

En la presente tesis se evaluaron diferentes parámetros de transformación para determinar los cambios morfológicos, la formación de colonias en agar blando, los incrementos en la proliferación celular y la secreción de enzimas proteolíticas en células 3T3 NIH transformadas con el gen *ras* normal y mutado para, posteriormente, correlacionar la capacidad de generar tumores con ratones atímicos. De las células a las cuales se les introdujo el gen *ras*, se obtuvieron las clonas EC4 y EC10 (células transfectadas con el protooncogén *Ha-ras*) y las clonas EJ3 y EJ20 (clonas transfectadas con el oncogén *Ha-ras*). Las clonas EJ3 y EJ20 presentaron cambios morfológicos, formaron colonias sobre agar blando (18 y 5.4 colonias respectivamente) y un mayor número de tumores, con un incremento en el volumen tumoral; así como una disminución en el tiempo de aparición del tumor, en comparación con las clonas EC4 y EC10. Para cada uno de los ensayos se utilizaron las clonas controles Test1 y Neo5 (clona silvestre y control de la transfección respectivamente). Al comparar estas dos últimas, Neo5 formó más colonias en agar blando y formó un tumor en un ratón.

También se determinó la secreción de enzimas proteolíticas en sobrenadantes de cultivos celulares y en explantes tumorales. Para evidenciar dichas enzimas se realizaron zimogramas de gelatinas y de caseína, revelando la presencia de gelatinasa A y B (MMP-2 y MMP-9, respectivamente), así como estromelisin-1 (MMP-3) y colagenasa intersticial (MMP-1). Se comprobó la naturaleza de estas enzimas como metaloproteasas de matriz (MMPs) por la inhibición de las gelatinasas con EDTA y la activación de la forma inactiva de la enzima con AMPA (acetato de p-aminofenilmercúrico). Los resultados mostraron un incremento de las clonas EJ3 y EJ20 en la secreción de la MMP-2, tanto en los cultivos celulares, como en los explantes tumorales, observándose una relación directa entre la formación tumoral de estas clonas y una mayor secreción de esta metaloenzima, sugiriendo que la participación de esta enzima es importante en el desarrollo tumoral. De la MMP-9 *in vivo* sólo se detectaron por densitometría pequeñas cantidades.

También se observaron otras gelatinasas de mayor peso molecular (de 111, de 98 y de 77 kDa). Los promedios de la actividad gelatinolítica total de ambos grupos (grupo I,

---

cultivos celulares; grupo II, explantes celulares) fueron evaluados mediante la prueba de ANOVA de Scheffé, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el grupo I, entre EC4, EC10, EJ3 y EJ20 ( $p < 0.05$ ). Las clonas Neo5, EJ3 y EJ20, pertenecientes al grupo II, presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la actividad enzimática total ( $p < 0.05$ ).

---

## INTRODUCCIÓN

La invasión y metástasis son procesos de propagación de células tumorales por todo el cuerpo del huésped. Dichos procesos se inician con la proliferación de las células tumorales en el sitio primario de formación del tumor, seguido de su diseminación al cruzar la membrana basal de los tejidos. Algunas de estas células invasivas pueden viajar a través de la circulación, penetrando la membrana basal de las células epiteliales del vaso sanguíneo, para implantarse en un nuevo sitio. Finalmente, sólo unas pocas células neoplásicas desarrollarán un tumor secundario o metástasis, invadiendo un nuevo tejido. Para que ocurra toda esta serie de pasos, las células cancerosas presentan cambios en sus capacidad de secreción de enzimas, en su movilidad, en su capacidad de interaccionar con componentes de la matriz extracelular y su adhesión intercelular, además de evadir el sistema inmune del huésped (Liotta y Stetler-Stevenson, 1993; Rouslati, 1996).

Durante el desarrollo tumoral, las células cancerosas presentan inestabilidad genética (Hills *et al.*, 1988). Esto se refleja especialmente en que varios genes se activan o dejan de expresarse a lo largo de la transformación celular. Entre los genes que participan de manera activa, se encuentran los protooncogenes, los cuales al volverse anormalmente activos o sobreexpresados, ocasionan la pérdida del control normal de la proliferación celular (Thorgeirsson *et al.*, 1985).

Los protooncogenes son genes que participan en la regulación normal de los procesos de división, diferenciación y crecimiento celular. Cuando se detectan alteraciones en la expresión de éstos, reciben el nombre de oncogenes. Estas alteraciones pueden ser debidas a mutaciones puntuales, amplificación, translocación cromosomal, eliminación e inversiones de los genes, dando como resultado cambios en la actividad transcripcional y en los productos codificados por estos genes. Entre los protooncogenes conocidos están *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, *ras*, entre otros, y se han visto involucrados en la comunicación intercelular, en la transducción de señales y en la proliferación celular, por lo que cambios en su actividad pueden conducir a la célula hacia la transformación (Liotta y Stetler-Stevenson, 1993).

## I. PARTICIPACIÓN DEL ONCOGEN *RAS* EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR.

El gen *ras* es el que más ha sido asociado con la transformación celular y con el desarrollo de una fracción significativa de neoplasias humanas de diversos orígenes. La incidencia de alteraciones genéticas de este gen en la progresión de carcinomas humanos se ha observado en aproximadamente el 30 % de todos los tipos tumorales, entre los que destacan el cáncer de páncreas, en el que el gen se encuentra mutado hasta en un 90 % de los pacientes y en el cáncer de colón, en el que el 50 % de los enfermos presentan alteraciones de *ras*. También se ha observado una incidencia significativa de alteraciones de *ras* en otros tumores como el de pulmón, vejiga, linfomas, leucemias, neuroblastomas y sarcomas (Sjoerd y Slebos, 1990; Cooper, 1995).

### 1. Características estructurales y localización celular de las proteínas *ras* (p21).

Tanto en humanos como en roedores se han localizado tres genes *ras* funcionales: Harvey-*ras* (H-*ras*), Kirsten-*ras* (K-*ras*) y N-*ras* (descubierto en una línea celular de neuroblastoma), los cuales son expresados virtualmente en todos los tejidos adultos y fetales (Lowy y Willumsen, 1993). Los genes *ras* codifican proteínas de 188 o 189 aminoácidos denominadas p21<sup>*ras*</sup> (las proteínas presentan un peso molecular de 21 kDa) que difieren en una región de 20 aminoácidos cerca del carboxilo terminal. Las proteínas p21<sup>*ras*</sup> se dividen en tres regiones: una región denominada CAAX, una región heterogénea y un dominio catalítico (figura 1).



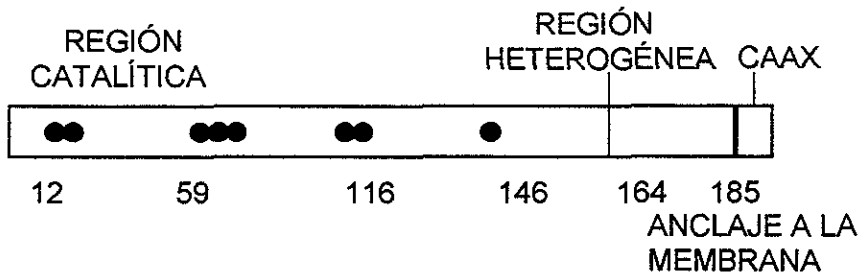


FIGURA 1. ESQUEMA QUE ILUSTRAS LAS REGIONES IDENTIFICADAS EN LA PROTEÍNA p21<sup>ras</sup>. La región denominada CAAX debe su nombre a la secuencia de aminoácidos Cisteína, Aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido. (•) Posiciones en las que se han detectado mutaciones con actividad oncogénica (Lowy y Willumsen, 1993).

Las proteínas p21<sup>ras</sup> se localizan en el interior de la membrana plasmática de la célula; su adhesión a esta membrana es facilitada por varias modificaciones post-traduccionales del carboxilo-terminal de la proteína que incluyen la farnesilación, metilación y palmitoilación. La cisteína 186 localizada en la región CAAX es la primera modificada por la enzima proteína farnesil transferasa (farnesilación), los tres aminoácidos siguientes son degradados proteolíticamente y el carboxilo de la cisteína así liberado, es metilado dando lugar a una proteína más hidrofóbica. Estas modificaciones, seguidas de la palmitoilación de cisteínas localizadas en la región heterogénea (alrededor de la posición 164), incrementan la afinidad de la proteína para su asociación a la membrana, lo cual le permite participar en la transducción de señales del exterior celular al núcleo (Levine, 1992; Chambers y Tuck, 1993; Lowy y Willumsen, 1993; Maruta y Burges, 1994). El número y la localización de las cisteínas en la región heterogénea son diferentes en los diversos tipos de proteínas p21<sup>ras</sup>; estas diferencias pueden estar asociadas a diferentes actividades de las variantes de p21<sup>ras</sup> (White, 1995).

en la tumorigénesis y así como a la metástasis; Hofmann, *et al.*, 1993; Maruta y Burges, 1994; Chen e Iyengar, 1995; Graff *et al.*, 1995; White, 1995; Marshall, 1996).

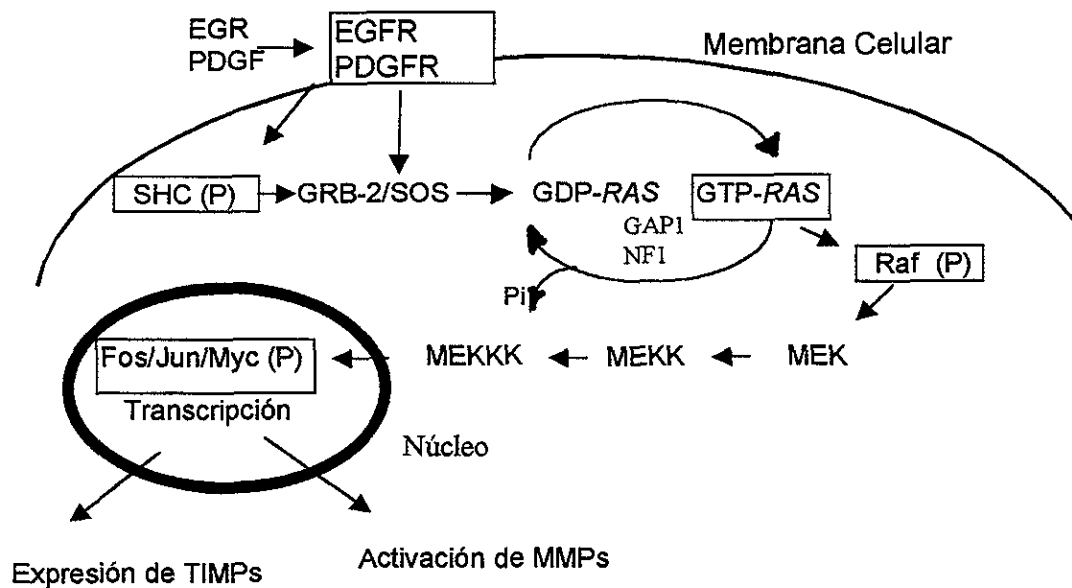


FIGURA 2. ACTIVACIÓN DE RAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. Una variedad de factores de crecimiento disparan la activación de Ras (e.i. EGF, PDGF). Estos factores al unirse a sus respectivos receptores con dominios con tirosina, se activan y autofosforilan. El receptor fosforilado se une al complejo GRB-2 y SOS (complejo estable que constituye al factor liberador de nucleótidos; GRFs) y reduce la afinidad de p21<sup>ras</sup> a GDP, pero no para el GTP. La proteína p21Ras-GTP activa la vía de señalización de las proteínas cinasas (MEK, MEKK, MEKKK) finalizando en la activación de las metaloproteasas de matriz, así como de otros genes, *jun*, *myc* y *fos* y de forma contraria, inhibiendo la expresión de TIMP-1 y TIMP-2.

#### 4. Mutaciones activas en p21<sup>ras</sup>.

El gen *Ha-ras* fue el primer oncogen humano identificado en carcinoma de vejiga (EJ/T24), el cual se considera homólogo celular del oncogen *Ha-ras* del retrovirus murino del sarcoma de Harvey. Normalmente, este gen presenta un codón para glicina en la posición 12, sin embargo, este aminoácido se encuentra sustituido por una valina en el

producto del oncogen Ha-*ras* EJ. Este único cambio es suficiente para transformar el protooncogen p21<sup>ras</sup> en un oncogen activo, induciendo así la transformación neoplásica. Como se mencionó anteriormente, p21<sup>ras</sup> en esta condición no es capaz de hidrolizar GTP, debido a que el grupo isopropilo de la valina no permite la entrada de agua en el sitio catalítico de la proteína *ras* (Hills *et al.*, 1988, Levine, 1992; Lowy y Willumsen, 1993). Lo anterior provoca que p21<sup>ras</sup> mantenga por más tiempo la señal recibida. La activación y sobreexpresión de *ras*, no sólo son pasos críticos en la carcinogénesis, sino también podrían ser en parte responsables de la adquisición de las características de invasividad y de metástasis por parte de las células tumorales. Parte de la vía de transducción de *ras* esta involucrada en la modulación de proteínas, como la actina, la cual juega un papel fundamental en el citoesqueleto y por tanto en la movilidad celular (Marsall, 1991). El hecho de que *ras* sea el oncogen más activo en los tumores humanos, sugiere que su participación es preponderante en el desarrollo tumoral (Thorgeirsson *et al.*, 1985; Hills *et al.*, 1988; Cooper, 1995).

## II. PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÓLISIS EN LA INVASIVIDAD TUMORAL.

Las células tumorales, una vez que experimentan una serie de eventos genéticos que favorecen el fenotipo transformado e invasor, son seleccionadas en base a sus características que las capacitan para atravesar las barreras tisulares del huésped, gracias a lo cual pueden entrar y salir de los vasos sanguíneos hacia los órganos y tejidos, evadir las defensas del hospedero y formar colonias en un nuevo sitio distante a la formación del tumor primario. Sin embargo, una de las principales barreras de diseminación de un tumor es la matriz extracelular (MEC), la cual se localiza entre el epitelio y el tejido conectivo. Ésta se encuentra integrada por la membrana basal (MB) y el estroma intersticial. La MB está formada por tres capas: a) lámina lúcida (adyacente a la membrana de las células), b) la lámina densa que esta formada por colágena tipo IV, laminina, heparán sulfato proteoglicano, entactina y nidógeno y c) la lámina reticularis, probablemente producida por fibroblastos y fomada por colágena tipo I, II, III, V, fibronectina, proteoglicanos y

glicosaminoglicanos. Las funciones de la MB son participar en la adhesión celular, en la diferenciación, en la filtración selectiva, en la morfogénesis, y separar y dar soporte a los epitelios (Mignatti y Rifkin, 1992; Ray y Stetler-Stevenson, 1994 (a)).

El estroma intersticial conecta los compartimientos de los tejidos del organismo y está formada por colágena intersticial, elastina y una sustancia amorfa que contiene glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos (Mignatti y Rifkin, 1992; Ray y Stetler-Stevenson, 1994 (a)).

Las células tumorales son capaces de interactuar y degradar la MEC mediante la secreción de enzimas. Durante la extravasación de las células neoplásicas y su colonización de un nuevo tejido, éstas se adhieren a la MB empleando receptores de membrana que interactúan con algunos de sus componentes, como son la laminina y fibronectina (Liotta *et al.*, 1983; Liotta, 1992). La degradación de la membrana basal permite la invasión, diseminación y metástasis de las células tumorales (Liotta *et al.*, 1991; Matrisian, 1992 (a); Mignatti y Rifkin, 1992; Stetler-Stevenson *et al.*, 1993). Todas estas alteraciones son únicas y características de tumores malignos, ya que en los tumores benignos la MB no está alterada estructuralmente.

Una vez que la célula tumoral invade el estroma, puede pasar a la circulación sanguínea (extravasación), o bien a la circulación linfática para depositarse en otros órganos distantes. Todas estas etapas son precedidas por la producción de enzimas capaces de degradar los componentes de la MB. Durante el proceso de invasión tumoral, la MB es degradada por dos mecanismos: 1) por metaloproteasas de matriz o MMPs y 2) por proteasas de amplia especificidad de sustrato, como elastasas, catepsinas (D, L y B) y plasmina (Werb, 1989; Mignatti y Rifkin, 1992). Las células tumorales producen ambos tipos de proteasas, pero las MMPs degradan de manera selectiva los componentes de la MEC. Particularmente, un incremento en la expresión y secreción de las MMP-2 y MMP-9, ha sido asociado estrechamente al desarrollo tumoral e invasividad (Woessner, 1991; Mignatti y Rifkin, 1992; Birkedal-Hasen, 1995; Powell y Matrisian, 1996), por lo que la capacidad de invasión de los tumores malignos depende de manera fundamental de la participación de las MMPs (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

## 1. Características generales de las MMPs.

Todas las MMPs son glucoproteínas que comparten las siguientes características (Werb, 1989<sup>a</sup>; Matrisian, 1992; Powell y Matrisian, 1996).

- a) Son producidas en forma de proenzimas (zimógeno).
- b) El mecanismo catalítico depende de  $Zn^{2+}$ ; del cual posee uno estructural y otro catalítico. Este último es el responsable de la susceptibilidad de la enzima a la inhibición por quelantes como el ácido etilendiamino tetra áctico (EDTA) y la 1,10-ortofenantrolina.
- c) Su activación esta mediada por la pérdida de un fragmento de aproximadamente de 8-10 kDa.
- d) El cDNA de todas las MMPs muestra homología entre sí.
- e) Pueden degradar uno o más componentes de la MEC.
- f) Pueden ser activadas por organomercuriales (acetato p-aminofenilmercúrico o APMA) y/o por enzimas como tripsina, plasmina, calicreína, catepsina G, etc.
- g) Pueden ser inhibidas por moléculas específicas denominadas TIMPs.

Además de las características antes citadas, también poseen detalles estructurales en común que incluye un péptido señal, un propéptido que contiene un interruptor de cisteína (PRCGVPD), un dominio catalítico de unión al  $Zn^{2+}$  en la secuencia HEXGHXXGXXHS, una región bisagra rica en prolina y un dominio semejante a la hemopepsina/vitronectina (figura 3, Ray y Stetler-Stevenson, 1994a ; Woessner, 1994; Powell y Matrisian, 1996; Chambers y Matrisian, 1997).

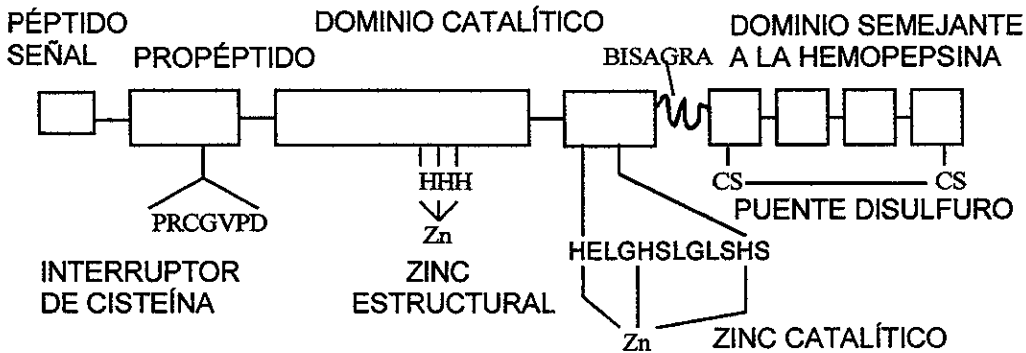


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LOS DOMINIOS DE LA COLAGENASA DE FIBROBLASTOS. La cual es considerada como la estructura prototipo de las MMPs.

Las metaloproteasas se han agrupado en una familia que se ha subdividido a su vez en cuatro grupos que se muestran en la tabla 1 (Powell y Matrisian, 1996; Chambers y Matrisian, 1997).

**TABLA 1. FAMILIA DE LAS MMPs (Jonson, Dyer y Hupe; 1998).**

ENZIMA	FORMA INACTIVA (Mr, kDa)	FORMA ACTIVA (Mr, kDa)	MMP	SUSTRATO
<b>GELATINASAS</b>				
Gelatinasa A/Colagenasa tipo IV	72	66-62	MMP-2	ProMMP-9, Gelatina, colágena IV, I, fibronectina y elastina.
Gelatinasa B/Colagenasa tipo IV	92	87-84	MMP-9	Gelatina, colágena IV, V, fibronectina y elastina.
<b>COLAGENASAS (CL)</b>				
Colagenasa Intersticial	52	42-48	MMP-1	ProMMP-2, proMMP-9 colágena I, II, III, VII, X y gelatina.
Colagenasa-3	52	42	MMP-13	Colágena I.

Continuación de la tabla 1.

ENZIMA	FORMA INACTIVA (Mr, kDa)	FORMA ACTIVA (Mr, kDa)	MMP	SUSTRATO
Colagenasa de Neutrófilo	75-85	65	MMP-8	Colágena I, II, III.
Colagenaza-4			MMP-18	Colágena I.
<b>ESTROMELISINAS</b>				
Estromelisina-1	57-60	42-48	MMP-3	ProMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-12, laminina, caseína, colágena I*, II**, Proteoglicanos.
Estromelisina-2	55	47	MMP-10	IV**, V, IX, X***, fibronectina y gelatina.
Estromelisina-3	61	50	MMP-11	Fibronectina, laminina, serpina.
Metaloelastasa	54	50	MMP-12	Elastina.
Matrilisina	28	20	MMP-7	ProMMP-9, fibronectina, colágena IV, gelatina, caseína, laminina, proteoglicano.
<b>MMP DE MEMBRANA</b>				
MMP membranal-1	63		MMP-14	ProMMP-2, proMMP-13, colágena fibrilar, proteoglicanos, MEC, glicoproteínas.
MMP membranal-2	63		MMP-15	Desconocido
MMP membranal-3	63		MMP-16	ProMMP-2.
MMP membranal-4	63		MMP-17	Desconocido

(\*) Sólo en la región amino-terminal.

(\*\*) Sólo en la región no helicoidal.

## 2. Regulación de las MMPs.

La actividad de las MMPs se encuentra altamente regulada, este control puede ocurrir en los siguientes niveles:

- a) Activación de los genes y transcripción del ARNm.
- b) Secreción y activación de la proenzima.
- c) Inhibición por TIMP-1 y TIMP-2 de las formas activas de las MMPs.
- d) La unión de las proenzimas a los componentes de la MEC y/o membrana celular.

Los genes de las MMPs no son expresados constitutivamente; la expresión de los genes de las MMPs puede ser inducida por factores de crecimiento, agentes químicos, agentes físicos, etc (Werb, 1989; Woessner, 1991; Mauviel, 1993; (a) Ray y Stetler-Stevenson, 1994).

Una vez que el ARNm de MMPs es traducido, la enzima es expresada y secretada en forma de proenzima. La activación de las MMPs ha sido bien caracterizada a través de estudios *in vitro*. Esta activación es referida al mecanismo del interruptor de cisteína (figura 4). En este mecanismo, la cisteína localizada en el propéptido se une al átomo de zinc del sitio catalítico manteniendo de esta forma a la enzima inactiva (figura 3; Woessner, 1994; Chambers y Matrisian, 1997). La activación de la enzima *in vitro* se lleva a cabo cuando esta unión se interrumpe por agentes como el APMA (acetato p-aminofenilmercúrico), el ácido hipocloroso (HOCl), el dodecil sulfato de sodio (SDS) o por enzimas, ocurriendo el rompimiento del propéptido (Stetler-Stevenson, 1989; Woessner, 1991; Birkedal-Hasen, 1995). Las MMPs, proestromelisin-1 y 2, promatrilisina y la procologenasa de fibroblastos y neutrófilos, contienen sitios susceptibles de ser degradados por enzimas como plasmina, tripsina y calicreína (figura 4; Woessner, 1991).



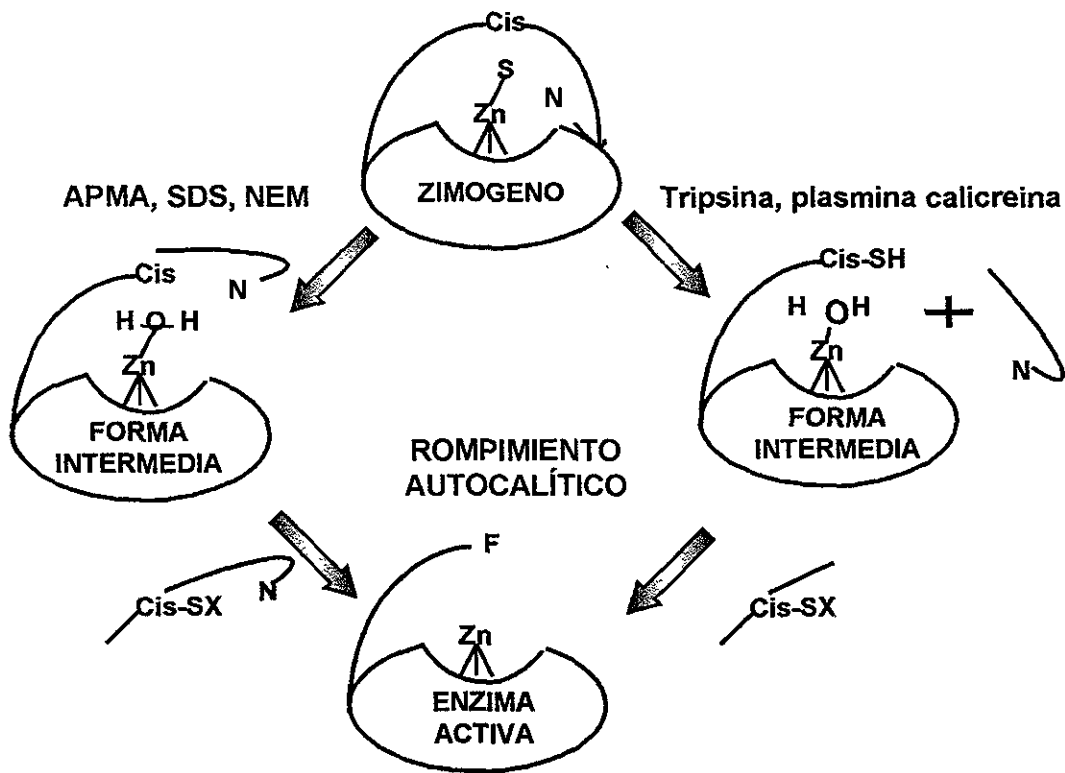


FIGURA 4. MECANISMO DEL INTERRUPTOR DE CISTEÍNA PARA LA ACTIVACIÓN DE LAS MMPs POR ENZIMAS Y OTROS AGENTES, MECANISMO PROPUESTO POR SPRINGMAN (WOESSNER, 1994).

La actividad de las MMPs sobre los componentes de la MEC es dependiente del balance entre las enzimas y los inhibidores específicos TIMP-1 y TIMP-2. Lo anterior es fundamental durante el proceso de invasión, porque no es necesario que se sobreexpresen las proteasas por parte de las células tumorales para que éstas sean capaces de difundirse. Si se pierden los controles de inactivación de la mismas o aumentan los factores que las activan, también se favorece el fenotipo invasivo. Se han identificado cuatro inhibidores, que constituyen una familia: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4.

## ANTECEDENTES

El estudio sobre el desarrollo del cáncer requiere del uso de sistemas experimentales en los cuales la transformación celular pueda ser inducida y analizada sistemáticamente. Esto implica el uso de ensayos *in vivo* y ensayos en los cuales se mantengan las células bajo condiciones controladas (ensayos *in vitro*). La transformación de células en cultivo debe ser considerada únicamente una aproximación a la formación de células tumorales en el organismo intacto. Sin embargo, la transformación de células *in vitro* provee de una valiosa herramienta para evaluar la actividad biológica de carcinógenos químicos, físicos y biológicos que sean capaces de inducir tumores en animales experimentales (Cooper, 1995).

La capacidad de las células transformadas para formar neoplasias al ser inoculadas en animales de experimentación es variable, y esto depende del recipiente celular en el cual sean transfectados los oncogenes. Estos oncogenes son capaces de conferir algunas características de transformación, esta transformación puede ser evaluada mediante métodos *in vitro* como: independencia de anclaje, permitiéndoles que formen colonias sobre agar blando, cambios a nivel morfológico; aumentando su movilidad a través de matrices sintéticas, incrementando en su actividad proteolítica y en muchos casos, la ya mencionada tumorigenicidad en animales (Bradley *et al.*, 1986; Chan *et al.*, 1992). Un procedimiento ampliamente utilizado de transformación celular es la transfección del oncogen c-Ha-*ras* en fibroblastos de ratón 3T3 NIH. Este modelo experimental permite evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* la capacidad tumorigénica e invasiva de estas células transformadas. Greig *et al.* (1985), Muschel *et al.* (1985), Geiser *et al.* (1986) y Chambers *et al.* (1993) encontraron que el nivel de expresión del oncogen c-Ha-*ras* (con mutación puntual en codón 12) es un factor importante en la transformación de células 3T3 NIH y que un incremento de la oncoproteína p21<sup>ras</sup> es requisito para la tumorigénesis y/o invasión.

La expresión del oncogen c-Ha-*ras* ha sido implicado en el desarrollo de numerosos tumores humanos y de animales. Así mismo, p21<sup>ras</sup> se ha asociado con la activación de las MMPs y con la invasividad, ya que estas enzimas como se mencionó

anteriormente son reguladas por *ras* y éstas degradan de manera selectiva los componentes de la MB y la MEC de los tejidos. Esta degradación forma parte de una serie de pasos involucrados durante la invasión de las células tumorales al tejido del huésped.

El papel de las gelatinasas en la tumorigenicidad e invasividad fue descrito por primera vez por Liotta *et al.* (1980) y en algunos estudios realizados con fibroblastos 3T3 NIH transformados, observándose que estas células secretan niveles moderados de gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), las cuales fueron detectadas por ensayos de zimografía (Chambers y Tuck, 1993; Xuan *et al.*, 1995). Al transfectar estos mismos fibroblastos con c-Ha-*ras*, Tuck *et al.* (1991) y Spinucci *et al.* (1988) observaron incrementos en la actividad de las gelatinasas A y B, principalmente las formas activas de cada gelatinasa. Por su parte Ballin *et al.* (1988 y 1991), empleando esta misma línea celular con la transfección con *ras*, obtuvieron incrementos en la actividad de la gelatinasa B. Sin embargo, la actividad de la gelatinasa A fue similar en los fibroblastos normales y en las líneas celulares transformadas, por lo que la gelatinasa B fue asociada con el fenotipo maligno. Por otro lado, Thorgeirsson *et al.* (1985), reportan altos niveles de colagenasa IV (la cantidad de colagenasa fue calculada a partir de la actividad específica de sustrato marcado radioactivamente), sin determinar cual de las dos gelatinasas era la que se encontraba incrementada. En estudios recientes realizados por Xuan *et al.* (1995) utilizando estas mismas células, los autores concluyeron que ambas gelatinasas estaban implicadas en la degradación de los componentes de la MB y se encuentran relacionadas con el fenotipo maligno.

En el presente proyecto, se correlacionaron los parámetros de transformación celular *in vitro* con la capacidad de poder inducir tumores *in vivo* y la secreción de enzimas proteolíticas (MMP-2 y MMP-9). Para cumplir con este objetivo se utilizaron células 3T3 NIH transformadas por el gen *ras*, caracterizándose en las clonas los diferentes parámetros de transformación en cultivos celulares y para estudiar la etapa de invasividad y tumorigénesis se utilizaron ratones atímicos.

## HIPÓTESIS

Las células 3T3 NIH transformadas por el oncogen *ras* mostrarán un patrón de actividad de proteasas alterado, lo que se acompañará de mayor invasividad y mayor capacidad tumorigénica en comparación con los fibroblastos transfectados con el gen c-Ha-*ras* normal.

## OBJETIVOS

1. Evaluar mediante ensayos *in vitro* (proliferación celular, cambios morfológicos, independencia de anclaje y secreción de MMP-2 Y MMP-9) la transformación de células 3T3 NIH transfectadas con el gen c-Ha-*ras* (normal y mutado).
2. Comparar la capacidad de invasión de las células 3T3 NIH transfectadas con el gen *ras* normal y mutado al formar tumores en ratones BALB/c nu/nu.
3. Describir y comparar las gelatinasas secretadas por las células transformadas en cultivos celulares y explantes tumorales generados en los ratones BALB/c nu/nu.
4. Correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con los obtenidos en los ensayos *in vivo*.

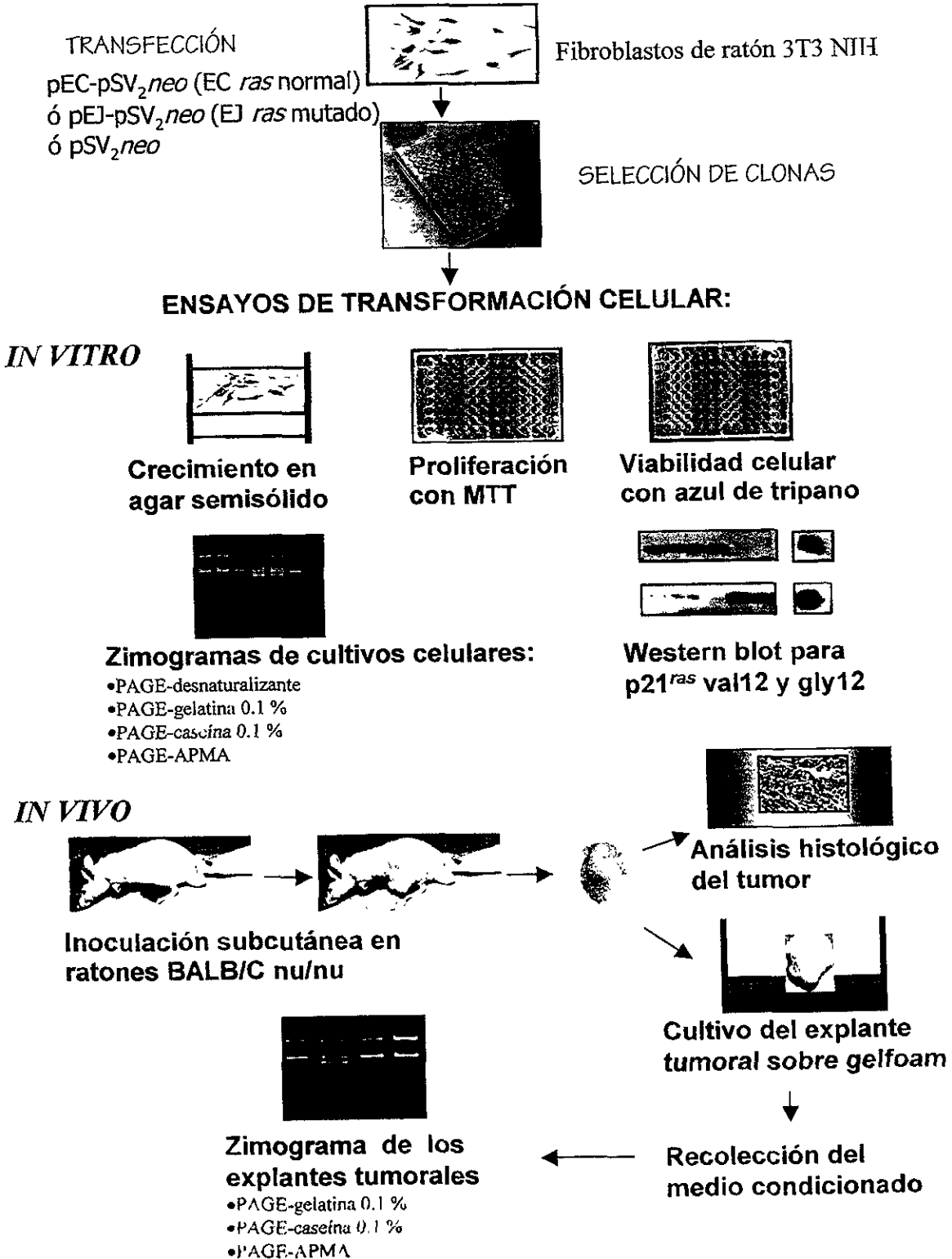
## HIPÓTESIS

Las células 3T3 NIH transformadas por el oncogen *ras* mostrarán un patrón de actividad de proteasas alterado, lo que se acompañará de mayor invasividad y mayor capacidad tumorigénica en comparación con los fibroblastos transfectados con el gen c-Ha-*ras* normal.

## OBJETIVOS

1. Evaluar mediante ensayos *in vitro* (proliferación celular, cambios morfológicos, independencia de anclaje y secreción de MMP-2 Y MMP-9) la transformación de células 3T3 NIH transfectadas con el gen c-Ha-*ras* (normal y mutado).
2. Comparar la capacidad de invasión de las células 3T3 NIH transfectadas con el gen *ras* normal y mutado al formar tumores en ratones BALB/c nu/nu.
3. Describir y comparar las gelatinasas secretadas por las células transformadas en cultivos celulares y explantes tumorales generados en los ratones BALB/c nu/nu.
4. Correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con los obtenidos en los ensayos *in vivo*.

**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. PLÁSMIDOS TRANSFECTADOS.

En el presente trabajo, el plásmido transfectado en las células 3T3 NIH es el que se describe en la figura 5. La anterior es una construcción elaborada por el Dr. Alejandro García-Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. En dicha construcción se encuentran el gen *ras* (normal o mutado) junto con el gen *pSV<sub>2</sub>neo*, el cual confiere la resistencia a la neomicina. Esta característica es empleada para la selección de los transformantes, ambos se encuentran en el vector de expresión pBR322. La transfección se realizó con el plásmido cortado con *EcoR*I. La diferencia del gen *ras* entre ambos plásmidos empleados radica en una sustitución de una glicina por una valina en el codón 12 (pEJ- *pSV<sub>2</sub>neo*).

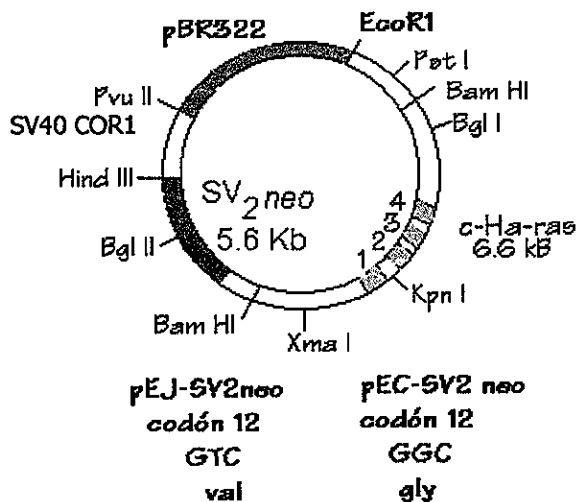


FIGURA 5. MAPA DE LOS PLÁSMIDOS PEJ-SV<sub>2</sub>NEO Y PEC-SV<sub>2</sub>NEO QUE CONTIENEN EL GEN RAS MUTADO Y NORMAL RESPECTIVAMENTE Y EL VECTOR SV<sub>2</sub>NEO. Aquí se muestran los diferentes sitios de corte por diversas enzimas de restricción.

## II. CULTIVO CELULAR.

Se utilizaron fibroblastos de ratón 3T3 NIH transfectados por electroporación con pEJ-pSV<sub>2</sub>neo (gen *ras* mutado), pEC-pSV<sub>2</sub>neo (gen *ras* normal), pSV<sub>2</sub>neo y células 3T3 NIH parentales (no transfectadas), las cuales fueron propagadas en botellas de 25 mL, manteniéndose en monocopa con Medio Mínimo Esencial Dulbecco (DMEM, GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (SFT), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 U/mL a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> y humedad del 80%. Una vez que los cultivos celulares llegaron a 100% de confluencia se procedió a recolectar las células con 20 µl de tripsina al 2.5% (v/v) por 1 mL de PBS-EDTA (NaCl 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.06 mM, KCl 0.2 mM, ácido etilendiamino tetra acético 1 mM) a pH 7.4. Para detener la reacción se adicionó 1 mL de PBS-albúmina (NaCl 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.06 mM, KCl 0.2 mM, albúmina 1% (p/v)) pH 7.4, centrifugándose a 400 xg durante 5 min para obtener el botón celular. Los botones celulares fueron resuspendidos con 1 mL de medio DMEM-SFT 10%. Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular con azul de tripano tomando una alícuota de 20 µl de la suspensión celular y adicionando 80 µl de azul de tripano al 0.05% (estas condiciones se utilizaron para todos los ensayos en los cuales se cultivaron e incubaron las células).

A continuación se obtuvieron diferentes clonas por el método de dilución de cada uno de las líneas celulares transfectadas y silvestres. A cada clona se le nombró de acuerdo al plásmido transfectado y se enumeraron conforme se fueron obteniendo: la serie Neo# representa a las clonas conteniendo el plásmido transfectado con pSV<sub>2</sub>neo, la serie EC# están transfectadas con pEC-pSV<sub>2</sub>neo y la serie EJ# aquellas transfectadas con pEJ-pSV<sub>2</sub>neo. Estas clonas fueron cultivadas en medio DMEM-SFT 10% (v/v) conteniendo geneticina (800 µg/mL, G418, GIBCO) por 2 semanas, con la finalidad de seleccionar a las clonas que expresan la resistencia conferida por el plásmido transfectado.

Las clonas empleadas en los estudios posteriores fueron las siguientes: Neo5, EC4, EC10, EJ3 y EJ20, de las células 3T3 NIH silvestres se empleó la clona



Test1. Las clonas Test1 y Neo5 se consideran como células control ya que no fueron transfectadas con el gen *ras*.

### III. MEDIDA DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR.

La proliferación celular se cuantificó por el método colorimétrico con MTT (bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio, Alley *et al.*, 1988) y la viabilidad se determinó con azul de tripano.

- **Método de medida de proliferación con MTT.**

De cada línea celular se cultivaron  $1 \times 10^3$  células/pozo en placas de 96 pozos con 100  $\mu$ l de DMEM-SFT 10% (v/v). Para determinar su población celular en cada pozo se leyó la absorbancia a 570 nm a las 0, 48, 96, 144, 192, 240 h de incubación. El ensayo se realizó por triplicado. Una vez transcurrido el tiempo para cada lectura se eliminó el medio de los pozos y se adicionaron a cada uno de los ellos 100  $\mu$ l de DMEM con 10  $\mu$ l de MTT; se mezcló perfectamente y se incubó por 4 h a 37 °C. Después de este tiempo, se agregaron a cada pozo 200  $\mu$ l de isopropanol ácido (HCl 0.04 N) mezclando vigorosamente para disolver los cristales formados.

- **Método de determinación de la viabilidad con azul de tripano.**

Este ensayo se realizó en paralelo con el MTT. Se cultivaron  $1 \times 10^3$  células/pozo en cajas de 96 pozos con 100  $\mu$ l de medio DMEM-SFT 10% (v/v), incubándose a 37°C; las lecturas de densidad celular se hicieron en iguales condiciones que las descritas en el punto A, también por triplicado. Las células se despegaron con 4  $\mu$ l de tripsina por 20  $\mu$ l de PBS-EDTA, deteniendo la reacción con 20  $\mu$ l de DMEM-SFT 10% (v/v). Posteriormente se adicionaron 160  $\mu$ l de azul de tripano al 0.05% (v/v) y se tomó una alícuota para la cuantificación de la viabilidad celular empleando un hemocitómetro.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{No. de células viables}}{\text{No. de células totales}} \times 100$$

#### IV. ENSAYOS DE COLONIZACIÓN SOBRE AGAR SEMISÓLIDO.

Para determinar la dependencia de anclaje de cada clona celular, en cajas de 24 pozos se colocaron 0.5 mL de DMEM sin suero con 0.7% (p/v) de agar noble por cada pozo. Una vez gelificado, se colocaron 500 células/pozo resuspendidas en DMEM-SFT 10%, glucosa 4 g/L y agar noble al 0.3% (p/v). El ensayo se realizó tres veces y por triplicado, incubándose bajo condiciones de cultivo. Las colonias fueron contadas en un microscopio invertido a los 7 y 15 días de incubación, considerándose una colonia aquella constituida por 10 células.

#### V. WESTERN BLOT PARA RAS.

Para obtener los extractos celulares de las clona se lisaron las células durante 1 h a 40°C con solución amortiguadora de lisis (Tris 28 mM a pH 7.1, NaCl 100 mM, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5 %, dithiotreitol 1 mM, PMSF 1 mM; Zhang *et. al.*, 1993). La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Cincuenta µg de proteína celular se depositaron por cada carril en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% (p/v; PAGE-SDS 10%). La electroforesis se corrió por 1 h a 15mA y se transfirieron las proteínas a un papel PVDF Millipore en solución amortiguadora (Tris 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20% v/v, pH 8.3) por 2 h a 200 mA a 4°C. La membrana se dejó con solución de saturación a base de leche baja en grasas (Sveltys, Nestle) durante 75 min, ésto con el propósito de bloquear las zonas libres del papel. La proteína p21<sup>ras</sup> mutada se detectó con el anticuerpo monoclonal pan-*ras*<sup>val12</sup> IgG2b (Oncogene, Sci.) y para la proteína p21<sup>ras</sup> normal se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 (Oncogene, Sci.) a una dilución 1:20 seguido por un segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con el fluorocromo del sistema ECL (Amersham), revelándose por fluorografía.

## VI. ENSAYO DE TUMORIGENICIDAD.

### • Cultivo celular.

Para ello se emplearon las clonas Neo5, EC4, EC10, EJ3 y EJ20; éstas fueron cultivadas hasta alcanzar un 100 % de confluencia celular. Se tripsinizaron como lo descrito en la parte II con las siguientes modificaciones: los botones celulares se lavaron tres veces con DMEM sin suero, centrifugando en cada ocasión a 400 xg por 5 min. Posteriormente las células fueron resuspendidas con 3 mL de medio DMEM sin SFT; de esta suspensión celular se tomó una alícuota de 20 µl para determinar la viabilidad celular con azul de tripano.

### • Inoculación de ratones BALB/C nu/nu.

Se utilizaron 8 ratones machos, atímicos, BALB/C nu/nu de 8 semanas de edad y se mantuvieron bajo condiciones estériles. En ambos costados de cada ratón se inocularon  $1 \times 10^6$  células 3T3 NIH transfectadas en 200 µl de DMEM sin suero. Cada clona se inyectó por triplicado. Al detectarse el crecimiento tumoral se midió el volumen tumoral (VT) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$VT = (a) (b)^2 \times \frac{\pi}{6}$$

Donde "a" es el diámetro menor y "b" es el diámetro mayor (Kjønniksen *et al.*, 1989). Cuando los tumores causaron disfunción en los animales, se procedió a sacrificar al ratón por dislocación cervical. El tumor fue disectado asépticamente y éste fue fraccionado para cultivarse sobre gelfoam (soporte de gelatina tridimensionales) y para su análisis histológico en cortes de parafina.

técnica modificada por Marbaix (1992). Las enzimas se colectaron del medio de cultivo libre de suero (medio condicionado).

- **Zimogramas en geles de poliacrilamida-gelatina al 8 %/0.1 % (v/v).**

A cada carril del gel de poliacrilamida al 8% se le adicionaron 2  $\mu$ g de proteína, conteniendo SDS 1% (p/v). Después de la electroforesis se removió el SDS por incubación en Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 20 min y posteriormente los geles fueron incubados por 4 h a 42°C en solución amortiguadora TNC, conteniendo Tris 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 mM a pH 7.4. Los geles fueron teñidos en una solución al 0.1 % (p/v) de azul de Coomassie R250 en metanol: ácido acético: agua destilada (5: 5: 1) a temperatura ambiente durante 15 min en agitación y desteñidos en 10% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético en agua desionizada. Las enzimas gelatinolíticas fueron detectadas como bandas transparentes sobre el fondo azul del gel teñido. La identificación de las gelatinasas se determinó de acuerdo a la movilidad relativa (*Mr*) comparando con un patrón de referencia. El análisis de la actividad enzimática se basó en la densitometría de los zimogramas, con ayuda de un espectrofotómetro (Beckman DU 650), en el que el área bajo la curva representa la actividad gelatinolítica leída a 562 nm.

Para confirmar la naturaleza de las MMPs, se realizaron geles PAGE-SDS 8% con gelatina que se incubaron con EDTA 20 mM, un inhibidor de MMPs, revelándose de la forma ya descrita anteriormente.

- **Activación con APMA de las formas latentes de las gelatinasas.**

La activación de las formas latentes de las gelatinasas se realizó con el organomercurial acetato p-aminofenilmercúrico 1 mM (APMA, Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; Arenas *et. al.*, 1997). Inicialmente se preparó el APMA 10 mM en una solución de Tris-base 50 mM. El volumen correspondiente a 2  $\mu$ g de proteína se mezcló con un volumen igual de Tris base 50 mM pH 7.4 y con APMA 1 mM concentración final; incubándose a 37°C durante 3 h. Después de la incubación se

---

mezcló con un volumen igual de solución amortiguadora de muestra y se depositó la mezcla anterior en los geles PAGE-SDS al 8% (v/v) y gelatina al 0.1% (p/v), empleando las mismas condiciones de separación y revelado descritas anteriormente.

- **Zimogramas de poliacrilamida- caseína 10%-0.1% (p/v).**

Para poner de manifiesto otras proteasas con actividad caseinolítica presentes en el medio condicionado de los cultivos celulares y explantes, se realizaron separaciones en geles de PAGE-SDS al 10% empleando como sustrato caseína al 0.1% (p/v). La caseína ( $\alpha$ -caseína de leche bovina) se preparó de acuerdo a Muskin (Muskin y Soreg 1981), disolviéndola en PBS a pH 7.4 y a una concentración de 15 mg/mL. La concentración de proteína se cuantificó por el método Bradford (1976).

Después de la electroforesis, los geles se lavaron con Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 20 min para eliminar el SDS. Posteriormente, los geles fueron incubados por 16 h a 37 °C en solución amortiguadora, conteniendo Tris 50 mM a pH 6.0. Al término de este tiempo los geles fueron revelados como se describió en el apartado VII. La identificación de las enzimas se determinó de acuerdo a la *Mr* comparándola con un patrón de referencia.

## **X. GELES DESNATURALIZANTES DEL MEDIO CONDICIONADO DE LOS CULTIVOS CELULARES Y EXPLANTES.**

A cada carril del gel PAGE 10% (p/v) se le adicionaron 2  $\mu$ g de proteína. No se le adicionó ningún tipo de sustrato con la finalidad de poner de manifiesto todas las proteínas presentes en el medio condicionado y comprobar que la concentración que se aplicó en cada carril fuera la misma para todos los sobrenadantes. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó y destiñó bajo las mismas condiciones descritas para los zimogramas.

## **XI. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.**

Una fracción de cada tumor se fijó con formaldehído 10% (v/v) amortiguado con PBS, se deshidató gradualmente con etanol (50%-100%, v/v), etanol-xilol (50%-50%, v/v), xilol y se embebió en parafina. A continuación se realizaron cortes histológicos de 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El diagnóstico y análisis morfológico fueron realizados por el Dr. Ricardo Delgado del Servicio de Patología del INCan.

## **XII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se utilizó la prueba ANOVA de Scheffé para evaluar los promedios de la actividad gelatinolítica (unidades densitométricas, U.D.) en ambos grupos, cultivos celulares y explantes tumorales, considerando una diferencia con un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa. Para evaluar la proliferación se utilizó el programa Origin 3.0, ajustando a la ecuación de Boltzman,  $(A1-A2)/(1 + \exp [X-X0]/dx) + A2$ . Posteriormente estos fueron resultados de proliferación fueron analizados por una ANOVA de Tukey para conocer si entre cada una de las curvas se presentaba una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

Se transfectaron células 3T3 NIH con tres diferentes plásmidos: a) pEJ-pSV<sub>2</sub>neo, que contiene el oncogen T24 c-Ha-ras; b) pEC-pSV<sub>2</sub>neo, que contiene el gen c-Ha-ras normal y c) pSV<sub>2</sub>neo (gen que le confiere resistencia a la geneticina o G418), el cual se empleó como control de la transfección. Se usó un cultivo de fibroblastos 3T3 NIH sin transfectar (silvestres) como testigo del ensayo. Como paso inicial para estudiar la transformación por el gen *ras* en células 3T3 NIH, se obtuvieron clonas de las células transfectadas con los diferentes plásmidos con el fin de tener una población homogénea y posteriormente fueron seleccionadas con el antibiótico G418. De éstas sólo se escogieron cinco clonas (Neo5, EC4, EC10, EJ3, EJ20) para todos los experimentos, en base a la mayor resistencia que presentaron al antibiótico.

Al analizar las clonas microscópicamente, se observó en Neo5 con la Test1 una morfología típica de los fibroblastos en cultivo, es decir, células en forma de huso y con un núcleo elíptico (figura 6a y b). Al comparar las clonas control con las clonas EJ3, EJ20, EC4 y EC10, se observó una alteración en la morfología de estas células debida a la transfección con los plásmidos electroporados, presentando formas irregulares y focos de crecimiento (figura 6c-6d). Estos focos se observaron en mayor cantidad en las clonas EJ.

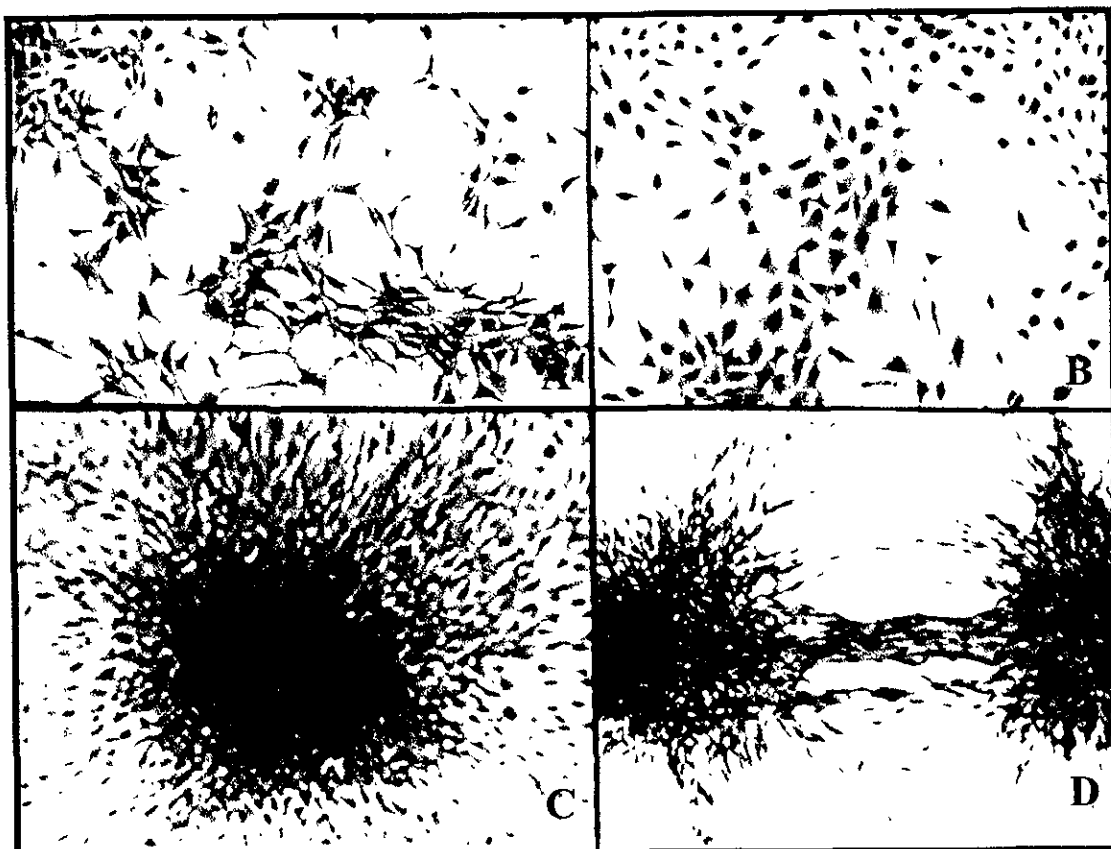


FIGURA 6. Morfología celular de fibroblastos 3T3 NIH transfectados y silvestres en cultivo celular. A) Clona Test1, B) clona Neo5, C) clona EC4 y D) clona EJ20. En estas dos últimas clonas (EC4 y EJ20) se observa la formación de un foco celular; EC4 formó focos hasta llegar a 100 % de confluencia celular y EJ20 formó focos sin llegar a esta misma confluencia.



La proliferación celular se evaluó con el método de MTT y de las curvas de crecimiento obtenidas se analizaron con una ecuación de crecimiento exponencial (ecuación de Boltzman). Como se observa en la figura 7, la clona EJ20 alcanza un máximo de crecimiento entre las 50 y 100 h, antes que las clonas EJ3, EC4, EC10, Neo5, Test1. Sin embargo, se realizó una evaluación estadística a las 25%, 50% y 75% (ANOVA de Tukey, inerSTAT v1.3) de confluencia celular y no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Los valores calculados de p fueron entre 0.97 a 0.78. Así mismo, los resultados de viabilidad celular de la figura 8, no se observaron diferencias significativas al analizar estas mismas clonas.

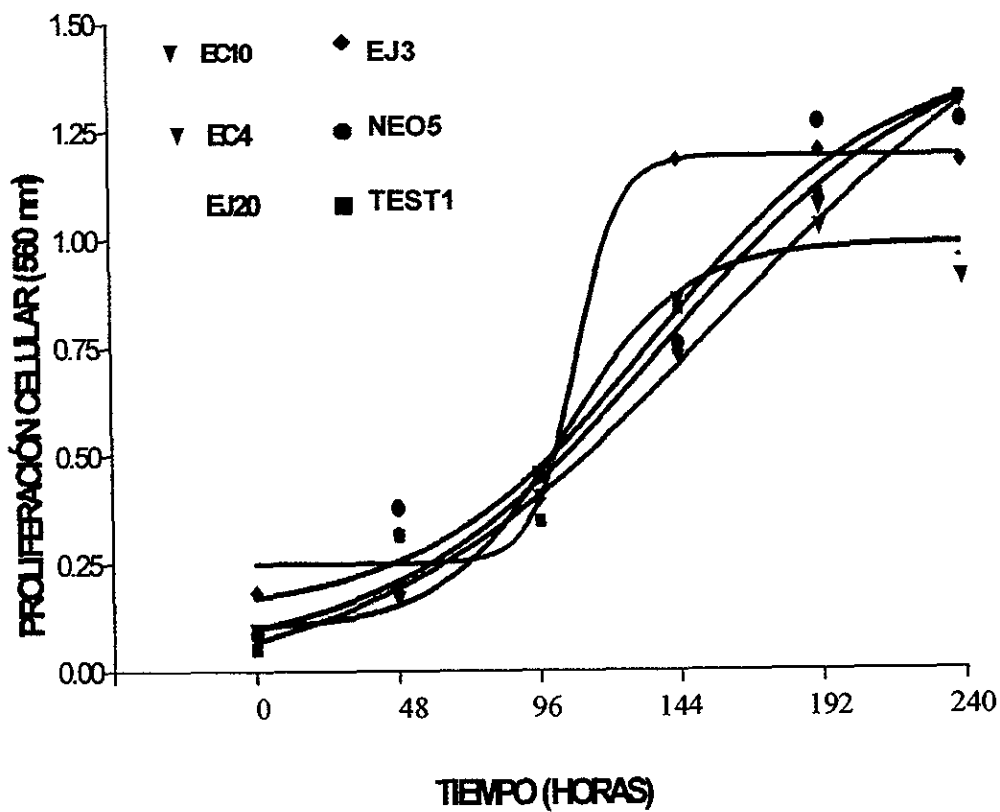


FIGURA 7. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CLONAS 3T3 NIH TRANSFECTADAS Y PARENTAL, AJUSTADAS A LA ECUACIÓN DE BOLTZMAN. Método de MTT. Los datos representan la media de tres experimentos diferentes y por triplicado.

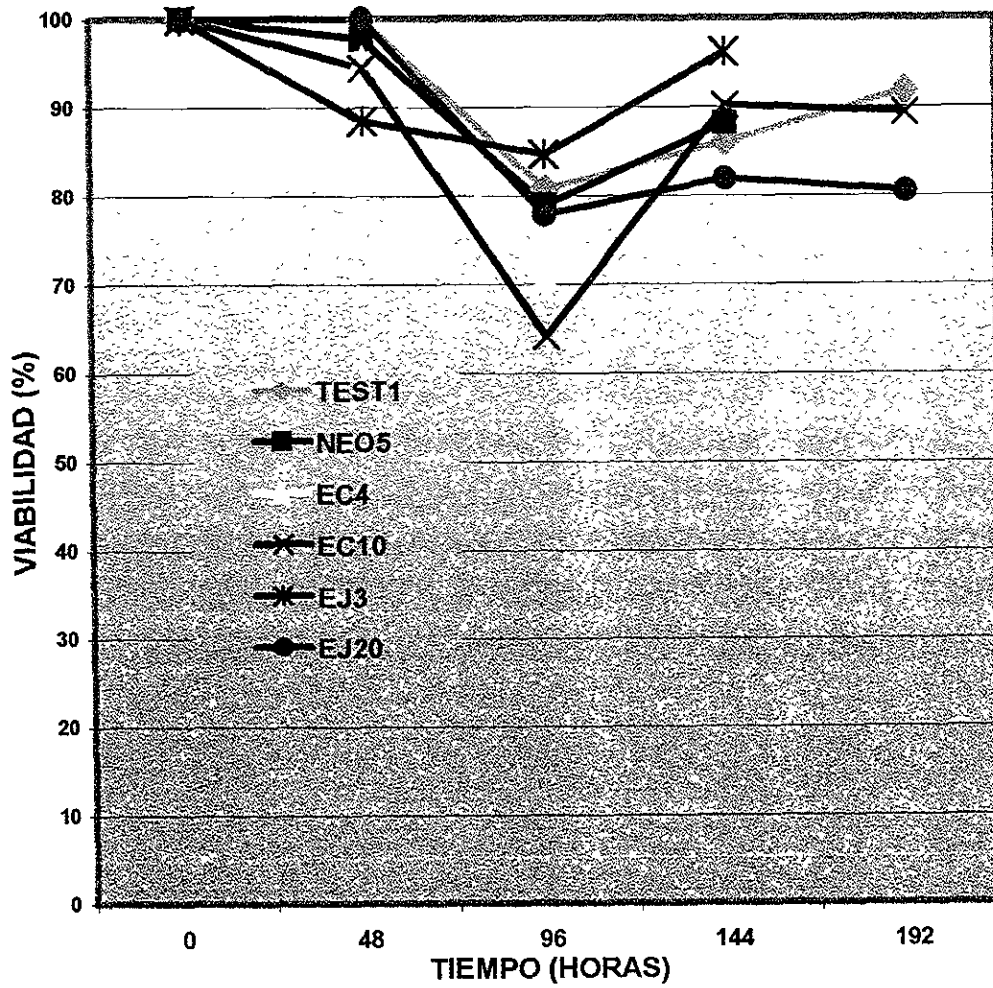


FIGURA 8. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN CLONAS 3T3 NIH TRANSFECTADAS Y PARENTAL, UTILIZANDO AZUL DE TRIPANO. \*Los datos representan la media de los valores determinados por triplicado.

---

Se determinó la capacidad de cada clona de formar colonias sobre agar blando para determinar su independencia de anclaje (figura 9). A los 7 días de incubación, ninguno de los controles Test1 o Neo5 formaron colonias, no es sino hasta los 15 días de incubación que se formaron 1.33 y 24.33, colonias respectivamente. A diferencia de los controles, las clonas EJ3 y EJ20 presentaron 4.66 y 1.77 colonias a los 7 días, aumentando el número de colonias a los 15 días de incubación a 18 y 5.4 colonias respectivamente. Sin embargo, al observar la capacidad de formación de colonias de las clonas con *ras* normal, EC10 no formó colonias hasta los 15 días, mientras que EC4 a los 7 días presentó 2.22 colonias y después a los 15 días de incubación sólo se contaron 0.77 colonias.

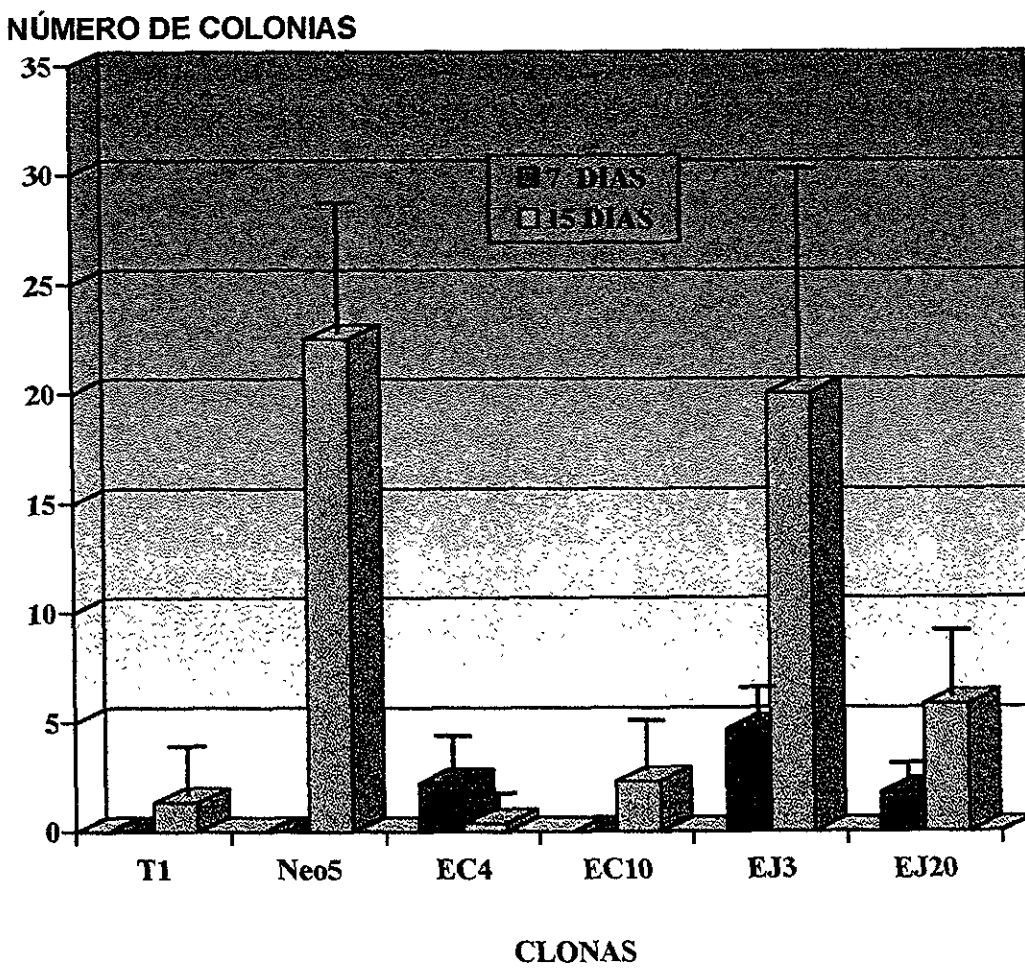


FIGURA 9. FORMACIÓN DE COLONIAS SOBRE AGAR SEMISÓLIDO DE LAS CLONAS 3T3 NIH TRANSFECTADAS Y PARENTAL. \*Los datos representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos diferentes y por triplicado.

Para corroborar la expresión del oncogen *ras* transfectado, la presencia de la proteína fue detectada por Western blot. Como se señala en la figura 10, la proteína mutada de p21<sup>ras</sup> se encontró en altos niveles en ambas clonas transfectadas con el oncogen, EJ3 y EJ20; no fue así, para las clonas con *ras* normal ni para el control. La proteína *ras* normal fue detectada en EC4 y EC10, aunque su cantidad fue baja.

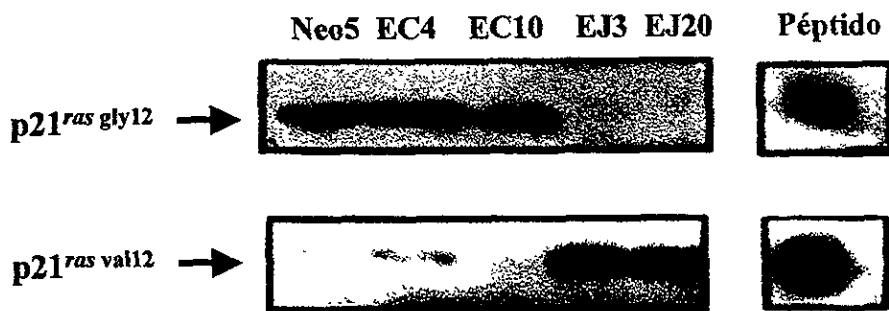


Figura 10. Detección de la proteína p21<sup>ras</sup> en las clonas transfectadas. A) Western blot para detectar p21<sup>gly12</sup> (*ras* normal), el último carril en corresponde al péptido que contiene glicina que es reconocido por el anticuerpo *ras*<sup>gly12</sup> y B) Western blot para detectar p21<sup>val12</sup> (*ras* mutado), el péptido contiene la valina que es reconocido por el anticuerpo pan-*ras*<sup>val12</sup> IgG2b; ambos péptidos se utilizaron como controles del ensayo.

---

Para determinar la invasividad *in vivo* de las clonas en ratones atímicos, éstos fueron inyectados subdérmicamente con las clonas transfectadas, monitoreando el desarrollo posterior de tumores primarios. Al comparar la formación de tumores, se pudo observar que los tumores producidos por las clonas EJ3 y EJ20 crecieron con mayor rapidez que las restantes clonas (figura 11). Ambas clonas desarrollaron tumores a los 6 días y formaron los tumores más grandes (de 1.02 a 9.18 cm<sup>3</sup> para EJ3 y de 5.25 y 7.34 cm<sup>3</sup> para EJ20). En contraste, la clona EC10 proliferó más lentamente a partir de la primera medición del tumor (figura 11), que se detectó a los 28 días y el tamaño máximo alcanzado fue de 3.53 cm<sup>3</sup>. En EC4 el período es aún más largo (86 días) y el tamaño fue de 0.06 cm<sup>3</sup>. También, se presentó crecimiento tumoral en un ratón inoculado con la clona control Neo5, detectándose éste a los 42 días con un tamaño máximo de 0.47 cm<sup>3</sup>. La prevalencia de los tumores fue diferente dependiendo de la clona, así EJ3 y EJ20 formaron tumores en 3/3 ratones inoculados, mientras que la clona EC10 formó un tumor en uno de los 2 ratones inoculados y las clonas EC4 y Neo5 en uno de los tres de los ratones inoculados.

**VOLUMEN TUMORAL (cm<sup>3</sup>)**

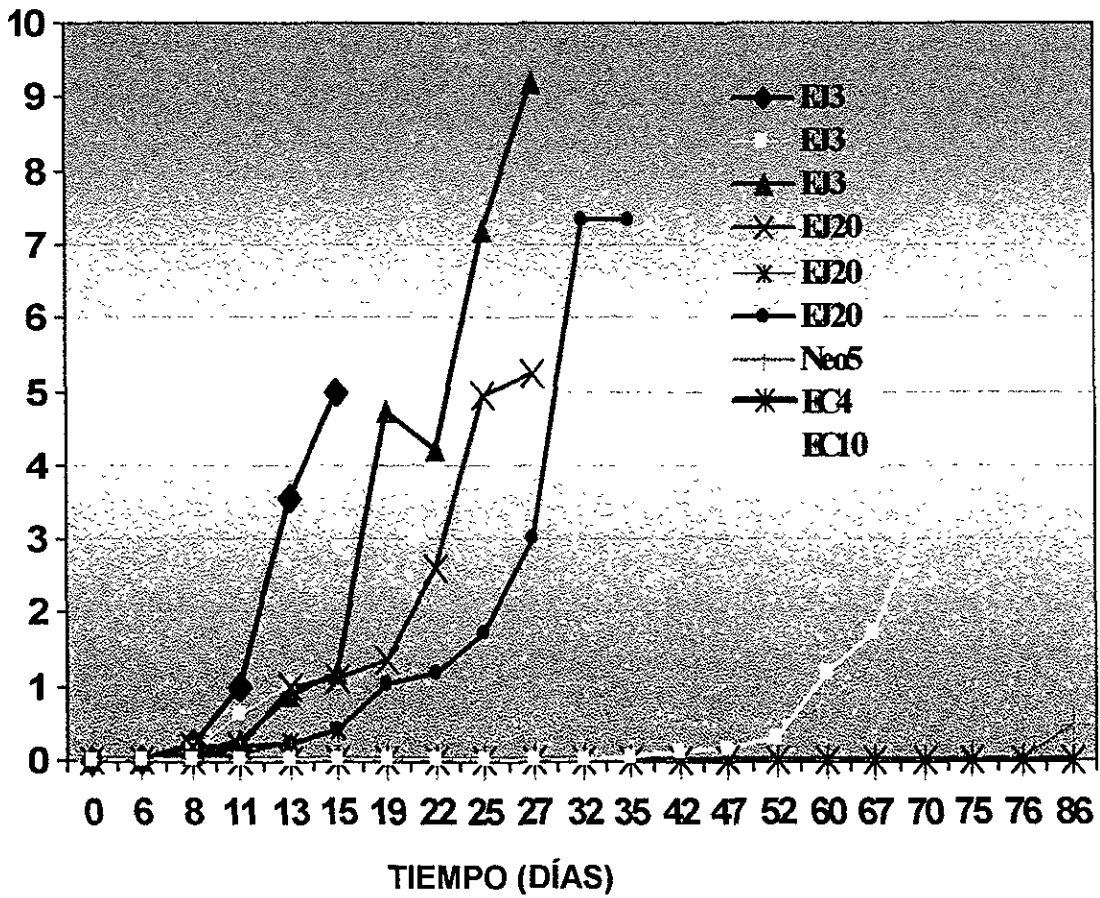


Figura 11. Desarrollo tumoral en los ratones Balb/c nu/nu inoculados subdérmicamente. Las clonas EJ3 y EJ20 formaron tumores en los 3 ratones inoculados y EC10; EC4 y Neo5 formaron 1 tumor, respectivamente.



---

Al evaluar histológicamente a los tumores se observó que todas las neoplasias fueron de tipo fibrosarcoma (figura 12). Las células tumorales de las líneas EJ20 y EC10 transfectadas con el oncogen y el protooncogen *ras*, respectivamente, infiltraron el músculo circundante y las características particulares de cada sección tumoral se enlistan en la tabla 2. Los tumores formados entre las clonas Neo5, EC4 y EC10 mostraron también un patrón morfológico muy similar. Estas clonas presentaban una morfología mixta, del tipo epiteloide y fibroblástica, con pocas mitosis y una heterogeneidad morfológica media, es decir, la relación núcleo-citoplasma fue similar, por lo que se consideran más diferenciadas. Al comparar las clonas EC con los tumores desarrollados por las clonas EJ3 y EJ20, se observó en éstas últimas, un patrón de células fusiformes y alargadas, poco redondeadas y con un mayor número de mitosis. El grado de pleomorfismo fue muy similar en todas las clonas y EJ3 que presentó una menor diferenciación (tabla 2). También se observó que los tumores producidos por las clonas EJ3 y EJ20 exhibieron una gran vascularización (figura 12).

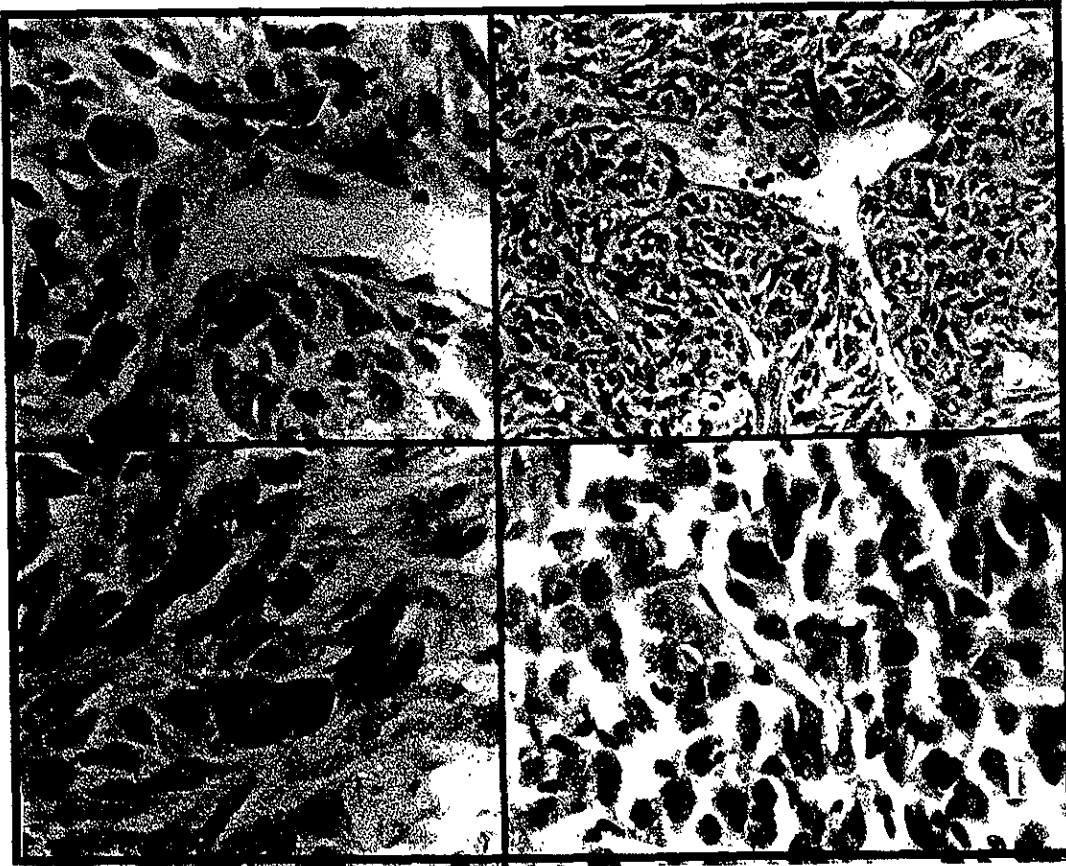


Figura 12. Histología de los tumores primarios producidos por las células 3T3 NIH transfectadas. A) Neo5, 40x; B) EC10, 10X; C) EJ3, 40x y D) EJ20, 40X

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE TUMORES INDUCIDOS EN RATONES ATÍMICOS Y CULTIVADOS SOBRE GELFOAM.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	CLONAS DE LOS EXPLANTES TUMORALES				
	Neo5	EC4	EC10	EJ3	EJ20
TIEMPO DE APARICIÓN (DÍAS)	42	86	28	6	8
NO. DE MITOSIS*	1	1	1	3	3
MORFOLOGÍA	MIXTA	MIXTA	MIXTA	FUSIFORME	FUSIFORME
PLEOMORFISMO*	2	2	1	2	3
NECROSIS*	0	0	1	2	3
NEOVASCULARIZACIÓN*	2	1	1	3	3
INFILTRADO INFLAMATORIO*	1	1	2	1	3
MATERIAL INTERCELULAR *	1	1	1	2	1

\*ESCALA:

- 0, nada;
- 1, poco;
- 2, medio;
- 3, alto.

Para determinar la secreción y la actividad de gelatinasa A y B al medio celular por las clonas 3T3 NIH transfectadas y los explantes cultivados sobre gelfoam, el medio condicionado fue analizado mediante geles PAGE-SDS en presencia de gelatina como sustrato. Previamente se empleó un gel desnaturalizante para comprobar que la concentración de proteína aplicada según la determinación con el método de Bardford fuese la misma para todas las muestras; en la figura 13 se observa un ejemplo representativo.

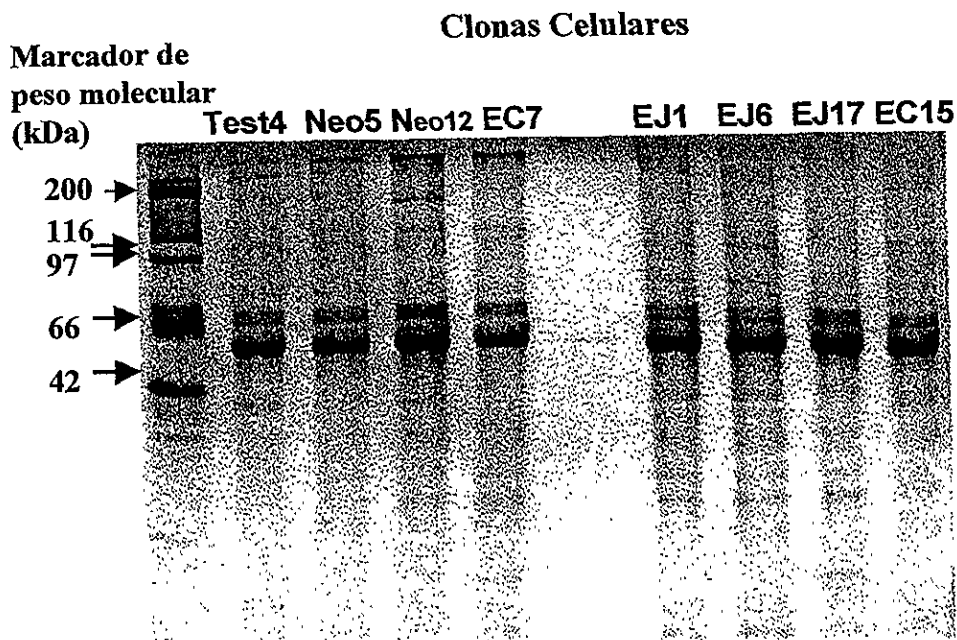


Figura 13. Gel PAGE-SDS desnaturalizante de los cultivos celulares. En el gel desnaturalizante se observan todas las proteínas presentes en el medio condicionado de los cultivos celulares. El peso molecular de los estándares está dado en kDa.

La naturaleza de las proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares y explantes (figura 14) se confirmó mediante un gel de poliacrilamida-bisacrilamida y EDTA. La actividad enzimática de las proteasas fue suprimida por la presencia de EDTA, lo que sugiere que estas proteínas son metaloproteasas.

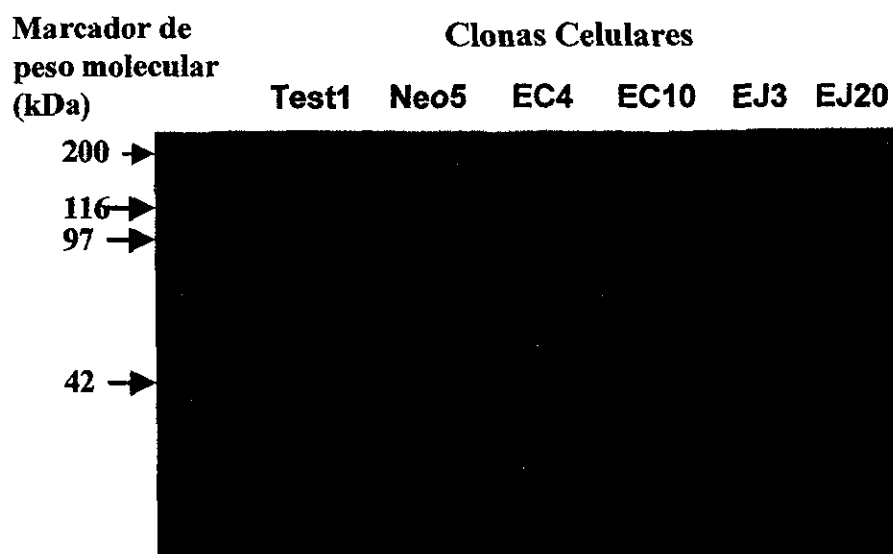


Figura 14. Zimograma del medio condicionado de las células 3T3 NIH parental y transformadas. El gel PAGE-gelatina fue tratado con EDTA y posteriormente fue incubado con TNC y teñido con azul de Coomassie.

---

En la figura 15 y 16 se muestra la actividad de dos gelatinasas: se observan unas bandas con *Mr* de 92 kDa y 84 kDa y otra de 71 y de 64 kDa las cuales corresponden, según lo reportado en la literatura a la gelatinasa B (MMP-9) y A (MMP-2), en sus formas activa e inactiva, respectivamente. Para poner en evidencia la forma inactiva de las proteasas en los geles de poliacrilamida, primero se separan las proteínas por su *Mr* y carga, posteriormente se incubaron en solución amortiguadora TNC con el propósito de separar el propéptido y observar las formas inactivas de las enzimas. La actividad de las gelatinasas se observó tanto en los cultivos celulares como en los explantes cultivados sobre gelfoam.

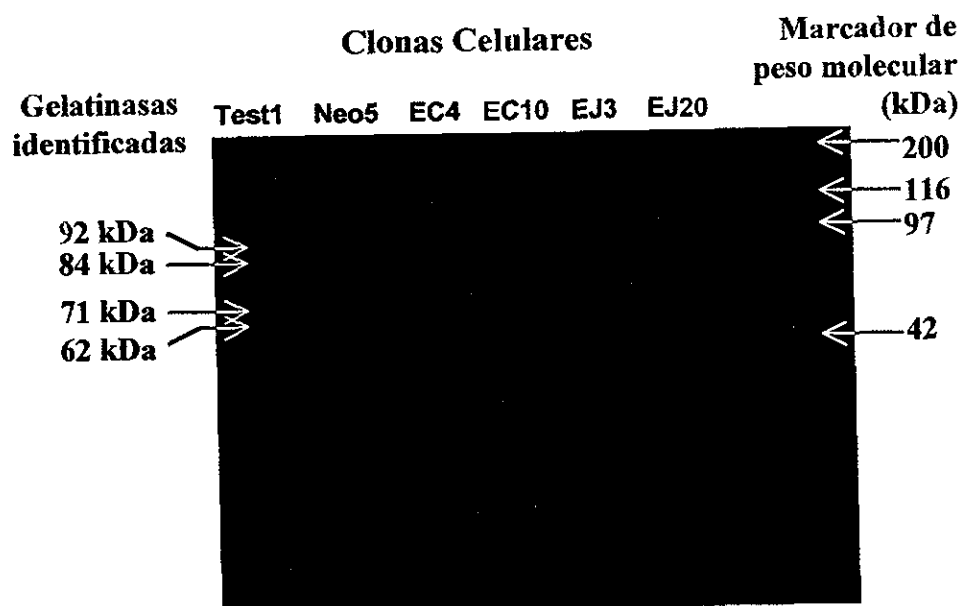


Figura 15. Expresión de las gelatinasas de los cultivos celulares. Los geles contienen acrilamida-bisacrilamida al 8% con gelatina al 0.1%. Para observar en el gel la capacidad de las enzimas gelatinolíticas por el sustrato, se incubó el gel con solución TNC (ver en material y métodos). Las flechas indican la gelatinasa A en su forma inactiva (71 kDa) y activa (64 kDa). En el gel también se observaron otras enzimas con capacidad para degradar la gelatina.

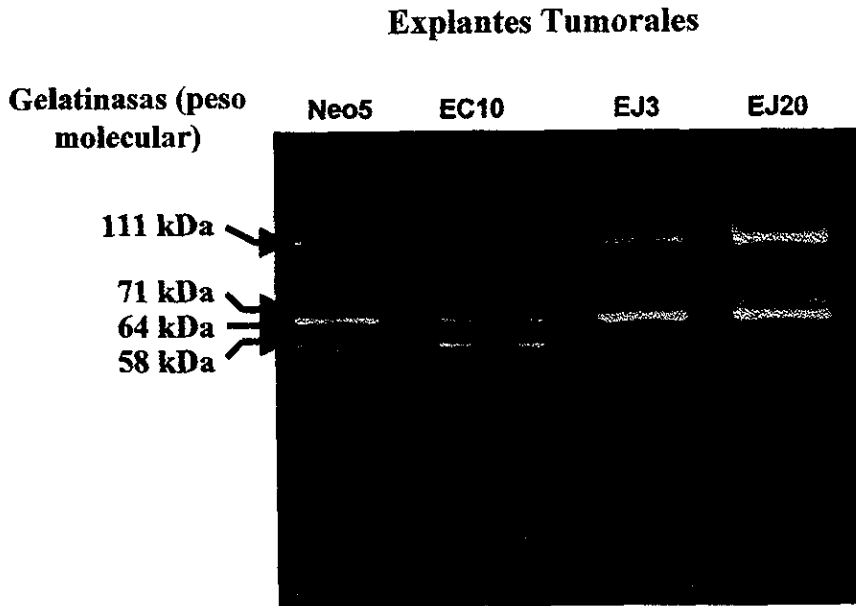


Figura 16. Expresión de las gelatinasas de los explantes tumorales. Los geles contienen acrilamida-bisacrilamida al 8 % con gelatina al 0.1 %. Para poner de manifiesto en el gel la capacidad enzimática de las gelatinasas, éste se incubó con TNC (ver material y métodos). Las flechas indican la gelatinasa A en su forma inactiva (71 kDa) y activa (64 kDa). En el gel también se observaron otras enzimas con capacidad para degradar la gelatina.



Todas las clonas EC y EJ presentaron ambas formas de la gelatinasa A de manera similar a la parental, presentando una banda de degradación de esta gelatinasa (figura 15). Mediante el análisis densitométrico de estas bandas se detectó una variación en la actividad en la región de 71 kDa de las clonas transfectadas (figura 17). Al comparar la secreción de esta gelatinasa en EJ3 y EJ20 de los cultivos celulares con lo observado en los explantes tumorales de los ratones (figuras 15 y 16), se encontró una clara tendencia a secretar más de esta enzima en los tumores *in situ* que en las células en cultivo, particularmente en EJ20 la actividad fue del doble. Sin embargo, al comparar la banda de la forma activa de 64 kDa, se observó una disminución en los tumores y en algunos casos, se observaron valores similares con respecto a las células en cultivo. En la clona EC10 se observó lo contrario, es decir, la secreción de esta enzima fue menor en el explante tumoral que en cultivo, tanto en la banda de 71 kDa, así como en su forma activa de 64 kDa. Si se analizan los resultados para el control Neo5 (figura 17) no se observaron cambios en la actividad de enzimas, sólo pudo observarse una baja secreción de la gelatinasa A en cultivo, en comparación al resto de las clonas en cultivo celular.

Con respecto a la gelatinasa B de  $M_r$  de 92 y 84 kDa (forma inactiva y activa de la enzima), en la figura 15 se observó una pequeña cantidad de la gelatinasa B en las muestras, excepto para Test1 y por densitometría no se observó la presencia de la forma inactiva de esta gelatinasa (figura 17, cultivos celulares). En EC4 no se detectó banda alguna de esta enzima (figura 17). Cabe mencionar que en los explantes tumorales la forma inactiva de esta gelatinasa se incrementó ligeramente en los formados en los ratones inoculados con EC10 y EJ20, en comparación con la secreción en cultivo y con el resto de las clonas (figura 17).

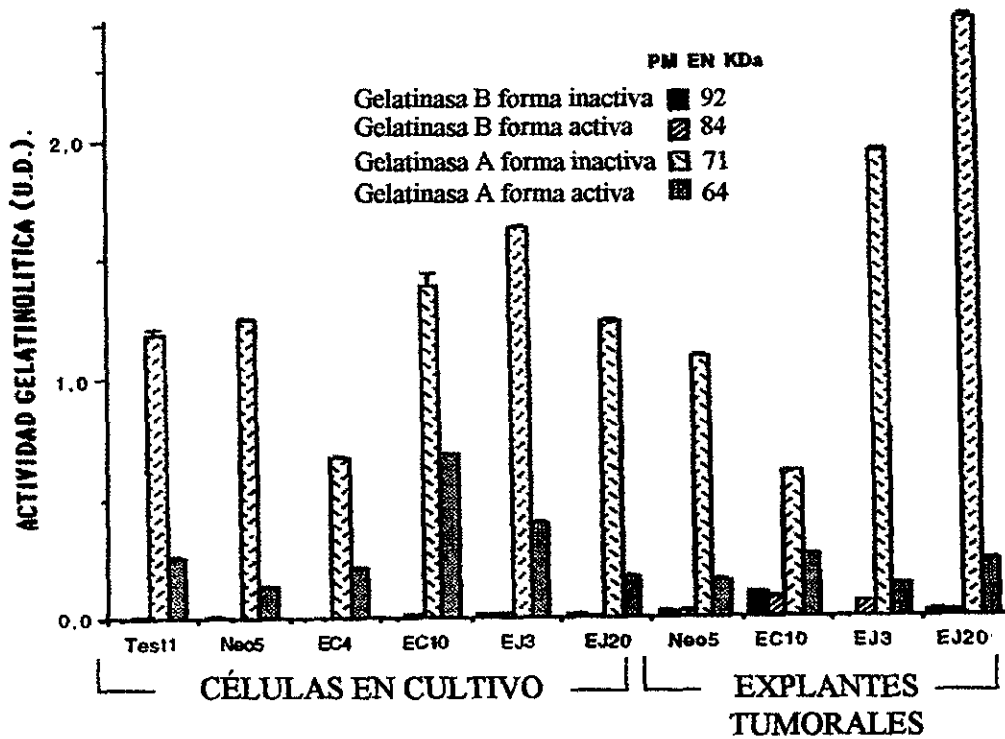


Figura 17. Actividad de gelatinasas B y A (formas inactivas y activas respectivamente) en los cultivos celulares y explantes tumorales. Los datos representan la media de la actividad de las gelatinasas B (92 y 84 kDa) y A (71 y 64 kDa) en U.D. (unidades densitométricas). Los valores se obtuvieron del análisis densitométrico de los geles de las figuras 15 y 16 de los cultivos celulares y explantes tumorales. Cabe mencionar que la clona EC4 no se obtuvo explante tumoral. Los datos representan la media de las actividades en U.D. de tres lecturas  $\pm$  D.E.

---

En los cultivos celulares empleados para realizar el gel de la figura 15, también se observaron gelatinasas con peso molecular de 98, 111 a 128, 140 a 180 y 200 kDa (carril 2 y 6), una gelatinasa de 77 kDa y tres de menor *Mr* de 58 kDa, de 42 kDa y de 32 kDa (carril 5 y 6). En los explantes sólo se detectaron las gelatinasas de 111 kDa y de 58 kDa (figura 16). En la figura 18 se muestra el análisis densitométrico de estas bandas de degradación de gelatina, las enzimas de 111 y de 58 kDa se encuentran en mayor cantidad en los explantes tumorales en comparación en cultivo celular, excepto con Neo5 que no presenta cambios en la actividad enzimática de la gelatinasa de 111 kDa. Sin embargo, en los tumores de Neo5 se expresa la banda de 58 kDa misma que no aparece en cultivo. El explante de EC10 expresa 2 veces más actividad de ambas enzimas en comparación con las clonas. En el caso de EJ3 el cambio es mínimo y para EJ20 los tumores presentaron 7.8 veces más expresión de la gelatinasa de 111 kDa en comparación a las clonas en cultivo. También, de los tumores de la clona EJ20, expresó la banda de 58 kDa que en las células en cultivo no se detectó.

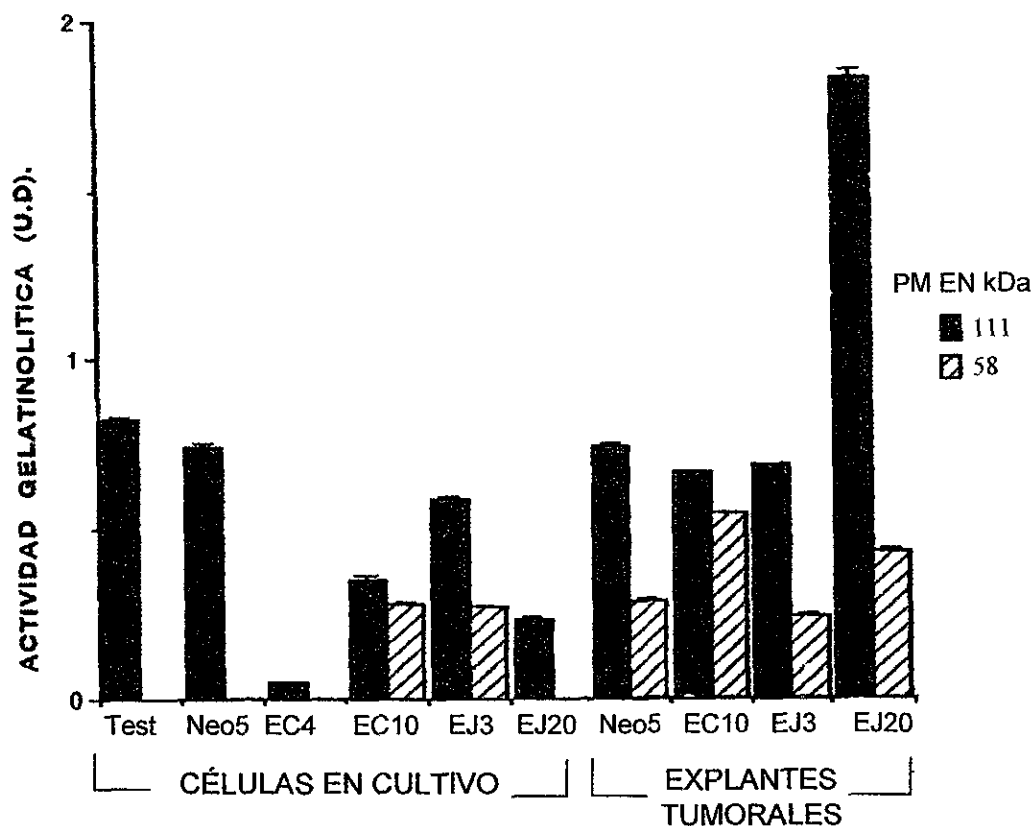


Figura 18. Actividad de las gelatinasas de 58 kDa y 111 kDa presentes tanto en los cultivos celulares como en explantes tumorales. Estos datos se obtuvieron mediante el análisis densitométrico de los gels presentados en las figuras 15 y 16 correspondientes a los cultivos celulares y explantes tumorales. Los datos representan la media de las actividades en U.D. de tres lecturas  $\pm$  D.E.

Para explorar si las bandas de menor peso molecular descritas en los geles de gelatina de los cultivos celulares (figura 15), representaba a una enzima del tipo de la estromelisin-1 (la cual presenta una *Mr* de 57-60 kDa, su forma inactiva y de 42-48 kDa en su forma activa), se prepararon geles de caseína con estos mismos sobrenadantes. En la figura 19 se detectaron bandas de actividad de 42 kDa, 58 kDa y 92 kDa. La gelatinasa de 111 kDa no resultó evidente en los geles con caseína.

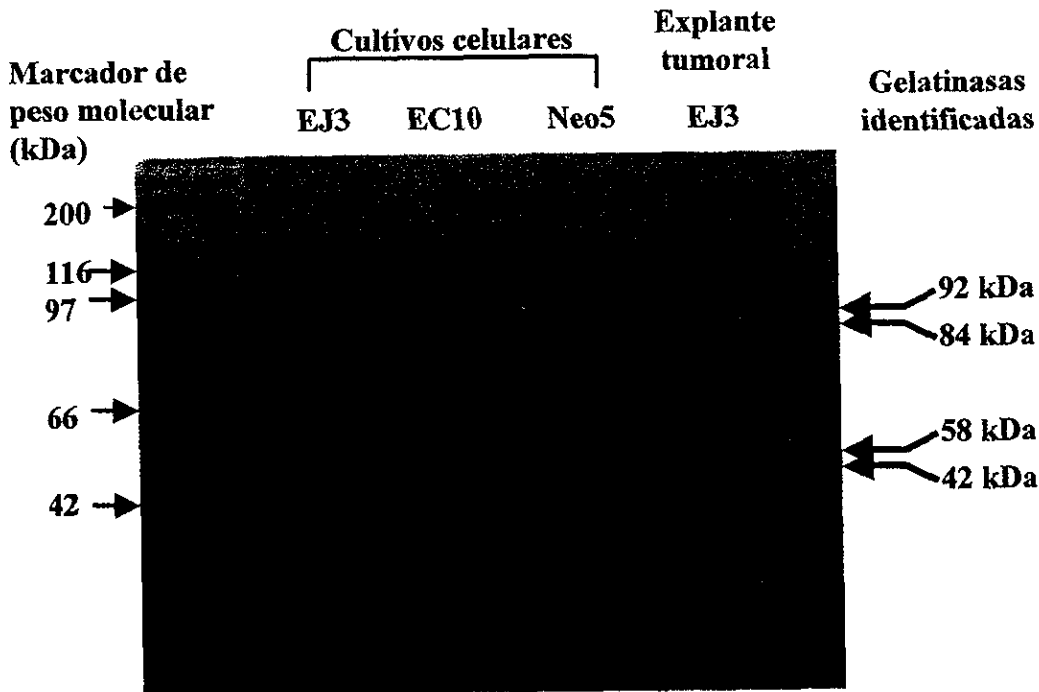


Figura 19. Expresión de caseínasas detectadas en los geles page-caseína realizados con el medio condicionado obtenidos de los cultivos celulares y explantes tumorales. Se corrieron en un gel PAGE-caseína 0.1 % los extractos de las clonas de Neo5, EC10 y EJ3 de los cultivos celulares que presentaron las bandas de 58 y de 42 kDa (carriles 2, 3 y 4) y de los explantes tumorales se corrió el extracto de la clona de EJ3 (carril 5).

Las formas inactivas de las gelatinasas fueron activadas por APMA. En la figura 20 se exhiben ejemplos representativos de los cultivos y explantes tumorales. En algunos casos se pudo observar la no aparición de la forma inactiva y la aparición de la forma activa (ver EJ con (+) y sin (-) APMA en la banda de 71-64 kDa). En otros casos como EJ20, sólo se observaron cambios en la banda de 92-84 kDa y en EC10 se observó el mismo patrón para las gelatinasas A y B en ambos tipos de sobrenadantes pero se presentaron diferencias en las bandas de 58-42 kDa.

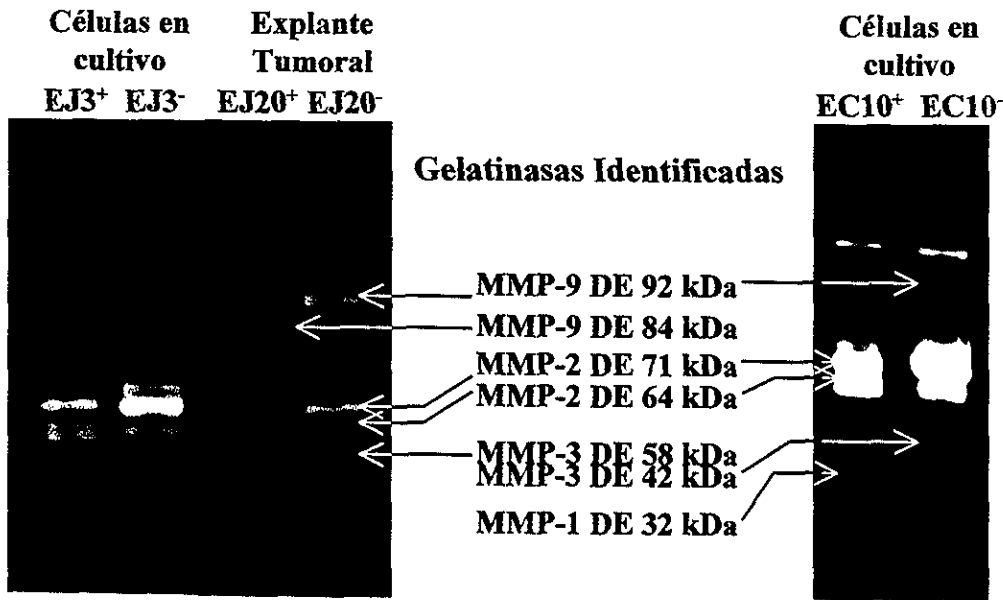


Figura 20. Activación con APMA de las formas inactivas de las gelatinasas secretadas al medio por las clonas en cultivos celulares y explantes tumorales. Los sobrenadantes de las clonas fueron incubadas en presencia (+) y en ausencia (-) de APMA y posteriormente se corrieron en un gel PAGE-gelatina 0.1%.

Finalmente, se comparó la actividad total de las gelatinasas en ambos grupos, cultivos celulares y explantes. En ambos grupos evaluados se encontraron diferencias significativas, evaluadas mediante la prueba de ANOVA de Scheffé. En la tabla 3 se ilustra el grupo de los cultivos y las diferencias en la actividad entre EC4, EC10, EJ3 y EJ20 ( $p < 0.05$ ) y en la tabla 4 se muestra la actividad total de los explantes. Las clonas Neo5, EJ3 y EJ20 presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la actividad total ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 3. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LA ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA CUANTIFICADA EN LAS CLONAS TRANSFECTADAS Y CRECIDAS EN UN CULTIVO CELULAR.**

clonas	Neo5	EC4	EC10	EJ3	EJ20
Neo5	-	-	-	-	-
EC4	-	-	*	*	
EC10	**	**	-	-	**
EJ3	**	**	*	-	*
EJ20	*	*	*	*	-

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

- NO ES COMPARABLE.

**TABLA 4. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LA ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA CUANTIFICADA EN LAS CLONAS TRANSFECTADAS RECUPERADAS DE EXPLANTES TUMORES.**

Clonas	Neo5	EC10	EJ3	EJ20
Neo5	-	-	-	-
EC10	-	-	-	-
EJ3	*	**	-	-
EJ20	**	**	**	-

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

- NO ES COMPARABLE.

---

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la transformación de células 3T3 NIH transfectadas con el protooncogen y el oncogen c-Ha-*ras*. Se ha demostrado ampliamente que el oncogen T24-H-*ras* posee la habilidad de transformar fibroblastos de ratón (Muschel *et al.*, 1985) y otras células como las de embrión de rata (Álvarez *et al.*, 1990; Sreenath *et al.*, 1992). Entre las alteraciones en las propiedades de una célula transformada por el oncogen *ras* se encuentran los cambios en la morfología (Pozzatti *et al.*, 1986), la estimulación en el crecimiento (Takahashi *et al.*, 1986), la pérdida en la inhibición del crecimiento por contacto, la independencia de anclaje a una superficie (Cooper *et al.*, 1980; Spandidos y Wilkie, 1984; Cooper, 1995) y el incremento en la actividad colagenolítica (Cooper *et al.*, 1980; Liotta, 1986; Spinucci *et al.*, 1988). Para evaluar dichos cambios *in vitro* se emplearon ensayos de proliferación celular, de independencia de anclaje y de secreción de gelatinasas, ya que los ensayos realizados en cultivos celulares brindan información sobre el comportamiento de poblaciones celulares bajo condiciones controladas y permiten analizar el papel de los diferentes factores que participan en el proceso de tumorigénesis.

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS CON *RAS*.

Al evaluar la proliferación en las diferentes clonas transfectadas con el fin de determinar las posibles diferencias entre la transfección del gen *ras* normal o mutado, no fue posible observar una diferencia estadísticamente significativa (figura 7). Cabe señalar



---

que el método empleado para la cuantificación de la proliferación celular está basado en el uso de una sal de tetrazolium (MTT). Dicho bioensayo colorimétrico ha sido extensamente utilizado para determinar la proliferación y la viabilidad en una amplia variedad de experimentos en líneas celulares (Mosmann, 1983), debido a su facilidad de aplicación, su bajo costo y su baja toxicidad (Cedillo-Rivera *et al.*, 1992). Algunos autores como Quincoces (1995) y Maher, *et al.* (1995) han reportado incrementos en la proliferación después de la transfección con el oncogen, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de proliferación entre cada una de las clonas al 25%, 50% y 75% de confluencia celular. Al cuantificar la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano no se obtuvieron diferencias significativas en las tasas de mortalidad. Lo cual sugiere que la mortalidad no fue un efecto que influyera sobre la proliferación celular en cada una de las clonas ensayadas por el método de MTT.

En nuestro estudio pudieron observarse cambios morfológicos muy marcados en las clonas celulares transfectadas con el oncogen *ras*, tales como la alteración de la relación núcleo-citoplasma y la formación de focos de crecimiento en las cajas de cultivo, lo cual indica una pérdida de la inhibición por contacto (figura 6d). Las células transfectadas con el protooncogen ( $p21^{ras}$  normal) también presentaron cambios morfológicos y la formación de focos, estos focos se observaron en los cultivos con el 100 % de confluencia celular (figura 6c), indicando que hay pérdida de la inhibición por contacto y se requiere que algunos de los sitios generen la inhibición. Otra característica

---

que se evaluó como consecuencia de la transformación celular fue la capacidad de independencia a la adhesión a una superficie. Diversos autores han reportado una relación directa entre la transformación y la independencia que adquieren las células a la adhesión a una superficie, sin embargo, en el estudio no se observó una diferencia clara en la adquisición de independencia al anclaje, con respecto al control Neo5 (figura 9).

En cuanto a la expresión de la proteína p21 *ras* generada por el oncogen transfectado, se puede observar una banda que representa a la oncoproteína de *ras* en EJ20 y EJ3 (figura 10b); aunque también se observa una pequeña cantidad en EC4 y Neo5. Así mismo al determinar la expresión de la proteína *ras* normal, se observó un incremento significativo de dicha proteína en el control Neo5 y en las clonas EC4, EC10 (figura 10a). Por lo tanto, con este experimento observamos que todas las clonas si expresan el gen transfectado correspondiente y los cambios celulares detectados son atribuidos a la expresión del gen y el oncogen.

## **2. SECRECIÓN DE METALOPROTEASAS EN LOS CULTIVOS CELULARES.**

En algunos reportes se ha evidenciado la participación del oncogen *ras* en la activación de señales que modulan la adhesión, la morfología, la secreción de proteasas y la movilidad celular, así como en los procesos involucrados en la tumorigenicidad e invasividad (Qui *et al.*, 1995; Collard *et al.*, 1996). En este trabajo se correlacionará la transformación celular realizada en células 3T3 NIH y la actividad proteolítica de dos metaloenzimas (MMP-2 y MMP-9) involucradas en la tumorigenesis. Aun que si bien ya se conoce y se ha estudiado ampliamente el papel de este oncogen en la transformación

celular y la tumorigenesis, nosotros correlacionamos la actividad proteolítica de estas dos metaloproteasas de matriz en ambos ensayos (*in vivo* e *in vitro*).

Para determinar la expresión y actividad de las proteasas con el proceso de invasividad *in vitro*, se empleó el medio condicionado de todas las clonas y las enzimas se identificaron por zimografía. Este medio se utilizó libre de suero y sin rojo fenol, debido a que dichos componentes actúan como esteroides, lo que disminuye la secreción de algunas de las metaloproteasas (Berthois *et al.*, 1986). Las enzimas gelatinolíticas se observaron como bandas de degradación en geles con gelatina. Por su peso molecular y su capacidad de degradar gelatina se determinó que las enzimas encontradas correspondían a la gelatinasa A (MMP-2), de 64 kDa y 71 kDa y la gelatinasa B (MMP-9) de 84 kDa y 92 kDa.

También se observaron gelatinasas con mayor peso molecular, como las bandas de 77 kDa, 98 kDa, 111 a 128 kDa, 140 a 180 kDa y algunas de menor masa molecular como las de 58 a 42 kDa y 32 kDa. El que éstas sean inhibidas por EDTA indica que las enzimas son metaloproteasas (figura 14). El tratamiento con APMA señala que las proteínas observadas con *M<sub>r</sub>* de 64 kDa y 84 kDa correspondían a las formas activas de la gelatinasa A y B respectivamente (figura 20).

## 2.1 ACTIVIDAD DE LA GELATINASAS A Y B.

Existe evidencia experimental que sugiere una correlación positiva entre un incremento en los niveles de expresión del oncogen *ras* y la actividad de las gelatinasas A y B en fibroblastos 3T3 NIH (Spinucci *et al.*, 1988; Tuck *et al.*, 1991; Chambers y Tuck,

---

1993). En los cultivos de todas las clonas con los que se trabajó se encontraron incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) en la secreción y la actividad de la gelatinasa A, principalmente en su forma inactiva (figuras 15 y 17, Tabla 3). Las diferencias encontradas en la secreción y en las actividades gelatinolíticas asociadas a la presencia del oncogen en EJ20 y EJ3; así como en el protooncogen *ras* en EC4 y EC10 de los cultivos celulares, posiblemente se deban a que se tiene una población heterogénea en ambos grupos de clonas.

## 2.2 PRESENCIA DE OTRAS MMPs EN LOS CULTIVOS CELULARES.

La actividad de otras gelatinasas fue evidenciada en los cultivos celulares de las diferentes clonas estudiadas. Al respecto, algunos autores como Bernhard, *et al.* (1990) y Tamakoshi, *et al.* (1994), reportaron MMPs de 130 kDa y 200 kDa sin encontrar una relación clara entre su naturaleza y su significado clínico, pero sí se sabe que éstas corresponden a estados oligoméricos tanto de la gelatinasa A (forma inactiva y activa) como a la gelatina B, también a la forma inactiva y activa. Estas formas pueden disociarse a monómeros durante la separación electroferética o mediante agentes disociantes como el APMA. Los resultados obtenidos de intensificación de las bandas correspondientes a las gelatinasas de 71 kDa, 64 kDa y 92 kDa después de la activación con APMA, apoyan la hipótesis de que estas metaloenzimas de alto peso molecular correspondan a formas oligoméricas de las gelatinasas A y B (figura 20).

---

Respecto a una gelatinasa de 77 kDa, cabe mencionar que el tratamiento con agentes disociantes lleva a la pérdida de un fragmento de 10 kDa. Autores como Modoromi, *et al.* (1992) y Okada, *et al.* (1992) han reportado varias formas activas de menor peso molecular de la gelatinasa de 92 kDa, lo que podría explicar la presencia de una banda de *Mr* de 77 kDa en los geles de esta gelatinasa (figura 15 y 20), sin embargo se podría realizar un Wester Blot u otros estudios para confirmar lo anterior.

Con relación a gelatinasas de menor masa molecular, en geles de gelatina y caseína, se revelaron tres bandas: un par de 58 a 42 kDa y una de 32 kDa (ver figuras 11 y 14). Estas bandas corresponden a la estromelisin-1 y colagenasa intersticial respectivamente. Particularmente la banda de 58 kDa que corresponde a la estromelisin-1, también presenta capacidad de degradar la caseína (figura 19), donde la caseína es empleada como sustrato de esta enzima. También estas enzimas se inhibieron frente al EDTA, por lo que concluimos que corresponden a MMPs.

### 3. TUMORIGENICIDAD INDUCIDA POR RAS.

La inoculación subcutánea de las clonas generaron tumores con diferencias significativas en el tiempo de desarrollo y volumen tumoral (tabla 2 y figura 12). Estos resultados indican una correlación con la expresión del oncogen *ras* para inducir tumores en ratones atímicos que con las clonas transfectadas con *ras* normal (ver figura 9). Ello concuerda con lo reportado en fibroblastos 3T3 NIH por Liotta *et al.* (1991), Tuck *et al.* (1991), Chambers y Tuck (1993), entre otros. Así mismo, la expresión del gen *ras*

---

confiere una morfología específica en los tumores, ya que en los tumores generados forman sarcomas (tabla 2 y figura 11).

Cabe mencionar que el control de la transfección, Neo5, también formó colonias sobre agar semisólido y generó tumor. Al respecto suponemos que en por si solo el proceso de transfección es capaz de promover la transformación celular, al respecto Greig, *et al.* (1985) y Shih, *et al.* (1981) observaron desarrollo tumoral en ratones atímicos transfectados sin algún oncogen y concluyeron que la transfección genera una inestabilidad genética en el recipiente celular.

#### **4. TUMORIGENICIDAD Y ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.**

Con la finalidad de observar la contribución de las MMPs en la tumorigenicidad e invasividad en los tumores producidos por las clonas transfectadas, se obtuvieron los sobrenadantes de los tumores cultivados sobre gelfoam. En estudios previos realizados por Marbaix, *et al.* (1992) y Arenas (1997), se demostró que la secreción de proteasas al medio se presenta al emplear un soporte tridimensional de gelatina (gelfoam) en explantes de tejido o tumores. Este soporte ofrece la ventaja de mantener íntegros los elementos tisulares del explante, permitiendo la secreción de las proteasas al medio y no interfiriendo con la viabilidad celular.

De los explantes tumorales la actividad total de las gelatinasas, resultó ser mayor significativamente en la clona EJ20 con respecto al resto de los explantes tumorales; sin

---

embargo, en los cultivos celulares esta misma actividad fue mayor en EC10 y EJ3 (figura 22 y tabla 3,  $p < 0.05$ ).

En cuanto a las gelatinasas secretadas en los explantes, la gelatinasa A inactiva (71 kDa) se incrementó en EJ3 y EJ20 (figura 16 y 17), lo que podría sugerir un incremento en la expresión y activación *in vivo*. Además, la gelatinasa A se ha descrito como marcadora tumoral de diversos modelos murinos de cáncer (Powell *et al.*, 1993), en líneas celulares transfectadas con oncogenes (Tuck *et al.*, 1991; Gringas *et al.*, 1992) y en líneas tumorales humanas (Brown *et al.*, 1990; (b) Ray y Stetler-Stevenson, 1994; Powell y Matrisian, 1996). Particularmente, nuestras observaciones sugieren que la gelatinasa A pudiera tener un papel central en la tumorigenicidad, ya que es la que se encuentra en mayor proporción en los tumores desarrollados por las células EC10, EJ3 y EJ20 que generaron tumores más agresivos. Además se encontró que en estas mismas clonas el incremento de secreción de metaloproteasas es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ , tabla 4).

La gelatinasa B se incrementó ligeramente en todos los explantes tumorales. Esta enzima se ha reportado incrementada en neoplasias humanas y en células mononucleares como macrófagos y leucocitos (Gilles *et al.*, 1994), encontrándose estas últimas células como parte del infiltrado inflamatorio de los explantes tumorales, lo que podría sugerir una contribución por parte de estas células infiltradas de gelatinasa B al medio (tabla 2). Sin embargo, su aportación se considera que no es significativa en la tumorogénesis, para este trabajo en particular.

---

Cabe destacar que también en todos los explantes tumorales, aparte de las gelatinasas de 71 kDa y 92 kDa, se observaron tres gelatinasas de 58 kDa, 77 kDa y de 111 kDa. En general, los niveles en la actividad de la gelatinasa de 111 kDa, fueron similares en todas las clonas, excepto para EJ20, que se incrementó 7.8 veces más con respecto a las otras clonas de los explantes (figura 18). La activación con APMA sobre esta gelatinasa podría sugerir una forma oligomérica de la gelatinasa A y una posible participación en la tumorigenicidad en estas células.

Respecto a la metaloproteasa de 58 y 42 kDa, reportada como MMP-3 (figura 19) y de investigaciones hechas por Muller *et al.* (1991) demuestran incrementos significativos en la expresión y secreción de esta metaloproteasa en el estroma tumoral circundante a las células neoplásicas invasivas. La expresión de la estromelina-1 y colagenasa intersticial en el estroma podría estar modulada por diversos factores difusibles presentes en el microambiente celular, formado por la interacción tumor-huésped (Nakajima *et al.*, 1976; Matrisian y Bowden, 1990; Fodstad y Kjønniksen, 1994). Lo que podría sugerir que existe una selección de clonas y de proteasas necesarias en la tumorigenicidad e invasividad *in vivo* (ver figura 18, clonas EC10, EJ3, EJ20 de los explantes tumorales).

Se ha demostrado que las MMPs no solamente participan en la degradación de las moléculas estructurales de la MB sino que también parecen participar en las interacciones de la célula con el microambiente de la MEC. Esto es, la MMP-2 y MMP-9 parecen estar involucradas en la angiogénesis (Bernstein y Liotta, 1994; Folkman, 1994).



---

Basándonos en esta información, se correlacionó la actividad de dichas MMPs con la neovascularización, encontrándose que los incrementos de la MMP-2 correlacionan de manera directa con los incrementos en la formación de nuevos vasos (tabla 2). Resultados similares fueron obtenidos por Fridman, *et al.* (1992) y Moscatelli, *et al.* (1988).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la expresión del oncogen *ras* incrementa la expresión de la actividad de la gelatinas A *in vivo* y la capacidad tumorigénica en la células 3T3 NIH, comparadas con aquellas clonas transfectadas con *ras* normal, bajo las condiciones antes descritas. Cabe mencionar que lo que se está evaluando con este modelo, es el resultado final de una serie de interacciones moleculares involucradas en el proceso de tumorigenicidad e invasividad en el ratón.

Todas estas complejas interrelaciones, en las que está involucrado *ras*, gen que participa en la señalización transcripcional, es una muestra de diversas vías de la célula para llevar a cabo su actividad biológica normal y cuando sufren alteraciones, dan lugar a procesos tumorigénicos.

## CONCLUSIONES

- Las clonas transformadas que expresan incrementos de p21<sup>rasval12</sup> presentan cambios morfológicos y una mayor capacidad tumorigénica.
- Existe una mayor secreción de MMP-2 en los explantes celulares de las clonas transfectadas con *ras* mutado que en los cultivos celulares.
- En los cultivos celulares se observaron MMP que no se expresaron en los explantes tumorales, lo cual sugiere que no todas las enzimas están involucradas en la tumorigénesis.
- La tumorigenicidad se correlaciona con la actividad gelatinolítica, ya que las clonas que secretan menos enzimas, generan tumores menos agresivos.
- Existen factores que activan *in vivo* la expresión y secreción de la estromelisina-1 en los explantes tumorales.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monis A., Hursey, M.L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. y Boyd, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* (1988) 48: 589.
- Álvarez, A.O., Carmichael, F. D. y DeClerck, Y. A. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cell by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Natl. Cancer Inst.* (1990) 82: 589.
- Arenas Huertero Francisco, Tesis de Maestria: Secreción de metaloproteasas por explantes de cáncer cérvico-uterino. UNAM, Facultad de Ciencias. 1996.
- Ballin, M., Gomez, D. E., Sinha, C. C. y Thorgeirsson, U. P. *ras* oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase, strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* (1988) 154: 832.
- Ballin, M., Mackay, A. R., Hartzler, J. L., Nason, A., Pelina, M. D. y Thorgeirsson, U. P. Ras levels and metalloproteinase activity in normal versus neoplastic rat mammary tissue. *Clin. Exp. Metastasis* (1991) 9: 179.
- Berhard , E. J., Muschel, R. J. y Hughes, E. N. Mr 92,000 gelatinase correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res.* (1990) 50: 3872.
- Bernstein, R. L. y Liotta, L. A. Molecular mediators of interaction with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr. Op. Oncol.* (1994) 6: 106.
- Berthois, Y. y Katzenellenbogen, D. D. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen responsive cells culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83: 496.
- Birkedal-Hasen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Op. Cell Biol.* (1995) 7: 728.

- 
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) 72: 728.
  - Bradley, M. O., Kraynak, A. R., Storer, R. D. y Gibbs, J. B. Experimental metastasis in nude mice of NIH 3T3 cells containing various *ras* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 85: 5277.
  - Brown, P. D., Levy, A. T., Margulies, I. M. K., Liotta, L. A. y Stetler-Stevenson, W. G. Independent expression and cellular processing of *Mr 72,000* type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* (1990) 50: 6184.
  - Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A y Muños, N. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arc. Medical Res.* (1992) 23: 59.
  - Chambers, A. F. y Matrisian L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* (1997) 89: 1260.
  - Chambers, A. F. y Tuck, A. B. Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* (1993) 4: 95.
  - Chan, H. E., Furth, E. M., Scolnick, M. E. y Douglas, L. R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* (1992) 297: 479.
  - Chen, J. e Iyengar, R. Interactions between the Gs/protein kinase A and the Ras/MAP-kinase signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* (1995) 231: 129.
  - Collard, J. G., Habets, G. G. M., Michiels, F., Stam, J., Van der Kammen, R.A. y Van, L.F. Role of Tiam 1 in Ras-mediated signal transduction pathways. *Curr. Op. Microbiol. Imm.* (1996) 213: 418.
  - Cooper, G. M., Okenquist, S. y Silverman. Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells. *Nature* (1980) 284: 418.

- 
- Cooper, G. M. (1995). *Oncogenes*. 2<sup>nd</sup> Ed Jones and Bartlett Publisher. England 5-15.
  - Fodstad, Ø. y Kjønniksen, I. Microenvironment revisited: time for reappraisal of some prevailing concepts of cancer metastasis. *J. Cell Biochem.* (1994) 56: 23.
  - Folkman, J. Angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* (1994) 12: 441.
  - Fridman, R., Fuerst, T. R., Bird, R. E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Kraus, S., Komarek, D., Liotta, L. A., Berman, M. L. y Stetler-Stevenson, W. G. Domain structure of human 72 kDa gelatinase/type IV collagenase: characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitors of metalloproteinases-2 (TIMP-2) binding regions. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 15398.
  - Geiser, A. G., Der, Ch. J., Marshall, Ch. J. y Stanbridge, E. J. Suppression of tumorigenicity with continued expression of the c-Ha-ras oncogene in EJ bladder carcinoma-human fibroblast hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83: 5209.
  - Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Birembaut, P. y Foidart, J. M. Epithelial-to-mesenchymal transition in HPV-33-transfected cervical keratinocytes is associated with increased invasiveness and expression of gelatinase A. *Int. J. Cancer* (1994) 59: 661.
  - Graff, J. R., Boghaert, E. R., De Benedetti, A., Tudor, D. L., Zimmer, C. C., Chan, S. K. y Zimmer, S. G. Reduction of translation initiation factor 4E decrease the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts. *Int. J. Cancer* (1995) 60: 255.
  - Greig, R. G., Koestler, T. P., Trainer, D. L. y Corwin, F. Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and *ras*-transfected NIH/3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985) 82: 3698.
  - Gringas, D. C., Jarolin, L., Finch, J. y Bowden, J. A. Transient alterations in the expression of protease and extracellular matrix genes during metastatic lung

- colonization by H-*ras*-transformed 10T1/2 fibroblast. *Cancer Res.* (1992) 52: 4061.
- Hills, S., Wilson, S. y Chambers, F. Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-*ras*-transformed NIH 3T3 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* (1988) 80: 484.
  - Hofmann, M., Rudy, W., Günthert, V., Zimmer, S., Zawadzki, V., Zöller, M., Lichtner, R. B. Herrlich, P. y Ponta, H. A link between *ras* and metastatic behavior of tumor cells: *ras* induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis specific variants of CD44 in CREB cells. *Cancer Res.* (1993) 53: 1516.
  - Johnson, L. L., Dyer, R. y Hupe, J. D. Matrix metalloproteinases. *Curr. Op. Struct. Biol.* (1995) 2: 466.
  - Kjønniksen, I., Storeng, R., Pihl, A., McLemore, T. y Fodstad, Ø. A human tumor lung metastasis model in athimic nude rats. *Cancer Res.* (1989) 49: 5148.
  - Levine, A. J. (1992). Tumour Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer. Vol 12 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA 10-20, 35-58 pp.
  - Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. y Shafie, S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* (1980) 284: 67.
  - Liotta, L. A., Rao, C. N. y Barsky, S. H. Tumor invasion and extracellular matrix. *Lab. Invest.* (1983) 49: 636.
  - Liotta, L. A., Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* (1986) 46: 1.
  - Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. y Steeg, P. S. Cancer invasion and metastasis: Positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest.* (1991) 9: 543.
  - Liotta, L. A. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific Amer.* (1992) 266: 34.

- 
- Liotta, L. A. y Stetler-Stevenson, W. G. (1993). Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. Cap 7 en De Vita, W. G. Cancer: Principles & Practice of Oncology 4<sup>th</sup> De J. B. Lippincott Co., Philadelphia; 35-112 pp.
  - Lowy, D. R. y Willumsen, B. M. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* (1993) 62: 851.
  - Lu, X., Park, S., Thompson, T. y Lane, D. *ras* induce hipeplasic with mutation of p53, but activated *ras* and *myc* together can induce carcinoma without p53 mutation. *Cell* (1992) 70: 153.
  - Maher, J., Baker, D. A., Manning, M., Dibb, N. J. y Roberts, I. A. Evidence for cell specific differences in transformation by N-, H-, and K-*ras*. *Oncogene* (1995) 1: 1639.
  - Marbaix, E., Donnez, J., Courtoy, P. J. y Eeckhout, Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 11789.
  - Marshall, Ch. J. Ras effectors. *Current Op. Cell Biol.* (1996) 8: 197.
  - Maruta, H. y Burgess, A. W. Regulation of the Ras signalling network. *BioEssay* (1994) 16: 489.
  - Matrisian, L. M. y Bowden, G. T. Stromelysin/trasin and tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* (1990) 1: 107.
  - a) Matrisian, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases-degrading. *BioEssay* (1992) 14: 455.
  - b) Matrisian, L. M., Ganser, G. L., Kerr, L. D., Pelton, R. W. y Wood, L. D. Negative regulation of gene expression by TGF- $\beta$ . *Mol. Rep. Develop.* (1992) 32: 11.
  - Mauviel, A. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell Biochem.* (1993); 53: 288.
  - Mignatti, P. y Rifkin, D. B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* (1992) 73: 161.

- 
- Modoromi, T., Ogata, Y., Sasaguri, Y., Morimatsu, M. y Nagase, H. Purification and characterization of matrix metalloproteinase-9 from U937 monocytic leukemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem. J.* (1992) 285: 603.
  - Moscatelli, D. y Rifkin, D. B. Membrane and matrix localization of proteinases: A common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Acta* (1988) 948: 67.
  - Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* (1983) 65: 55.
  - Muller, D., Breathnach, R., Engelmann, A., Millon, R., Bronner, G., Flesch, H., Dumont, P., Eber, M. y Abecassis, J. Expression of collagenase related metalloproteinase genes in human lung or neck tumours. *Int. J. Cancer* (1991) 48: 550.
  - Murphy, G., Willenbrock, F. y Ward, R. The c-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulate interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biochem. J.* (1992) 283: 637.
  - Muschel, R. J., Williams, J. E., Lowy, D. R. y Liotta, L. A. Harvey Ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am. J. Pathol.* (1985) 121: 1.
  - Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. y Hayakawa, T. Matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT1080 human fibrosarcoma cells: purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 21712.
  - Okada, A., Santavicca, M. y Basset, P. The cDNA cloning and expression of the gene encoding rat gelatinase B. *Gene* (1995) 164: 317.
  - Powell, W. C., Knox, J. D., Navre, M., Grogan, T. M., Kittelson, J., Nagle, R. B. y Bowden, G. T. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells



- increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* (1993) 53: 417.
- Powell, W. C. y Matrisian, L. M. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Op. Microbiol. Imm.* (1996) 213: 1.
  - Pozzatti, R., Muschel, R., Williams, J., Padmanabhan, R., Howard, B., Liotta, L.A y Khoury, G. Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potential. *Science* (1986) 232: 223.
  - Qui, R G., Chen, J., Kim, D., Mc Cormick, F. y Symons, M. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* (1995) 374: 457.
  - Quincoces, A. F. Serum growth factors up-regulate H-ras, K-ras and N-ras protooncogenes in fibroblasts. *Cell Growth Differ.* (1995) 6: 271.
  - a) Ray, J. M y Stetler-Stevenson, W. G. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur. Respir. J.* (1994) 7: 2062.
  - b) Ray, J. M y Stetler-Stevenson, W. G. TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motility. *Ann. New York Acad. Sc.* (1994) 732: 150.
  - Rouslati, E. How cancer spreads?. *Sci. Amer.* (1996) 275: 32.
  - Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. y Seiki, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* (1994) 370: 61.
  - Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M. y Weinberg, R. A. Transforming genes of carcinoma and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* (1981) 290:260.
  - Sjoerd, R. y Slebos, R. J. C. The *ras* oncogenes in human lung cancer. *Am. Rev. Resp. Dis.* (1990) 142: S27.
  - Spandidos, D. A. y Wilkie, N. M. Malignant transformation of early passage rodent cells by single mutated human oncogene. *Nature* (1984) 310: 469.

- 
- Spinucci, C., Zucker, S., Wieman, J. M., Lyski, R. M., Imhof, B., Ramamurthy, N., Liotta, L. A y Nagase, H. Purification of a gelatin-degrading type IV collagenase secreted by *ras* oncogene transformed fibroblast. *J. Natl. Cancer Inst.* (1988) 80: 1416.
  - Sreenath, T., Matrisian, L. M., Stetler-Stevenson, W. G. y Gattoni-Celli, S. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* (1992) 52: 4942.
  - Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsh, H. C., Wachter, M. P., Margulies, I. M. y Liotta, L. A. The activation of human type IV collagenase proenzyme: sequence identification of the mayor conversion product following organomercurial activation. *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 1353.
  - Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. y Liotta, L. A. Tumor cell interactions with the extracelular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev. Cell Biol.* 1993; 9: 541.
  - Takahashi, K., Heine, I. U., Junker, L. J., Colburn, H. N. y Rice, J. M. Role of cytoskeleton changes and expression of the H-*ras* oncogene during promotion of neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cell. *Cancer Res.* (1986) 46: 5923.
  - Tamakoshi, K., Kikkawa, F., Nawa, A., Maeda, O., Kawai, M., Sugamura, N., Yamagata, S. y Tomoda, Y. Different pattern of zimography between human gynecologic normal and malignant tissues. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1994) 171: 478.
  - Thorgeirsson, U. P., Turpeenniemi-Hujanen, T., William, J. E., Westin, E. H., Heilman, C. A., Talmadge, J. E. y Liotta, L. A. NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated *ras* oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice. *Mol. Cell Biol.* (1985) 5: 29.

- 
- Tuck, A. B., Wilson, S. M., Khokha, R. y Chambers, A. F. Different pattern of gene expression in *ras*-resistant and *ras*-sensitive cells. *J. Natl. Cancer Inst.* (1991) 83: 485.
  - White, M. A., Nicolette, C., Minden, A., Polverino, A., Aels, L. V., Karin, M. y Wigle, M. H. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* (1995) 80: 533.
  - Werb, Z. (1989). Textbook of Rheumatology. 3rd De. WB Saunders. Philadelphia, USA. 300-321 pp.
  - Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* (1991) 5: 2145.
  - Woessner, J. F. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* (1994) 732: 11.
  - Xuan, J. W., Wilson, S. M., Chin, J. L. y Chambers, A. F. Metastatic NIH/3T3-LTA cell hybrids express 72 kDa type IV collagenase. *Anticancer Res.* (1995) 15: 384.
  - Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M. y Taheuchi-Susuki. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* (1993) 364: 308.