

00346 4
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"SECRECION DE METALOPROTEINASAS POR
EXPLANTES DE CANCER CERVICO-UTERINO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

BIOL. FRANCISCO JESUS ARENAS HUERTERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. SAUL VILLA TREVIÑO

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Proteasas, de la
División de Investigación Básica del Instituto Nacional de
Cancerología bajo la Dirección del Dr. Saúl Villa Treviño.**

Agradezco a los miembros del jurado las observaciones y comentarios realizados a la presente tesis:

Dra. Annie Pardo Semo (Presidente).

Dr. Saúl Villa Treviño (Vocal).

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá (Vocal).

Dra. Ma. Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl (Vocal).

Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort (Secretario).

M en C. Carlos Ramos Abraham (Suplente).

Dr. Jaime Berumen Campos (Suplente).

DEDICATORIAS:

A MI MADRE, Catalina Huertero de Arenas:

Siempre fuiste un ejemplo y nos dejaste prácticamente listos para caminar en la vida, tu obra será inolvidable. Siempre te dedicaré todo mi esfuerzo mientras siga trabajando con CANCER CERVICO UTERINO. Todos sabemos bién la razón!

A MI PADRE, Alfredo Arenas Olmos:

En este momento puedo externar que tu ejemplo es intachable y después de lo de mamá, te admiro y te quiero como un amigo.

A MIS HERMANOS, Evangelina, Susana, Ma Luisa, Alfredo, Cynthia, Luis Alfonso y Catalina:

Por su comprensión y paciencia durante todo el tiempo que convivimos. Actualmente los tengo en mi mente y los quiero mucho.

A MIS SOBRINOS, José Luis, David Isaí, Lluvia Nohely, Alfredo de Jesús y Ana Luisa:

Espero que algún día este esfuerzo lo puedan leer y sepan que importante tiene el contribuir con un grano de arena, cuando se trata de ayudar a la gente enferma de cáncer.

A MIS AMIGOS-HERMANOS, Catalina Trejo Becerril, Enrique Pérez Cárdenas y Alejandra Villanueva Espinoza:

Por su gran apoyo durante los momentos difíciles que sufrí, cuando mamá llegó al INCAN con el diagnóstico de cáncer y obviamente por su gran apoyo que me siguen brindando.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 7, Dr. Alvaro Hernández Hernández, Dr. José Luis Aguilar Ponce, Dr. Gabriel de Jesús Varela Rizo, Pas. Biól. Blanca Angélica Segura Pacheco, Pas. Q.F.B. Catalina Arenas Huertero, Pas. Q.F.B. Martha Estrada Pérez, Pas. Q.F.B. Juan de Dios Domínguez Saldaña:

Por su verdadera paciencia hacia mí y entereza al laboratorio. Espero les haya servido estar en convivencia no para ser más neuróticos!

A LOS INVESTIGADORES EN FORMACION DE LA DIVISION DE INVESTIGACION BASICA DEL INCAN:

Para no dejar y mantener el paso lento pero seguro en la carrera como investigadores: formando gente y superándonos cada día profesional y académicamente.

AL Dr. Jaime G. de la Garza Salazar:

Por su gran disposición en cooperar y en aquel tiempo por su apoyo, cuando cambié de línea de trabajo: Investigación en Cáncer.

AL DR. SAUL VILLA TREVIÑO:

Que siempre fue insistente en no dejar la carrera de investigador y que después de la enfermedad de mamá, supo despertar en mí el regreso al posgrado. Además de ser un gran amigo y guía. De verdad Saúl, agradezco tu disposición hacia mí. Mil Gracias!

AL Dr. Alvaro R. Osornio Vargas:

Agradezco todas tus enseñanzas durante mi formación en los primeros años en la carrera de investigador, por tu amistad y confianza, porque eres y seguirás siendo mi amigo, muchas gracias!

A LAS PACIENTES QUE SUFREN CANCER CERVICO UTERINO:

Que bajo la angustia y desesperación cuando entran al consultorio, cooperan con una muestra tumoral, sin saber que destino tendrá ni tampoco saber si tienen la facultad de donar una muestra.

A MIS COMPAÑEROS DE LA MAESTRIA, EN ESPECIAL A Maura Cárdenas, Rosario Ortiz, Aída Uribe, Leda Carolina Torres, Jorge Melendez, por su comprensión, confianza y apoyo en esos años de estudio.

INDICE

Resumen	1
Introducción:	
A. El proceso de invasión tumoral	2
B. Características de las MMPs	3
C. Regulación de las MMPs	9
Antecedentes:	
A. Modelos de estudio en invasión tumoral	16
B. Estudio de MMPs realizados en tejidos tumoraes ginecológicos	16
Justificación:	
A. El fenómeno de metástasis como principal causa de muerte en pacientes con cáncer	19
B. El cáncer cérvico-uterino como principal causa de morbi- mortalidad en la mujer mexicana	19
Hipótesis	22
Objetivos	23

Material y Métodos:

A. Establecimiento de las condiciones de cultivo de explantes de cérvix uterino por la técnica de histocultivo	25
B. Condiciones finales de histocultivo de explantes de cérvix uterino y análisis de MMPs secretadas	26
C. Zimogramas en geles de poliacrilamida 8%-gelatina 0.1%	28
D. Geles desnaturizantes de sobrenadantes de explantes de Ca CU	29
E. Zimogramas en geles de poliacrilamida 10%-caseína 0.1%	29
F. Análisis morfológico de los explantes de cérvix uterino	30
G. Determinación de la actividad enzimática por densitometría	30
H. Datos clínico-patológicos de las pacientes y evaluación estadística de los resultados	31

Resultados:

A. Influencia del soporte de gelatina "Gelfoam" en la secreción de gelatinasas	33
B. Influencia del suero fetal bovino en la secreción de gelatinasas	34
C. Análisis morfológico de los explantes de cervix uterino	36
D. Análisis densitométrico de las gelatinasas A y B secretadas por explantes de cérvix	37
E. Pruebas bioquímicas de las gelatinasas secretadas por explantes de cérvix	41
F. Correlaciones entre la presencia de infiltrado inflamatorio en los explantes con Ca CU y las cantidades de gelatinasas A y B secretadas	43
G. Gelatinasas A y B secretadas por explantes de cérvix uterino. Principales correlaciones con datos clínico-patológicos	44
H. Observación y posible naturaleza de bandas de alto peso molecular en geles desnaturizantes	46
I. Secreción de gelatinasas de alto peso molecular por explantes de cérvix	47
J. Análisis de estromelisina-1 secretada por explantes de cérvix	48
K. Correlaciones entre los niveles de estromelisina-1 y datos clínico-patológicos	49
J. Análisis de caseinasas menores de 30 kDa secretadas por explantes de cérvix. Correlación con datos clínico-patológicos	51

Discusión :

A. La gelatinasa B como proteinasa característica de explantes de cérvix con cáncer	54
B. La gelatinasa A como proteinasa característica de explantes de cérvix con lesión benigna	56
C. Correlaciones entre los niveles de gelatinasas A y B, estromelisin-1 y los datos clínico-patológicos de las pacientes	57
D. Correlaciones entre los niveles de las proteinasas menores de 30 kDa y los datos clínico-patológicos de las pacientes	62
E. Naturaleza de las bandas gelatinolíticas mayores de 100 kDa	62
F. Utilidad del modelo de histocultivo de explantes de cervix uterino para evaluar la secreción de proteinasas	63

Conclusiones:

A. Ventajas y aplicaciones del modelo de histocultivo de explantes de cervix uterino	65
B. Condiciones de histocultivo para evaluar proteinasas en explantes con Ca CU	66
C. Principales proteinasas reveladas durante el cultivo de explantes de cervix uterino: algunas correlaciones con los datos clínico-patológicos de las pacientes con Ca CU	66

Agradecimientos	71
------------------------	----

Diploma, Premio "Aída Weiss"	72
-------------------------------------	----

Glosario de abreviaturas	73
---------------------------------	----

Referencias Bibliográficas	75
-----------------------------------	----

RESUMEN

En la presente tesis se evaluaron las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) secretadas durante el cultivo de 49 explantes con cáncer cérvico uterino (Ca CU) y 26 explantes de cérvix uterino con lesiones benignas (LB) como cervicitis y/o displasias. Después de 48 h de cultivo en 8 ml de medio de cultivo sin rojo fenol y en ausencia de suero fetal bovino (SFB), el sobrenadante se concentró por ultrafiltración en un sistema de AMICON para retener las proteínas mayores de 10 kDa. Cuatro μ g de la proteína concentrada se sometieron a zimogramas de gelatina (0.1%) para revelar la presencia de las gelatinas A y B y, de caseína (0.1%) para revelar estromelisina y/o colagenasa intersticial. También se determinaron otras proteasas en los zimogramas de caseína como cisteín-proteasas de menor peso molecular (menores de 30 kDa). La actividad gelatinolítica y caseinolítica se midió por densitometría en un espectrofotómetro y se expresó en unidades densitométricas. Posteriormente se realizaron correlaciones con las lecturas anteriores en los casos con cáncer y los datos clínico-patológicos: etapa clínica (I, II, III, IV), tipo histopatológico (carcinoma epidermoide queratinizante y no queratinizante, adenocarcinoma y adenoescamoso), estado hormonal (pacientes menstruantes y menopaúsicas) y respuesta al tratamiento (a la radioterapia). Se determinaron las medianas de cada grupo y se compararon para evaluar si las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) mediante la prueba de "U" de Mann-Whitney. Los resultados del modelo de histocultivo revelaron que el uso del GELFOAM como soporte de cultivo mantiene integradas las células de los explantes y no interfiere en el patrón de secreción de gelatinas. El sistema se debe utilizar en ausencia de SFB. Todos los cortes histológicos mostraron la conservación de los elementos tisulares en ambos tipos de explantes. Los resultados mostraron que los explantes de cérvix con LB secretaron cantidades elevadas (medianas) tanto de la forma de 66 kDa como de 72 kDa de la gelatinasa A ($p < 0.05$). De manera inversa se observó para la gelatinasa B: las cantidades de ambas formas moleculares (84 kDa y 92 kDa) fueron elevadas en los explantes con Ca CU. Se observó una relación directa entre mayor tamaño tumoral (etapa clínica) y cantidades mayores de la gelatinasa A. Los carcinomas adenoescamosos y adenocarcinomas secretaron cantidades elevadas de la gelatinasa B, estromelisina-1 y las cisteín-proteasas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa. Los explantes con carcinomas epidermoides queratinizantes presentaron niveles elevados de ambas formas moleculares de las gelatinas A y B, así como la forma de 60 kDa de la estromelisina-1. En los carcinomas epidermoides no queratinizantes se documentó la aparición tanto de estromelisina-1 como de la colagenasa intersticial. Sólomente la estromelisina-1 y de las cisteín-proteasas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa fueron las proteasas que aparecieron en niveles elevados y con tendencia a la significancia, en el grupo de las pacientes sin respuesta al tratamiento. Estas proteasas pueden ser marcadoras de mal pronóstico.

INTRODUCCION

A. EL PROCESO DE INVASION TUMORAL.

La historia natural de una neoplasia desde la etapa intraepitelial hasta la invasora, revela que las alteraciones en la membrana basal (MB) serán determinantes para establecer la invasión, diseminación y metástasis¹⁻³. La MB está constituida principalmente por colágena tipo IV, laminina, heparán sulfato, entactina y nidógeno¹. La MB es una estructura que histológicamente revela sus propiedades morfofisiológicas. Participa en la adhesión celular, filtración selectiva, morfogénesis y mitogénesis. Tiene la función de separar y dar soporte a los epitelios, manteniendo su polaridad en algunos casos, así como sus funciones especializadas^{2,3}. De esta manera, en los carcinomas es común observar una desorganización y pérdida localizada de algunos componentes de la MB como colágena tipo IV y laminina¹. Las células tumorales utilizan para su adhesión receptores específicos para algunos componentes de la misma, principalmente a laminina y fibronectina. Finalmente la locomoción de las células tumorales a través de la MB, es determinante en la invasión⁴ y puede estar mediada por factores quimiotácticos. Cuando se establece la invasión al estroma, la neoplasia puede invadir a su vez vasos sanguíneos y linfáticos en forma de émbolos e iniciar la metástasis⁵. Así, los eventos de invasión y metástasis son precedidos por la producción de enzimas líticas sobre los componentes de la MB. Se sabe que algunos fragmentos de laminina son capaces de inducir la secreción de colagenasas de membrana basal⁴. Todas estas alteraciones son únicas y características de tumores malignos ya que en procesos patológicos benignos, la MB siempre se encuentra estructuralmente sin alteraciones⁶.

Durante el mecanismo de invasión tumoral, la MB puede ser degradada por 2 mecanismos^{1,6}: a) por metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), b) por proteinasas de amplia especificidad de sustrato como elastasas, catepsinas y plasmina. Se ha observado que las células tumorales producen ambos tipos de proteinasas, pero existen evidencias que

señalan a las MMPs como los mediadores fisiológicos de la remodelación y degradación de la matriz extracelular (MEC) y de la MB.

B. CARACTERISTICAS DE LAS MMPs.

Existen 4 grupos⁷⁻¹² de MMPs bien caracterizadas, en muchas de ellas se conoce la secuencia del gen:

I. Grupo de las colagenasas intersticiales. Degradan preferentemente colágenas intersticiales o del estroma (o intersticio), ejemplos: I, II, III, VII y IX.

II. Grupo de gelatinasas. Degradan preferentemente colágenas tipo IV y V, y naturalmente gelatina (colágena desnaturalizada).

III. Grupo de las estromelisin. Degradan principalmente componentes de menor peso molecular de la MB y del estroma: glucoproteínas como fibronectina y laminina y eventualmente colágena tipo IV en la región no helicoidal.

IV. MMPs tipo membrana. Activan a la progelatinasa A.

Todas las MMPs mencionadas son glucoproteínas que comparten las siguientes características^{7,8,11}:

- a) son producidas en forma de proenzimas, zimógenos o formas inactivas.
- b) el mecanismo catalítico depende de zinc. Existen dos átomos, el estructural y el catalítico. Este último es el que responde a la inhibición y es quelado con 1,10-fenantrolina o ácido etileno-diamino tetracético (EDTA). No son inhibidas por fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y N-etil-maleimida (NEM).
- c) la activación de la proenzima lleva a la pérdida de un fragmento de aproximadamente 8-10 kDa.
- d) existe homología en la estructura primaria entre todos los miembros de las MMPs: 60% entre la MMP-1 y la MMP-8, 56% entre la MMP-3 y la MMP-1.
- e) pueden degradar uno o más componentes de la matriz extracelular^{13,14}:
- f) Pueden ser activadas por organomercuriales como el acetato p-aminofenilmercurio (APMA) y/o por enzimas (tripsina, plasmina).

g) Pueden ser inhibidas por moléculas específicas denominadas inhibidores tisulares de la MMPs (TIMPs). Existen tres tipos: TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 o CHIMP-3

CUADRO 1. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LAS MMPs^{8,11,13,14}

ENZIMA	¹Mr (kDa) (latente / activa)	MMP #	SUSTRATOS (Como grupo)
GRUPO DE COLAGENASAS INTERSTICIALES			
Colagenasa de fibroblastos	52 / 42	MMP-1	Colágenas I, II, III, VII, VIII, X
Colagenasa de neutrófilos	75-85 / 65	MMP-8	
Colagenasa interst. de Ca mama	52 / 42	MMP-13	
GRUPO DE GELATINASAS			
Gelatinasa A	72 / 66	MMP-2	Colágenas IV, V, VII, X Gelatina (colágena desnaturalizada) Fibronectina, elastina
Gelatinasa B	92 / 84	MMP-9	
GRUPO DE ESTROMELISINAS			
Estromelisinina-1	57-60 / 42-48	MMP-3	Colágena I*. Colágenas IV, V, IX, X**. Gelatina, fibronectina, laminina. Elastina, proteína "core" de proteoglicanos.
Estromelisinina-2	55	MMP-10	
Estromelisinina-3	60 / 50	MMP-11	
Metaloelastasa de macrófagos	54	MMP-12	
Matrilisinina	28 / 20	MMP-7	
GRUPO DE MMPs TIPO MEMBRANA			
MMP tipo membrana	63	MMP-14	Progelatinasa A

1. Mr. Movilidad relativa, peso molecular en kilodaltones (kDa).

*. Sólo en la región aminoterminal.

**. Sólo en las regiones no helicoidales, aunque Woessner¹¹ puntualiza que la estromelisinina digiere mejor la colágena IV que las gelatinasas.

1. GRUPO DE COLAGENASAS INTERSTICIALES^{8,11}.

En este grupo se han reconocido diferentes ejemplos: colagenasa de fibroblastos¹⁵, colagenasas de neutrófilos¹⁶ y colagenasa intersticial de cáncer de mama¹⁷. Otras características están representadas en el cuadro 1.

La estructura molecular de la colagenasa de fibroblastos (figura 1) revela los dominios importantes que son compartidos por los demás miembros de la familia de MMPs. Estos exones se encuentran codificados en el cromosoma 11 en el ser humano⁸ y son los siguientes^{8,11}:

- a) El péptido señal, está formado por los primeros 17 aminoácidos. Esta secuencia se corta cuando la enzima es secretada al espacio extracelular y no se encuentra en la enzima latente.
- b) El propéptido es un fragmento de aproximadamente 8-10 kDa, en donde se encuentra el residuo de cisteína que interacciona con el sitio activo, cubriéndolo y manteniendo a la enzima en forma latente. Por lo tanto este fragmento se pierde durante la activación de la enzima.
- c) Se reconocen dos sitios donde reside el zinc. En el primero se ubica el Zn^{2+} estructural y se encuentra en coordinación con los residuos de histidina 149, 164 y 179. El segundo sitio del átomo de Zn^{2+} catalítico interacciona en coordinación con los residuos de histidina 199, 203 y 210. En esta última zona se lleva a cabo la actividad proteolítica frente a sustratos, y es el Zn^{2+} que sufre quelación frente a 1,10-fenantrolina lo que produce la inhibición enzimática.
- d) El sitio de unión a hemopexina/vitronectina reside en la zona del puente disulfuro entre los residuos de cisteína 259 y 466. Esta región ayuda al reconocimiento del sustrato.

Son inhibidas específicamente por el TIMP-1 (28 kDa) y sólo forma complejos con las colagenasas activas.

“DOMINIOS COMPARTIDOS ENTRE LAS MMPs”

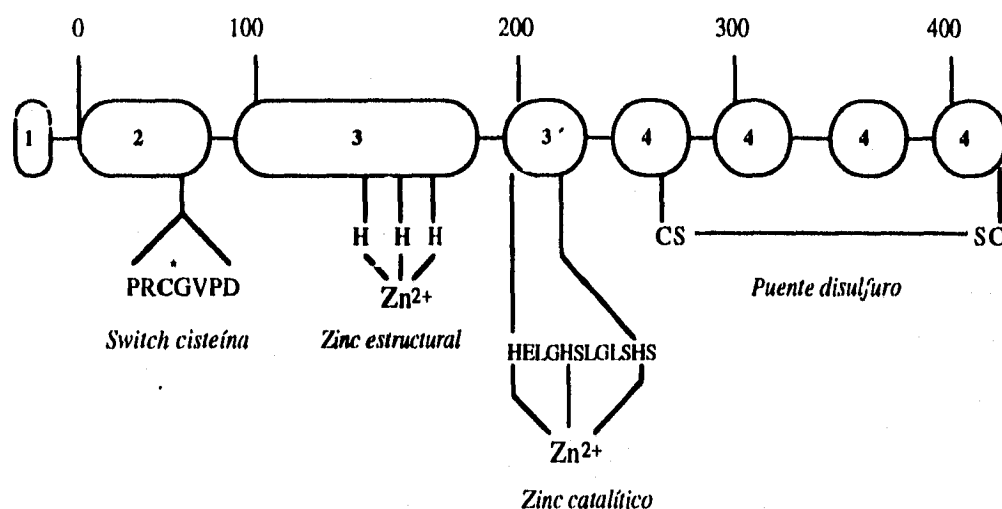


FIGURA 1. Estructura molecular de la colagenasa de fibroblastos¹¹.

1. Péptido señal. 2. Propéptido. 3. Sitio de unión del Zinc estructural. 3'. Sitio de unión del Zinc catalítico. 4. Repeticiones de hemopexina/vitronectina. Los números en la parte superior representan la posición de los residuos de aminoácidos en la estructura de la MMP. Las siguientes posiciones están representadas: el residuo de cisteína-72 del switch (con asterisco); las histidinas-149, -164- y -179 del átomo de Zinc estructural; las histidinas-199, -203 y -210 para el átomo de Zinc catalítico; las cisteínas-259 y -466 para el puente disulfuro. Los ligandos al Zinc están representados de acuerdo a la estructura de la estromelina-1.

2. GRUPO DE GELATINASAS^{8,11}.

En este grupo se conocen las siguientes proteinasas: Gelatinasa A y Gelatinasa B. Algunas de sus características están contenidas en el cuadro 1.

Su estructura molecular es similar a la descrita para la colagenasa de fibroblastos, con las siguientes diferencias⁸:

- a) Gelatinasa-A: Contiene 10 exones agrupados en 4 dominios con secuencia similar al dominio de unión de fibronectina a colágena. Estos dominios elevan su peso molecular.
- b) Gelatinasa-B. Contiene un dominio similar a la colágena tipo V, enseguida de los dominios de unión de fibronectina a colágena, descritos para la Gelatinasa-A. Estas dos características le dan la particularidad de ser la de mayor peso molecular.

Los exones que codifican los dominios de fibronectina de ambas gelatinasas se encuentran en el cromosoma 16 en el ser humano⁸. La gelatinasa-A se inhibe específicamente por el TIMP-2 desde su forma latente mientras que la gelatinasa-B se inhibe específicamente por el TIMP-1^{8,11}.

3. GRUPO DE LAS ESTROMELISINAS^{7,8,11}.

Se han reconocido cinco subgrupos: de la estromelisina-1¹⁸, estromelisina-2¹⁹, estromelisina-3²⁰, de la matrilisina²¹ y de la metaloelastasa de macrófagos²².

Estructuralmente comparten los cuatro primeros dominios descritos en la estructura de la colagenasa intersticial. Sin embargo, la matrilisina posee sólo los primeros tres dominios: el péptido señal, el propéptido y el dominio catalítico. Las estromelisin¹⁴ pueden autoactivarse o activar otras prometaloenzimas como la colagenasa intersticial y la gelatinasa-A¹¹. Todas las enzimas de este grupo son inhibidas por el TIMP-1 en las formas activas de las mismas⁸.

4. MMPs TIPO MEMBRANA^{12,14}

Está representada por la MMP-14. Tiene una secuencia transmembranal que le sirve para anclarse a la membrana citoplásmica de las células. Esta secuencia reside en el cuarto y último dominio de repetición de hemopexina, hacia el extremo carboxilo terminal. Tiene una *Mr* estimada de 63 kDa y utiliza como sustrato a la progelatinasa-A, induciendo su activación.

C. REGULACION DE LAS MMPs.

La regulación de las MMPs puede llevarse a cabo a diferentes niveles:

1. **Represión/inducción de los genes, con la consecuente transcripción del RNA mensajero^{8,11,14,23}.**
2. **Estabilidad del RNA mensajero²⁴⁻²⁶.**
3. **Secreción y activación de formas latentes^{7,11,12,23}.**
4. **Inhibición de las formas activas^{7-8,11,23,27,28}.**
5. **Asociación de las MMPs a superficie celular ó a elementos de la MEC^{23,29}.**

Para conocer cuál es el efecto que puede tener un agente sobre los genes de algunas MMPs, es necesario conocer los elementos de regulación del gen en las regiones promotoras. Por ejemplo, las regiones promotoras de la gelatinasa B, de la colagenasa de fibroblastos, estromelina 1 y 2, y de la matrilisina tienen caja TATA (sitio de unión de la RNA pol II) aproximadamente en la posición -30 ± 2 . Excepto por la gelatinasa B, las demás MMPs contienen un sitio de unión AP-1 (activator protein 1), aproximadamente en la posición -70 ± 4 ^{8,26,27}. La gelatinasa B contiene 2 sitios de unión AP-1, uno ubicado en la posición -79 y el otro en la posición -533²⁶. Esta región AP-1 puede ser reconocida por los factores de transcripción de los proto-oncogenes *c-jun* y *c-fos*. De esta manera, cualquier agente que sea capaz de activar estos proto-oncogenes puede activar al mismo tiempo los

genes de estas MMPs^{26,27}. Los genes de la colagenasa intersticial, estromelina 1 y 2 y la matrilisina contienen secuencias PEA3 en las regiones promotoras. La proteína que se une a estas secuencias es un factor que también se une al "enhancer" del virus del poliovirus. Este factor es inducido por suero fetal bovino, ésteres de forbol y por las proteínas no nucleares de los oncogenes *v-src*, *Ha-ras*, *v-mos* y *v-raf*. Su activación es independiente de la expresión de *c-fos*.^{8,26} Finalmente, los promotores de la gelatinasa B, colagenasa intersticial y matrilisina contienen secuencias consenso al elemento de inhibición del factor β de crecimiento transformante (TIE en inglés). Lo interesante de las MMPs radica en la regulación del gen de la gelatinasa A. Su promotor contiene elementos con características de "housekeeping" ó de promotores constitutivos. Algunos elementos identificados son una secuencia AP-2 en la posición +157 y 2 cajas de secuencias ricas en GC ubicadas en -69 y -89, respectivamente. Este hecho puede explicar el porqué es expresado ampliamente en muchos tejidos. Su papel constitutivo puede residir en que esta gelatinasa debe degradar colágena anormal ó desnaturalizada que no se incorporará a fibrillas de colágena²⁶.

1. REPRESION/INDUCCION DE LOS GENES, CON LA CONSECUENTE TRANSCRIPCION DEL RNA MENSAJERO.

En general se reconoce que la transcripción de *c-jun* y *c-fos* se requiere cuando la vía de la señal de estimulación es vía factores de crecimiento y/o virus. Sin embargo, hay que tomar en cuenta el grado de fosforilación de estos factores de transcripción. Al menos con la proteína Jun se sabe que cuando el extremo aminoterminal se encuentra fosforilado, incrementa su función de transcripción de genes. La inhibición se logra cuando el extremo carboxilo terminal se fosforila¹⁴.

Varios agentes pueden regular de diferentes maneras los genes de algunas MMPs:

1a. Agentes que inducen algunos genes de MMPs⁷:

- Factores de crecimiento y/o citocinas: EGF, PDGF, IL-1, NGF, TNF- α , FGF,
- Interferones α , β y γ .

- Agentes químicos: AMPc, colchicina, citocalasina B y D, lipopolisacárido, mitomicina C, pentoxifilina, esteres de forbol, prostaglandina G, trifluoperazina
- Factores de acción a nivel de superficie celular: fusión celular, ionoforos, concanavalina A, cristales de urato, hidroxiapatita, pirofosfato de calcio, hierro, fagocitosis, polihidroximetilmetacrilato.
- Agentes físicos: choque térmico, radiación UV, ionizante.
- Transformación por oncogenes: *Ha-ras*, *v-src*, *v-fos*, *c-erb-B* entre otros.

2a. Agentes que reprimen algunos genes de MMPs^{7,14}:

- Retinoides, glucocorticoides, producto del gen E1A de adenovirus, estrógenos, progesterona, factor de crecimiento transformante β (TGF- β).

La dexametasona y el ácido retinoico forman un complejo con sus respectivos receptores y aparentemente interfieren directamente con la secuencia AP-1, reprimiendo la transcripción¹⁴.

2. ESTABILIDAD DEL RNA MENSAJERO.

Se ha reportado que también existe regulación a nivel de estabilidad del RNA mensajero de la estromelina-1, colagenasa intersticial y gelatinasa-A²⁶. En cultivos primarios de fibroblastos humanos se demostró la existencia de un factor específico de RNAm tanto en colagenasa intersticial como en estromelina-1. Este efecto es antagonizado con el tratamiento en dexametasona. Así se propone que los fibroblastos contienen un factor estabilizador del RNAm, inducible con factor de crecimiento epidérmico (EGF) e inhibido con dexametasona. Se ha observado que la degradación de estos RNAs depende de las características conformacionales derivadas de su secuencia ó estructura primaria. Se han reportado 3 zonas de secuencias ricas en AU, ubicadas en la región 3' sin traducir, en el RNAm de la colagenasa intersticial humana y una zona en la misma región del RNAm de la estromelina-1. Es posible que el factor estabilizador del RNAm de estas MMPs sea inducido después del tratamiento con EGF²⁵.

En fibroblastos gingiviales humanos se demostró que el TGF β 1 fue capaz de

incrementar 3 veces la estabilidad del RNAm de la gelatinasa-A, así como de incrementar de 1.5 a 2.2 veces más la síntesis del RNAm. De esta manera, el TGF- β 1 puede también regular elevando la transcripción así como postranscripcionalmente incrementando la estabilidad del mismo. Este hecho es importante, ya que en procesos biológicos en los que se lleva a cabo la formación de MEC tales como morfogénesis, angiogénesis y cicatrización de heridas, el TGF- β 1 es un regulador positivo importante, en el que su síntesis la llevan a cabo las células epiteliales, con el objeto de estimular a las células del mesénquima a secretar gelatinasa-A. El TGF- β 1 también es capaz de reducir la expresión del TIMP-2 y facilitar la remodelación de las membranas basales, ya que este inhibidor modula a la gelatinasa-A y la eliminación de colágena anormal (desnaturalizada) por esta MMP es importante, ya que este tipo de colágena puede retardar la formación de fibrillas de colágena fibrilar en la MEC²⁴.

3. SECRECION Y ACTIVACION DE FORMAS LATENTES.

Todas las MMPs tienen un propéptido aminoterminal de 77 a 87 residuos de aminoácidos, que determina la latencia de la forma zimógena de las MMPs. Este propéptido tiene como característica la presencia de una secuencia conservada: (65-75)-prolina-arginina-cisteína-glicina-valina/asparagina-prolina-aspartico; en el cual la cisteína interacciona con el zinc del dominio catalítico, desplazando la molécula de agua requerida para la actividad catalítica. La asparagina se encuentra presente sólo en la gelatinasa-A, en las restantes MMPs el residuo corresponde a la valina^{7,11}. Por otro lado, en las proestromelinas 1 y 2 y procologenasas de fibroblastos y de neutrófilos, se ha determinado que sus propéptidos tienen motivos o zonas de rompimiento por enzimas tales como la plasmina y tripsina²³. En este caso, las enzimas rompen el propéptido entre la arginina 36 y la asparagina 37. Otras enzimas tales como las calicreínas pueden cortar entre las argininas 35 y 36. Después de cortarse el propéptido en cualquiera de estas posiciones, el centro activo de la enzima queda expuesto. Este rompimiento interrumpe la estabilidad entre el residuo de cisteína y el Zn²⁺, modificándose la conformación de la enzima y permitiendo el procesamiento autocatalítico

hacia la forma activa en varios pasos: se produce un rompimiento autocatalítico entre la treonina 63 y la leucina 64. Sin embargo, este intermediario no es completamente activo, la enzima adquiere un carácter activo cuando se produce un rompimiento en la cisteína 73. Se ha observado que si se produce un rompimiento en la fenilalanina 81, la enzima resultante sólo tendrá un 40% de actividad⁷. De esta manera, la generación de plasmina a partir de plasminogeno, vía activadores del mismo pero principalmente del tipo urocinasa, inicia la cascada de activación produciendo estromelina activa. Finalmente la estromelina activa puede activar a la procólagenasa intersticial y/o progelatinasa-B²³.

La progelatinasa-A aparentemente no tiene un sitio de rompimiento susceptible a la plasmina y la activación independiente puede demostrarse en células de conejo y humano. *In vitro*, la progelatinasa-A puede ser inducida a autoprocés de activación a altas concentraciones, con un rompimiento entre la asparagina 80 y la fenilalanina 81. La unión de la enzima a heparina o dextran-sulfato puede potenciar el autorompimiento de su propéptido a bajas concentraciones de la progelatinasa-A. Finalmente, la activación de esta gelatinasa se puede llevar a cabo en la superficie celular, vía una MMP denominada tipo membrána, generando una forma activa de 66 kDa de peso molecular^{12,14}.

4. INHIBICION DE LAS FORMAS ACTIVAS.

Los TIMPs representan los principales inhibidores, sin olvidar también a la α -2-macroglobulina²⁴. Se han descrito 3 tipos de TIMPs: el TIMP-1 es una glucoproteína de 28.5 kDa, el TIMP-2 es una proteína de 21 kDa y el TIMP-3 o Chimp-3 que es una proteína de 21 kDa recién descrita^{11,23,27}. Son diferentes los tipos celulares que los producen y la regulación de los genes es algo diferente entre el TIMP-1 y el TIMP-2. El gen del TIMP-1 por ejemplo, es activado por la mayoría de las citocinas y puede responder de manera similar a como lo llevan a cabo la estromelina-1, colagenasa intersticial y la gelatinasa-B^{8,28}. El TIMP-2 por ejemplo, es regulado de manera negativa por el TGF- β 1 y siendo el inhibidor de la gelatinasa-A estimula el gen al menos en fibroblastos²³. El promotor de TIMP-1 tiene

secuencias AP-1 y el del TIMP-2 tiene un elemento de represión a TGF- β 1²⁷. El Chimp-3 se reportó inicialmente como un componente de la MEC durante las fases tempranas de transformación de fibroblastos embrionarios. Ahora también se le incluye en el grupo del TIMP-3 y los RNAm de este inhibidor se han descrito en tejidos conectivos, incluyendo diferentes estados del desarrollo embrionario²³.

Aunque de manera individual los TIMPs sólo comparten un 40% de identidad entre ellos, sin embargo estructuralmente tienen algunas similitudes⁷. Este hecho se debe a la conservación de los 12 residuos de cisteína que interaccionan entre sí para formar puentes disulfuro y generar estructuras de "loops" o asas. El TIMP-1 y el TIMP-2 poseen dos dominios estructurales: el amino-terminal que consiste de 3 asas y el carboxilo-terminal que contiene asas más pequeñas. Es el dominio amino el que se arregla en el espacio e interacciona con el dominio catalítico de la enzima. Ensayos de mutación en el dominio amino-terminal del TIMP-1 han demostrado que las secuencias de la asparagina 16 a la lisina 22 y del ácido glutámico 82-87 participan en la unión del TIMP-1 en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, las mutaciones no alteran la afinidad por la matrilisina. Lo que se logró comprobar fue que mutaciones en los residuos histidina 7 a la glutamina 9 disminuyen la afinidad del inhibidor por la enzima. Sin embargo, las interacciones entre los dominios carboxilo-terminal de TIMP-1 y TIMP-2 con el dominio carboxilo-terminal de la enzima juegan un papel importante en la formación del complejo. En el caso del TIMP-2, las interacciones iónicas del dominio carboxilo cargado negativamente son también importantes en la formación del complejo, principalmente con la gelatinasa-A²³.

5. ASOCIACION DE LAS MMPs A LA SUPERFICIE CELULAR O A ELEMENTOS DE LA MEC.

Se ha reportado la capacidad de algunas MMPs de asociarse tanto a la superficie celular como a algunos elementos de la MEC. La asociación a superficie celular de la forma latente de la gelatinasa-A, por la MMP tipo membrana, y el paso a su forma activa forma parte

de otro nivel de regulación de la enzima. La proestromelisin-1 puede quedar secuestrada en una matriz rica en colágena y de esta manera evitar su activación por la plasmina y así iniciar la cascada de activación de otras MMPs. También el TIMP-3 tiene la propiedad de unirse a elementos de la MEC^{23,29}.

ANTECEDENTES

A. MODELOS DE ESTUDIO EN INVASION TUMORAL.

Existen diferentes modelos para estudiar los mecanismos de invasión tumoral. Estos incluyen los ensayos en animales de laboratorio^{30,31}, así como los ensayos *in vitro*³². En el caso del modelo *in vivo*, se verifica el número de metástasis inducidas así como los órganos afectados con mayor frecuencia. En los ensayos *in vitro* se evalúa la capacidad invasora de las células tumorales, sobre una membrana que contiene una capa de colágenos o gelatina, o componentes de una membrana basal reconstituida, mejor conocido como matrigel. El estudio puede realizarse ya sea analizando los cambios en la composición de los elementos moleculares de MEC³³, así como estudiar las diferentes proteinasas que se encargan de su cambio y/o degradación^{1,6,7,33-36}. En estos estudios se ha determinado la modificación de los componentes de la MEC como: proteoglicanos, laminina, entactina, nidógeno, fibronectina; así como enzimas proteolíticas (catepsinas, colagenasas, plasmina).

B. ESTUDIOS DE MMPs REALIZADOS EN TEJIDOS TUMORALES GINECOLOGICOS.

En relación a proteinasas secretadas por tumores ginecológicos, existen algunos estudios que han analizado el tejido tumoral de ovario y endometrio, así como sus respectivos tejidos normales. En uno de ellos, Tamakoshi³⁷ *et al* reportaron mayor actividad gelatinolítica en tejidos tumorales que en los tejidos normales. Las metaloproteinasas (MMPs) de matriz extracelular presentes en los tejidos tumorales fueron las formas de 66 kDa; 84 kDa y 92 kDa de las gelatinasas A y B, respectivamente. Sin embargo, estos resultados se generaron de un análisis de 5 muestras en total con cáncer de ovario y 4 de ovario normal, así como de 6 muestras con cáncer de endometrio y 4 de endometrio normal. Marbaix³⁸, *et al* demostraron el efecto regulador de la progesterona, en la secreción de algunas MMPs en cultivo de explantes de endometrio humano. A dosis fisiológicas (10-200 nM), la progesterona inhibió la producción de la MMP-1, MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), principalmente

en la forma activa de esta última. Concluyeron que estas MMPs participan en la renovación de la MEC del endometrio humano y que la progesterona controla el mantenimiento del tejido conectivo endometrial, inhibiendo estas MMPs. Sin embargo, Marbaix³⁸ *et al* no describieron en detalle varias condiciones críticas durante el cultivo de explantes endometriales, tales como: tamaño de los explantes, en que condiciones llevaron el cultivo, es decir con o sin soporte tridimensional, si el medio de cultivo contenía rojo fenol. Finalmente, Miyagi³⁹ *et al* caracterizaron las MMPs y sus inhibidores en líneas celulares provenientes de diferentes zonas del aparato ginecológico, pero ninguna del cérvix uterino:

a) 5 líneas de carcinomas de ovario.

b) otras líneas celulares fueron: una de coriocarcinoma y otra de adenocarcinoma endometrial. Sus resultados revelaron que las líneas de carcinomas indiferenciados de ovario secretaron principalmente las gelatinasas A y B, mientras que la línea de coriocarcinoma secretó diferentes MMPs en altas concentraciones. Todas secretaron inhibidores tisulares de MMPs tipo 1 (TIMP-1, del inglés: tissue inhibitor of matrix-metaloproteinases). Concluyeron que la tendencia elevada de proteólisis parece estar asociada a entidades potencialmente malignas, como las líneas celulares que evaluaron.

En Ca CU sólo existen tres reportes que han analizado el tema de gelatinasas. En uno de ellos, Nuovo⁴⁰ *et al* verificaron por RT-PCR *in situ* la localización de las gelatinasas A y B, así como del TIMP-1 y TIMP-2. Concluyeron que la relación de mayor señal de la gelatinasa B, así como del TIMP-1 fue asociada a pacientes con datos clínico-patológicos de mal pronóstico. Guilles⁴¹ *et al* desarrollaron un modelo de progresión tumoral *in vitro* de Ca CU. Las células de epitelio cervical fueron transfectadas con virus del papiloma humano 33, con y sin co-transfección con *ras*. Posteriormente, observaron que las células se arreglan al inducir organoides con matrices en dos tipos morfológicos:

Grupo I. Lesiones similares a neoplasias intraepiteliales cervicales III y con morfología epitelial.

Grupo II. Lesiones organizadas como carcinomas microinvasores y con morfología del tipo

mesenquimatoso (incluso vimentina positivos). En este último grupo, las células se comportaron invasoras *in vitro* y a diferencia del primer grupo, fueron capaces de secretar además de gelatinasa B también la gelatinasa A. Finalmente, Daneri-Navarro *et al*⁴² analizaron la actividad proteolítica en extractos de 85 muestras de cérvix uterino de pacientes mexicanas con diferentes lesiones: Ca CU tipo epidermoide, lesiones displásicas y cérvix sin lesiones. Observaron una relación directa entre las lesiones de cérvix uterino características de la historia natural del Ca CU y el grado de actividad proteolítica contenida en los extractos tisulares. Las bandas características de los extractos de muestras con Ca CU fueron las bandas de 72 kDa y 52 kDa. La mayoría de estas proteinasas fueron del tipo MMPs ya que fueron inhibidas con EDTA y 1,10-fenantrolina.

No existen reportes que documenten la secreción de MMPs en modelo de explantes tumorales y de epitelio sin lesiones malignas en cérvix uterino.

JUSTIFICACION

A. EL FENOMENO DE METASTASIS COMO PRINCIPAL CAUSA DE MUERTE EN LOS PACIENTES CON CANCER.

Uno de los problemas principales en cáncer, es la propiedad que tienen las células neoplásicas a diseminarse desde su sitio primario a órganos distantes. Esto se conoce como metástasis^{30,43}. También hay que reconocer el hecho de la invasión local o dentro del tumor primario⁴⁴. Tanto la enfermedad metastásica como la enfermedad local, son las principales causas de muerte en los pacientes con cáncer. Sin embargo, la enfermedad metastásica es la de mayor impacto desde el punto de vista clínico^{30,44}. El médico no puede determinar el establecimiento de metástasis al momento de la consulta de primera vez, ya que los implantes micrometastásicos requieren del paso del tiempo para ser detectados tanto clínicamente (por complicaciones respiratorias, renales, del sistema nervioso central, o por la presencia de dolor en sitios fuera del crecimiento primario), como por estudios de gabinete⁴⁵. El límite inferior de detección de masas tumorales por estudios radiográficos es de un centímetro cúbico³⁰. Otro hecho que se agrega es cuando quedan masas residuales, después del tratamiento con radio o quimioterapia, incluso con cirugía⁴⁵. La resistencia a la radio y/o quimioterapia, junto con el aumento en el número de implantes metastásicos, son algunos hechos que justifican la necesidad de estudiar a diferentes niveles los mecanismos de diseminación tumoral⁴⁴.

B. EL CANCER CERVICO UTERINO COMO PRINCIPAL CAUSA DE MORBI-MORTALIDAD EN LA MUJER MEXICANA. ¿Cuáles son las proteinasas que utilizan las células de un Ca CU?. ¿Pueden estas enzimas afectar el pronóstico de las pacientes?.

Dentro de las enfermedades neoplásicas que afectan a la mujer, el cáncer cérvico uterino (Ca CU) representa la primera causa de muerte por cáncer tanto en nuestro país como en Latinoamérica⁴⁶⁻⁴⁸. Desde el punto de vista de los epidemiólogos, el comportamiento del

Ca CU en Latinoamérica es de tipo endémico⁴⁶. Esta predominancia también es patente en las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Se tiene un registro de 700-750 nuevos casos al año, como lesión invasora (etapas clínicas I a IV); y de 200-250 nuevos casos de carcinoma *in situ*⁴⁹. Por otro lado, a pesar de que es una neoplasia de fácil diagnóstico desde sus etapas tempranas, mediante el análisis de células exfoliadas, conocida como "Prueba de Papanicolau" y mediante la exploración ginecológica directa⁴⁶; no se ha logrado la integración de este examen al modo de vida de la mujer mexicana desde el inicio de su vida sexual. Queda el gran reto de disminuir a largo plazo mediante esta prueba la morbi-mortalidad en la mujer mexicana.

En relación a los factores de riesgo que pueden predisponer al desarrollo de esta neoplasia, están estrechamente relacionados con los hábitos de la vida sexual de la mujer. Estudios epidemiológicos realizados tanto en el INCAN como en otros países latinoamericanos han revelado que el inicio de la vida sexual así como la gestación a edades muy tempranas^{48,50-52}, el número elevado de partos⁵³, la práctica sexual con más de un compañero^{46,50,51}, así como la infección por el virus del papiloma humano (VPH)⁴⁶⁻⁵³, son algunos de los hechos que se han reconocido como factores que predisponen al desarrollo del Ca CU.

El pronóstico para las pacientes con Ca CU depende de manera importante de la etapa clínica con la que llegan al diagnóstico, pero en términos generales mientras el diagnóstico sea más temprano, la paciente tendrá más posibilidades de control local de la enfermedad⁴⁵. En general, las etapas clínicas avanzadas como II y III (masas tumorales mayores de 3 cm, con destrucción completa del cérvix uterino e invasión tanto a vagina como a músculo parametrial), requieren para su desarrollo del paso de varios años: desde 2 hasta 8 años⁴⁶. Los carcinomas de menor tamaño (etapas tempranas y masas tumorales menores de 3 cm), tienen más oportunidad de ser controlados y bloqueados generalmente con radiación ionizante (radioterapia). Sin embargo, el pronóstico tiende a ser malo cuando el tamaño del carcinoma es mayor a 3 cm así como del estado general de la paciente⁴⁵. También el tipo

histopatológico afecta el pronóstico de las pacientes: clínicamente las pacientes con carcinomas epidermoides responden mejor a la radioterapia^{54,55}. Sin embargo, el comportamiento biológico está cambiando con el paso del tiempo y ahora se sabe de un mayor número de casos con falla al tratamiento, a pesar de ser un carcinoma potencialmente radiosensible⁵⁶. Por otro lado, se ha observado que la falla al control local del Ca CU, eleva las posibilidades tanto de recurrencias como de metástasis a distancia en las pacientes^{44,56}. Estos hechos revelan la necesidad de describir algunas de las vías que el Ca CU utiliza durante su invasión tanto local, como su diseminación a distancia principalmente después del manejo con radioterapia. Sin embargo, llama la atención que en la literatura no se han generado comunicaciones en relación a los mecanismos de invasión en Ca CU. Este hecho puede explicarse en parte, por las diferentes realidades que existen tanto en las sociedades europeas como en la norteamericana. En estos países, el cáncer de mama representa la primera neoplasia que afecta a la mujer y el Ca CU está relegado al 5% ó 6% de incidencia⁵⁷. En nuestro país y en Latinoamérica es la primera neoplasia que afecta a la mujer⁴⁶⁻⁴⁸.

De esta manera, se justifica el estudio de los mecanismos enzimáticos que puede emplear esta neoplasia durante su crecimiento. Finalmente, el entender estos mecanismos puede abrir las posibilidades de lograr una atención más objetiva a un gran grupo de pacientes con Ca CU que se atienden en cualquier centro hospitalario de 3er nivel. Esto se podrá lograr mediante la categorización de las pacientes por medio de perfiles bioquímicos, específicamente de proteinasas secretadas que puedan determinar grupos o subgrupos con características de mal pronóstico, aún dentro del grupo de pacientes con carcinomas epidermoides teóricamente radiosensibles. Para evaluar proteinasas secretadas tanto por líneas celulares como por tejidos, se puede realizar por varias técnicas, entre ellas cabe destacar el uso de sustratos acoplados a cromógenos, sustratos marcados con radiactividad, por pruebas de ELISA (inmunoensayo con anticuerpos específicos adheridos en placas de 96 pozos) y con la técnica de electroforesis acoplada a sustrato (zimogramas). La técnica de zimogramas ofrece la ventaja de revelar directamente la proteinasa, así como la presencia de diferentes

formas moleculares (zimógenos y formas activas). Finalmente, puede también revelarse de manera semicuantitativa la actividad de las proteinasas, mediante un análisis densitométrico de la degradación del sustrato, aprovechando la ventaja que ofrece el contraste del colorante asociado al sustrato. Además la técnica de zimograma es fácil de realizar en cualquier laboratorio. En la División de Investigación Básica se dispone de la infraestructura para realizar esta técnica, que asistió el inicio y el establecimiento de una línea de investigación de mecanismos enzimáticos de invasión tumoral en el INCan.

HIPOTESIS

“Si los cambios en la matriz extracelular de un tumor pueden deberse a la acción de proteinasas y a su vez pueden facilitar el proceso de invasión de las células tumorales, entonces los explantes con Ca CU secretarán altas concentraciones de MMPs que los explantes de cérvix con lesiones benignas (LB)”.

OBJETIVOS

GENERAL:

Describir las MMPs secretadas en cultivo de explantes de cérvix con LB y con Ca CU invasor, asistido por pruebas bioquímicas:

- a) degradación frente a sustratos de gelatina y caseína.
- b) activación de formas latentes frente a acetato p-aminofenilmercúrico (APMA).
- c) inhibición frente a 1,10-fenantrolina.
- d) actividad frente a otros inhibidores: PMSF (de serín-proteinasas) y N-etilmaleimida (NEM, de cisteín-proteinasas).

Este objetivo está fundamentado por el hecho de que las células neoplásicas son capaces de mantener la MEC de manera diferente de como lo realiza el estroma y el epitelio de un cérvix con lesión benigna y sin alteraciones de la MB¹. Además, se sabe en la mayoría de las neoplasias que el tejido se programa para una dinámica de degradación destacando un aumento sin control de la síntesis y secreción de proteinasas en general^{1,6}. Se ha reportado en homogenizados de tumores de endometrio y ovario las diferencias importantes en el contenido de gelatinasa A y B, entre tejidos normales y tumorales³⁷.

ESPECIFICOS:

Describir las correlaciones entre las cantidades (medianas) de MMPs secretadas por explantes de Ca CU y datos clínico-patológicos:

1. Etapa clínica: I, II, III y IV.
2. Tipo histopatológico: Carcinoma epidermoide, carcinoma adenoescamoso y adenocarcinoma puro.
 - Subtipos de carcinoma epidermoide:
 - b1) Células grandes no queratinizante.

b2) Células grandes queratinizante.

3. Estado hormonal de las pacientes: menstruantes, menopausicas.

4. Respuesta al tratamiento, principalmente posradioterapia:

No respuesta: Persistencia y/o progresión tumoral,
metástasis.

Respuesta: Control del primario y ausencia
de metástasis.

Este objetivo está fundamentado por el hecho de que tanto en suero de pacientes con Ca CU⁵⁸ como en cáncer de mama⁵⁹ y de pulmón⁶⁰, los niveles de proteinasas, pero principalmente de MMPs guardan algunas correlaciones con datos clínicopatológicos entre los que destacan etapa clínica y respuesta a tratamiento. Por otro lado, la expresión elevada de RNAm de algunas MMPs está correlacionado con la etapa clínica de los pacientes. La expresión por inmunohistoquímica tanto de gelatinasa A como de la B también está correlacionada con el grado de invasión a ganglios linfáticos en carcinoma de cabeza y cuello⁶¹. Finalmente, las gelatinasas contenidas en homogenizados tumorales también ha mostrado correlaciones con datos clínico-patológicos principalmente con la etapa clínica^{62,63}. En cáncer de colon se demostró una correlación entre la alta expresión de RNAm de gelatinasa A y el menor grado de diferenciación histológica del carcinoma⁶⁴. Sin embargo, no existen reportes que documenten la secreción de MMPs y las correlaciones con datos clínico-patológicos en pacientes con Ca CU.

MATERIAL Y METODOS

A. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE EXPLANTES DE CERVIX UTERINO POR LA TECNICA DE HISTOCULTIVO.

1. INFLUENCIA DEL SOPORTE DE GELATINA "GELFOAM" EN LA SECRECION DE GELATINASAS.

Se realizaron ensayos previos para verificar si la presencia del soporte de gelatina alteraba la secreción de gelatinasas. Para ello se realizaron 6 cultivos de biopsias de Ca CU, se obtuvieron 2 explantes por cada una y se sometieron a cultivo de la siguiente manera: el primero sobre soporte de gelatina y el segundo sobre una superficie plana de membrana de policarbonato (Insert, COSTAR). Los 12 explantes se sembraron sobre fragmentos de 0.8 cm³ de gelatina estéril (GELFOAM, UPJOHN) como soporte tridimensional (previamente hidratados en el mismo medio de cultivo), en cajas de Petri de 5 cm de diámetro y con 8 ml de medio RPMI-1640 (GIBCO), sin rojo fenol y suplementado con aminoácidos no esenciales 500X (diluídos 1:100, GIBCO), L-glutamina (292 µg/ml, GIBCO), penicilina-G (32 µg/ml, SIGMA), estreptomicina (50 µg/ml, SIGMA), gentamicina (50 µg/ml, SHERAMEX) y fungizona (250 ng/ml, SIGMA), durante 48 h a 37° C con una atmósfera de CO₂/aire. Se evaluaron para la presencia de contaminación por la aparición de turbidez en el medio durante el cultivo.

2. INFLUENCIA DEL SUERO FETAL BOVINO EN LA SECRECION DE GELATINASAS.

Doce explantes de Ca CU, provenientes de 6 biopsias de pacientes se sometieron a cultivo sobre soporte de gelatina, en las mismas condiciones de cultivo descritas sólo que se agregó suero fetal bovino (SFB) al 10% en el medio de cultivo. Al término, los sobrenadantes se colectaron y se congelaron a -70°C para ser concentrados por ultrafiltración. Por otro lado, se realizó una separación de gelatinasas del SFB. Cinco µl de SFB se

diluyeron en 45 μ l de PBS pH 7.4, se mezclaron con 20 μ l de la resina gelatina-agarosa (SIGMA) y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente, agitando suavemente cada 10 min. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada 5 min a 1500 Xg y se lavó 2 veces de la misma manera con 500 μ l de Tris 50 mM, pH 7.4. Finalmente, el botón con la resina y las gelatinas adsorbidas, se eluyeron después de una incubación con 20 μ l de buffer de muestra para zimograma (sin azul de bromofenol ni β -mercaptoetanol). Las gelatinas eluidas en el buffer de muestra se revelaron en zimogramas de gelatina: poliacrilamida al 8%-gelatina al 0.1%.

B. CONDICIONES FINALES DE HISTOCULTIVO DE EXPLANTES DE CERVIX UTERINO Y ANALISIS DE MMPs SECRETADAS.

1. OBTENCION DE BIOPSIAS DE CERVIX UTERINO CON LB Y Ca CU.

Se recibieron 26 muestras de cérvix uterino con LB, provenientes de piezas de histerectomías (por causas patológicas no neoplásicas: miomatosis uterina). Los productos de histerectomía fueron obtenidas por el Servicio de Cirugía, y las muestras de cérvix se obtuvieron del Depto. de Patología del Hospital General "Manuel Gea González". Por otro lado, se recibieron 49 biopsias de Ca CU (etapas clínicas IB a IV), provenientes de pacientes de primera vez del Servicio de Ginecología del INCa y vírgenes a cualquier tratamiento. Todas las muestras se recibieron en tubos de 50 ml con 15 ml de medio de transporte a 4° C, compuesto de medio de cultivo RPMI-1640, sin rojo fenol y suplementado con L-glutamina, penicilina-G, estreptomycin, gentamicina y fungizona. Para evitar problemas de contaminación durante el cultivo, las concentraciones de antibióticos correspondieron a tres veces más (3X) de las utilizadas convencionalmente en cultivo. Todas las muestras fueron registradas por número consecutivo, nombre del paciente, número de expediente, etapa clínica, tipo histopatológico. Siempre se confirmó por cortes histológicos en ambos tipos de explantes la presencia de fragmentos con más del 70% de epitelio, ya sea normal y/o con lesiones benignas (cervicitis, displasia). Los 49 casos de Ca CU se confirmaron como representativos (la evaluación histopatológica reveló la presencia de carcinoma en más del

70% de las biopsias) y se integraron al estudio, después del análisis de 65 casos recibidos inicialmente. Los 16 casos que fueron eliminados, presentaron menos del 50% de carcinoma en el explante sembrado.

2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE CERVIX UTERINO PARA HISTOCULTIVO.

Las biopsias con LB y Ca CU con ayuda de bisturí y pinzas estériles bajo flujo laminar, fueron liberadas de vasos sanguíneos y/o zonas de necrosis en 10 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfatos salina) pH 7.35 con antibióticos a concentraciones 3X. Finalmente fueron trasladadas a cajas Petri estériles con 4 ml de medio de cultivo RPMI-1640 y antibióticos a concentraciones 3X. En este medio, cada biopsia fue seccionada en fragmentos (explantes) de 4-5 mm³.

3. SIEMBRA DE LOS EXPLANTES EN SOPORTES TRIDIMENSIONALES.

Los explantes fueron sembrados en fragmentos de 0.8 cm³ de gelatina estéril (GELFOAM, UPIJOHN) como soporte tridimensional en las condiciones descritas en la sección IA.

4. COLECCION DE LOS SOBRENADANTES Y CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS.

Al término del cultivo, el medio de cada explante se congeló a -70°C. Posteriormente fue concentrado por ultrafiltración a 4° C, a través de membranas del sistema de AMICON y reteniendo las proteínas mayores de 10 kDa. La proteína contenida se cuantificó por el método de Bradford⁶⁵.

C. ZIMOGRAMAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA 8%-GELATINA 0.1%.

Se analizaron las gelatinasas secretadas de los siguientes ensayos:

A1. Influencia del soporte de gelatina "Gelfoam" en la secreción de gelatinasas.

A2. Influencia del suero fetal bovino en la secreción de gelatinasas.

B1. Secreción de MMPs por explantes de cérvix con LB y Ca CU.

Cuatro µg de la proteína concentrada de cada caso, fue sometida a zimogramas de gelatina para revelar la actividad gelatinolítica, de acuerdo a la técnica modificada de Marbaix³⁸ y cols. El volumen de proteína se mezcló con un volumen igual de buffer de muestra que consistió de buffer superior (0.5 M de Tris, 0.4% de SDS pH 6.8, 4 partes); glicerol (4 partes), SDS al 10% (1 parte) y agua bidestilada (1 parte). El gel concentrador o de entrada se preparó al 4% de concentración de poliacrilamida-*bis*-acrilamida en buffer superior. El gel de separación o de corrida consistió de poliacrilamida-*bis*-acrilamida al 8%, gelatina 0.1%, preparados en buffer inferior (1.5 M de Tris, 0.4% de SDS pH 8.8). La gelatina utilizada como sustrato fue tipo A 300 bloom (SIGMA). El buffer de corrida consistió de 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina y SDS al 1%, pH 8.3. Las electroforesis se llevaron a cabo en minigeles (0.75 X 140 X 70 mm) durante 40 min a temperatura ambiente y a 10 mA/gel. Al finalizar la corrida, los geles fueron lavados durante 20 min con Tritón X-100 al 2.5 % y a temperatura ambiente. Finalmente los geles fueron incubados en buffer TNC (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7.4) a 37° C durante 14-16 h. Las bandas de degradación se revelaron con una solución de azul de Coomassie (R250) al 0.1% preparada en ácido acético-metanol en proporción 3:1 durante 20 min, y fueron desteñidos con una solución de ácido acético-metanol-agua (1:1:8) durante 20 min a temperatura ambiente y con agitación. Se realizaron pruebas de activación de formas moleculares latentes en organomercurial: 1 mM de APMA. Los ensayos de activación se realizaron de la siguiente manera. El acetato p-aminofenilmercurio fue preparado 10 mM en solución de Tris 50 mM sin ajustar pH (alcalino). Posteriormente, el volumen de la proteína se mezcló con un volumen igual de Tris 50 mM, pH 7.4, y con 0.1 volumen de APMA, se

agitó suavemente y se incubó a 37° C durante 2 h. De esta manera, la concentración del APMA fue de 1 mM. Al término de la incubación, se mezcló con un volumen igual de buffer de muestra y se reveló en zimogramas de gelatina en las mismas condiciones descritas. Esta prueba se realizó a sobrenadantes de explantes tanto de LB como con Ca CU.

También se realizaron ensayos de actividad en otros inhibidores. Cuatro µg de proteína tanto de sobrenadantes de explantes con LB como con Ca CU se sometieron a zimograma de gelatina en las mismas condiciones descritas y, después del lavado en Tritón X-100 al 2.5%, los geles se incubaron en buffer de TNC-5mM de 1,10-fenantrolina, TNC-5 mM de N-etilmaleimida (NEM) y TNC-5 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF). Finalmente, los geles se revelaron de la misma manera que fue descrita anteriormente.

D. GELES DESNATURALIZANTES DE SOBRENADANTES DE EXPLANTES DE Ca CU.

Cinco µg de proteína del sobrenadante se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes, de acuerdo a la técnica de Laemmli⁶⁶. El volumen que contenía 5 µg de proteína, se mezcló con un volumen igual de buffer de Laemmli: 0.5 M de Tris, 0.4% de SDS pH 6.8; SDS 10%; azul de bromofenol-glicerol (2 µg/ml); β-mercaptoetanol al 99%. Posteriormente se sometieron a calentamiento durante 1 min en baño de agua. Al término, se centrifugaron 10 min a 12 000 X g y se aplicaron al gel concentrador que consistió 4% de poliacrilamida-bisacrilamida, y el gel separador al 10% de la misma mezcla. Las condiciones de corrida fueron exactamente iguales a las de los zimogramas de gelatina con la omisión obviamente del sustrato (gelatina). Finalmente, los geles se tñieron en la misma solución de azul de Coomassie y se destñó en las mismas condiciones descritas.

E. ZIMOGRAMAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA 10%-CASEINA 0.1%.

Para describir la presencia de MMPs no gelatinasas (por ejemplo estromelisin y colagenasa intersticial), se realizaron zimogramas de caseína en las mismas condiciones

descritas para los zimogramas de gelatina, con las modificaciones siguientes: poliacrilamida al 10% de concentración y caseína 0.1%. La caseína se preparó de acuerdo a Muskin y Soreq⁶⁷. El sustrato se disolvió en PBS pH 7.4 a una concentración de 15 mg/ml. La solución de PBS se calentó hasta el punto de ebullición, inmediatamente se agregó la caseína y se dejó hervir durante 20 min. Posteriormente se dejó enfriar y el sobrenadante se colectó para la cuantificación de proteína por el método de Bradford⁶⁵. La caseína utilizada fue α -caseína de leche bovina (SIGMA). Para confirmar la naturaleza de las MMPs se realizaron zimogramas y se incubaron en inhibidores de metaloproteinasas como 1,10-fenantrolina (10 mM), así como en NEM (10 mM) y en PMSF (10 mM).

F. ANALISIS MORFOLOGICO DE LOS EXPLANTES DE CERVIX UTERINO.

Todos los explantes se fijaron en formalina al 10% preparada en solución de PBS pH 7.4 durante 24 h. Al término, los tejidos se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en parafina. Finalmente se analizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina por el Dr. Ricardo Delgado Chávez, Jefe del Departamento de Patología Experimental del INCan. Sus reportes documentaron la presencia de epitelio representativo en los 26 explantes sembrados de LB así como la presencia de Ca CU en los 49 explantes del otro grupo.

G. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR DENSITOMETRIA.

Los zimogramas fueron leídos en un densitómetro para cuantificar directamente la actividad enzimática, con ayuda de un espectrofotómetro Beckman DU 650 y expresarla en unidades densitométricas. Las gelatinasas y caseinasas se determinaron de acuerdo a su movilidad relativa y capacidad para responder a las pruebas bioquímicas y/o en diferentes sustratos.

H. DATOS CLINICO-PATOLOGICOS DE LAS PACIENTES Y EVALUACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS.

Se revisaron todos los expedientes clínicos para formar la base de datos del grupo de pacientes (Ca CU):

- a). Etapa clínica.
- b). Tipo histopatológico.
- c). Estado hormonal.
- d) Respuesta a tratamiento.

Se determinaron las medianas (como medida de tendencia central) de actividad gelatinolítica en unidades densitométricas en cada caso, y se agruparon de la siguiente manera:

1. Análisis de las dos formas moleculares de las gelatinasas A y B, así como de la estromelisin-1, secretadas por explantes tanto de LB como de Ca CU.
2. Análisis de las gelatinasas A y B, y estromelisin-1 en sus dos formas moleculares, de acuerdo a los datos clínico-patológicos de las pacientes con Ca CU:

- a) Etapa clínica: I, II, III y IV.
- b) Tipo histopatológico: Carcinoma epidermoide, carcinoma adenoescamoso y adenocarcinoma.

Carcinoma epidermoide:

b1) Células grandes no queratinizante.

b2) Células grandes queratinizante.

- c) Estado hormonal: menstruantes, menopausicas.
- d) Respuesta al tratamiento, principalmente posradioterapia:

No respuesta: Persistencia y/o progresión tumoral, metástasis.

Respuesta: Control del primario y ausencia de metástasis.

Las diferencias en las medianas de cada grupo se evaluaron con la prueba de "U" de Mann-Whitney y se consideraron estadísticamente significativas para un valor de p menor de 0.05. También se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para verificar si las

tendencias en las medianas guardaban alguna relación con los datos clínicos.

RESULTADOS

A. INFLUENCIA DEL SOPORTE DE GELATINA "GELFOAM" EN LA SECRECIÓN DE GELATINASAS.

Se sabe que el microambiente que se encuentra alrededor de las células tumorales, establece una serie de señales capaces de manifestar un tipo de respuesta biológica. Por esta razón, se realizaron los ensayos para evaluar si el soporte de Gelfoam era capaz de generar algún tipo de señal, medido por las gelatinasas secretadas. Los resultados no mostraron diferencias notables en la secreción de gelatinasas A y B (figuras 2 y 3), tanto en los explantes sembrados con y sin soporte.

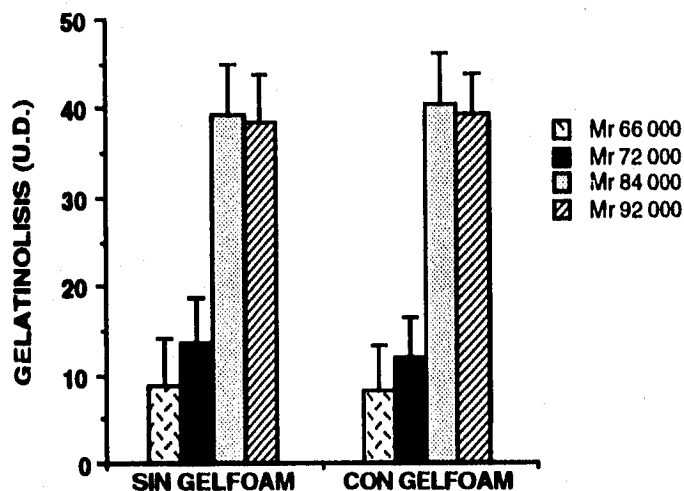


FIGURA 2. Gelatinasas A (*Mr* 66 kDa y 72 kDa) y B (*Mr* 84 kDa y 92 kDa) secretadas por explantes de Ca CU, sembrados en presencia y ausencia de Gelfoam. Se ilustra x de 6 explantes en cultivo \pm d.e. U.D.= lectura espectro X factor de conversión.

La diferencia no fue significativa, pero macroscópicamente fue patente la conservación del explante tumoral, integrado durante todo el tiempo de cultivo cuando se sembró con soporte de Gelfoam. En el otro grupo de explantes tumorales (sembrados en ausencia de soporte), se observó la tendencia a la disgregación y en algunos casos hasta la

generación de suspensiones celulares. Este hecho marcó una ventaja importante en sembrar explantes con el soporte de gelatina.

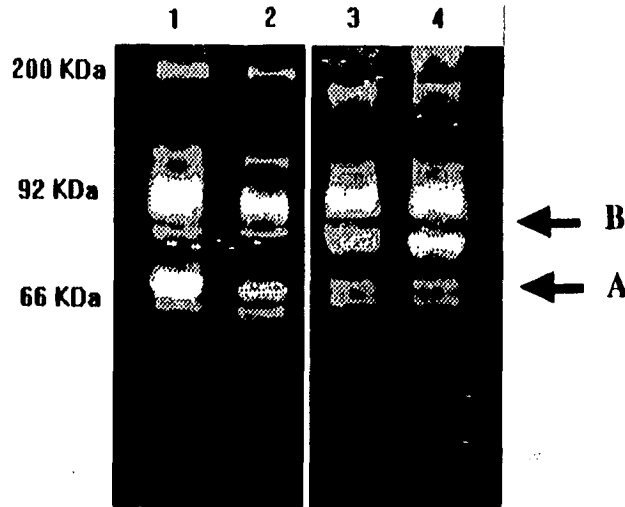


FIGURA 3. Zimogramas de gelatina de sobrenadantes de explantes con Ca CU sembrados en presencia de gelfoam (carriles 1 y 3) y en ausencia del mismo (carriles 2 y 4). Se indica la presencia de gelatinasa A (A) y gelatinasa B (B). En cada carril se aplicaron 4 μ g de proteína secretada.

B. INFLUENCIA DEL SUERO FETAL BOVINO EN LA SECRECIÓN DE GELATINASAS.

Tradicionalmente, los métodos *in vitro* se han caracterizado por utilizar el SFB al 10% de concentración como inductor de proliferación. Sin embargo, a pesar de que se reconoce la presencia tanto de inhibidores de proteinasas como de proteinasas en él, todavía algunos autores utilizan al SFB como suplemento para mantener el cultivo celular en proliferación. Al incubar 5 ml de SFB (diluido 1:10) en resina de gelatina-agarosa como fue descrito en material y métodos, las proteínas adsorbidas revelaron actividad gelatinolítica principalmente de 92 kDa. De esta manera, el patrón observado en la figura 5 podría deberse a las gelatinasas del SFB. Por esta razón, todos los explantes se sembraron en ausencia de SFB. Los resultados también mostraron diferencias importantes en la secreción de las formas moleculares de 72 kDa y 84 kDa. Las diferencias en las cantidades de estas tres formas

moleculares entre explantes sembrados con y sin SFB fueron estadísticamente significativas ($p < 0.02$). La figura 4 ilustra bien este hecho.

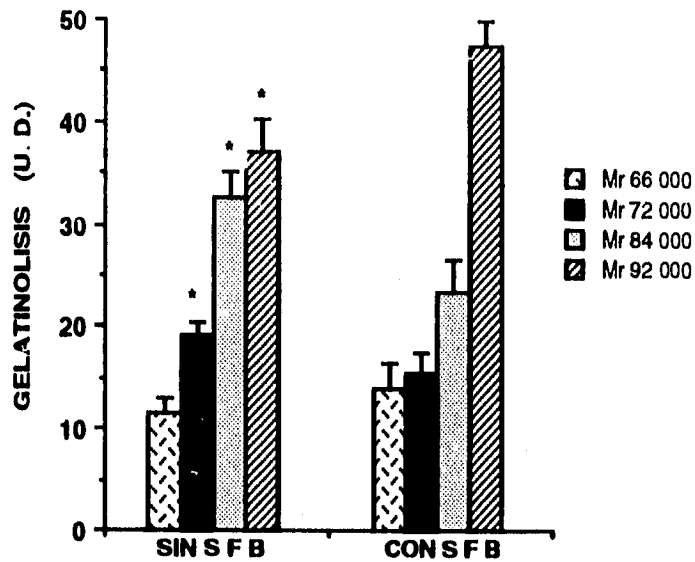


FIGURA 4. Gelatinas A (*Mr* 66 kDa y 72 kDa) y B (*Mr* 84 kDa y 92 kDa) secretadas por explantes de Ca CU, sembrados en presencia y ausencia de SFB. Los asteriscos indican diferencias significativas, $p < 0.02$. Se ilustra x de 6 explantes en cultivo \pm d.e. U.D.= lectura espectro X factor de conversión.

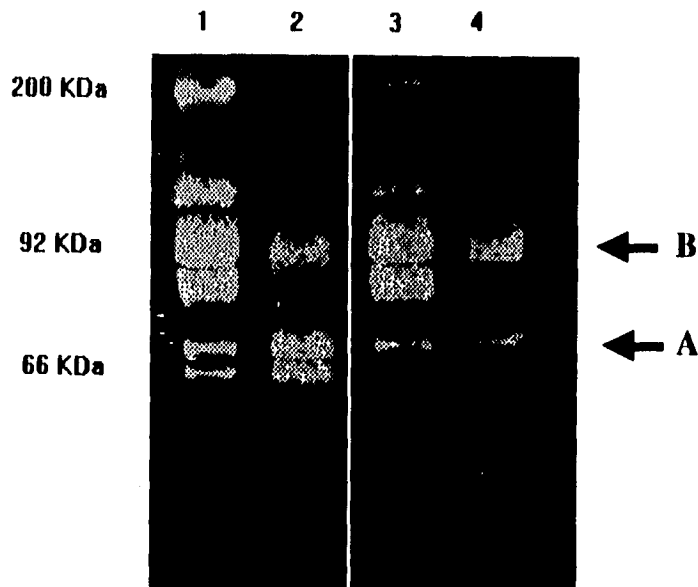


FIGURA 5. Zimogramas de gelatina de sobrenadantes de explantes con Ca CU sembrados en presencia de SFB (carriles 2 y 4) y en ausencia del mismo (carriles 1 y 3). Se indica la presencia de la gelatinasa A (A) y gelatinasa B (B). En cada carril se aplicaron 4 μ g de proteína secretada.

C. ANALISIS MORFOLOGICO DE LOS EXPLANTES DE CERVIX UTERINO.

Finalmente, el análisis morfológico de los casos con LB reveló tanto la presencia de epitelio con lesiones mínimas como cervicitis crónica y/o lesiones epiteliales tipo displasias leves a severas. En los explantes de cérvix con Ca CU, se colectaron 65 muestras tumorales, sin embargo después del análisis morfológico se descartaron 16 casos. En estos, los cortes ilustraron escasas zonas de carcinoma por lo que se eliminaron en el análisis final. Todos los casos con Ca CU siempre mostraron representatividad de epitelio neoplásico: más del 70% (figura 6) y una excelente conservación de los elementos histomorfológicos del mismo.

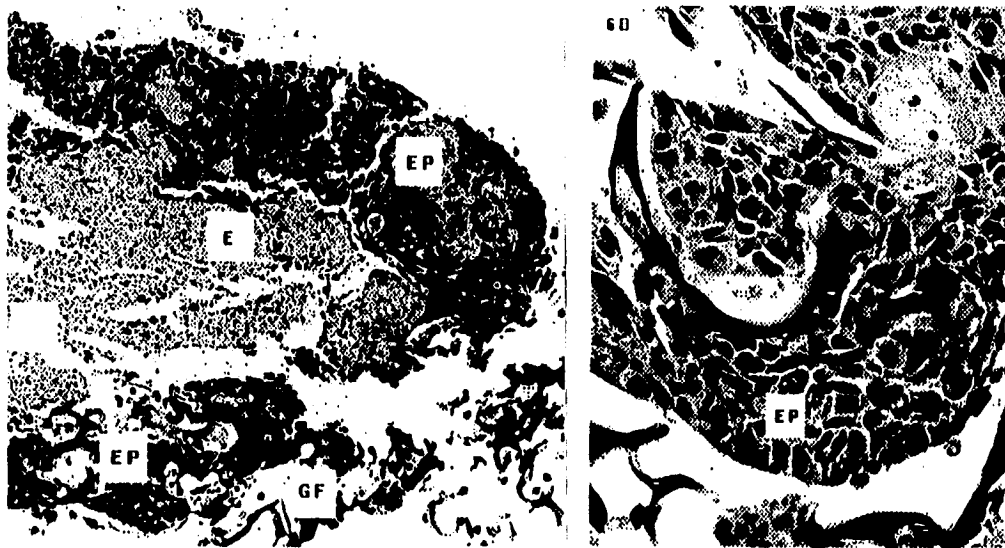


FIGURA 6. Cortes histológicos de explantes con Ca CU sembrados durante 48 h mediante la técnica de histocultivo. 6A. En este corte a bajo aumento se aprecia el Gelfoam (GF), epitelio neoplásico (EP) y el estroma (E), 160X. 6B. Se aprecian células en división (flechas) así como fibras de Gelfoam y epitelio neoplásico diferenciado, 400X.

De esta manera, se realizaron los cultivos de las 26 muestras de cérvix con LB y en las 49 con Ca CU como se describió en material y métodos: sin SFB ni rojo fenol y en soporte de gelatina. Se utilizó a la mediana como medida de tendencia central (por la dispersión de los datos), así como la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney para evaluar las diferencias entre grupos.

D. ANALISIS DENSITOMETRICO DE LAS GELATINASAS A Y B SECRETADAS POR EXPLANTES DE CERVIX.

La figura 7 ilustra la distribución de todos los casos tanto de LB como de Ca CU para las 2 formas moleculares de la gelatinasa A. Las cantidades de la forma molecular de 66 kDa fueron: 13.53 y 6.0 para los explantes de LB y Ca CU, respectivamente. Como también

son patentes las diferencias en las cantidades de la forma molecular de 72 kDa, y elevada para el grupo de LB (190.5 vs 18.0 para explantes de Ca CU); sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

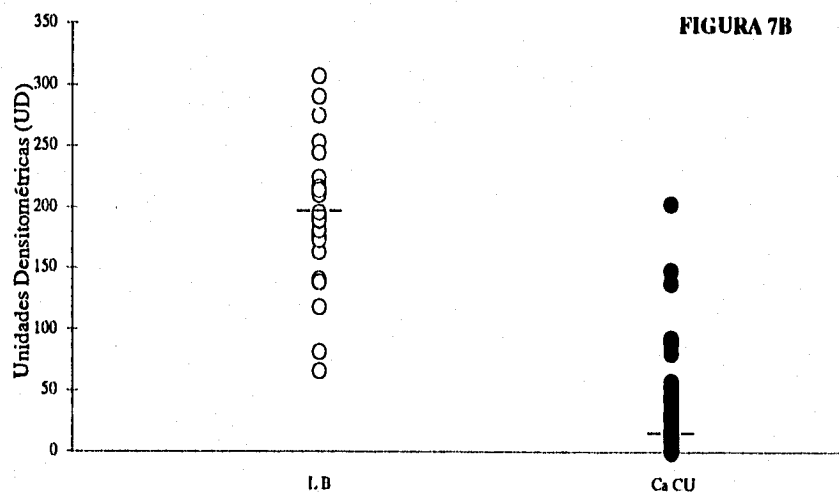
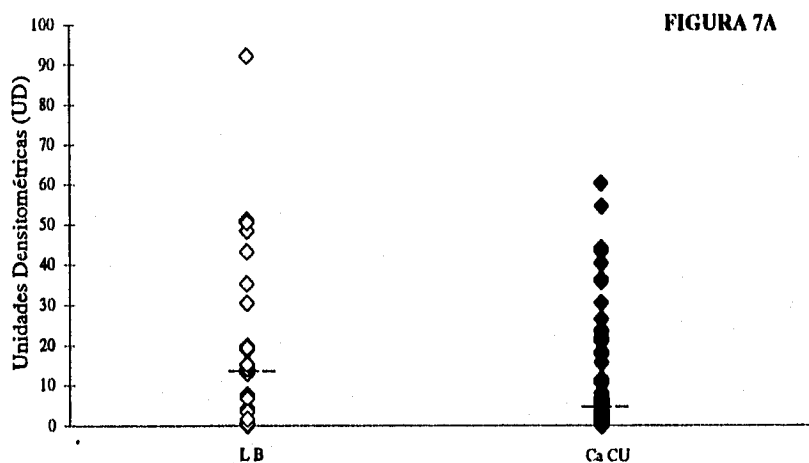


FIGURA 7. Distribución de los casos con LB y Ca CU, para ambas formas de la gelatinasa A secretada en cultivo: 66 kDa (Figura 7A) y 72 kDa (figura 7B). Las barras horizontales representan la mediana en cada grupo.

La figura 8A ilustra las cantidades elevadas de la forma de 84 kDa (forma activa de la enzima) por el grupo de explantes con Ca CU (44.36) en comparación al grupo de LB (0.0). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.005$). Una misma tendencia se observó para la forma molecular de 92 kDa (forma latente de la enzima, figura 8B). Las cantidades fueron de 146.3 y 55.22 para el grupo de Ca CU y LB, respectivamente; estas diferencias también fueron significativas ($p < 0.03$).

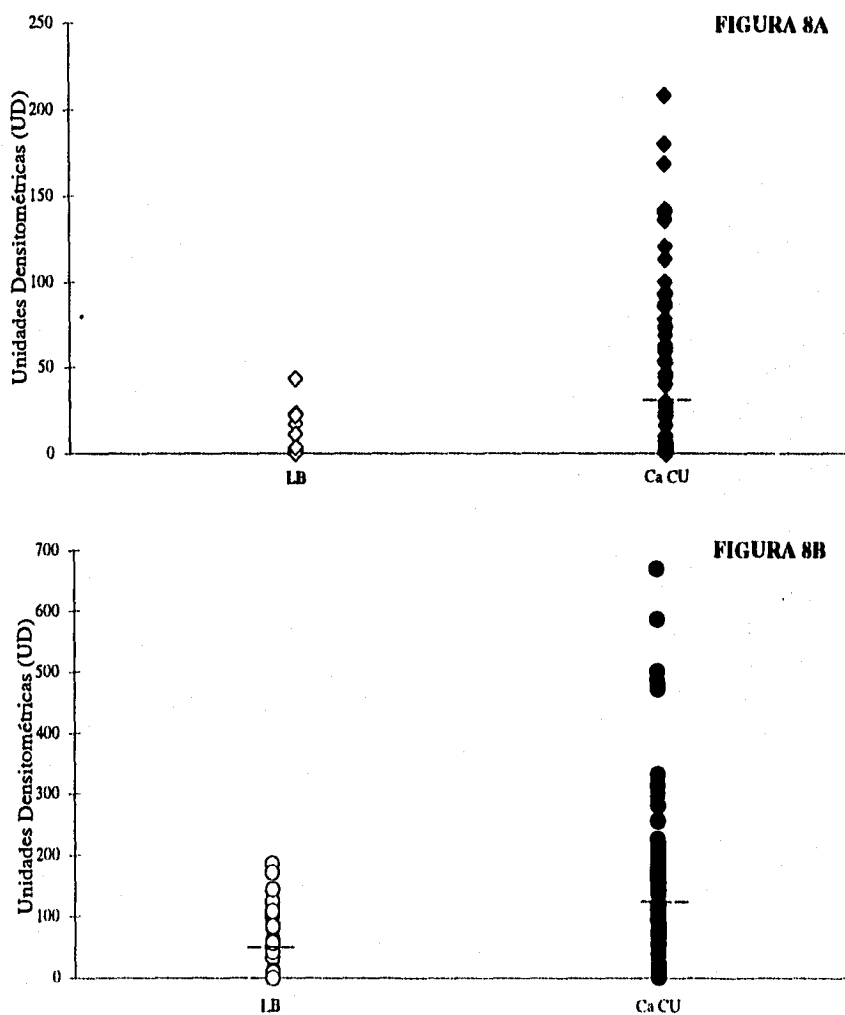
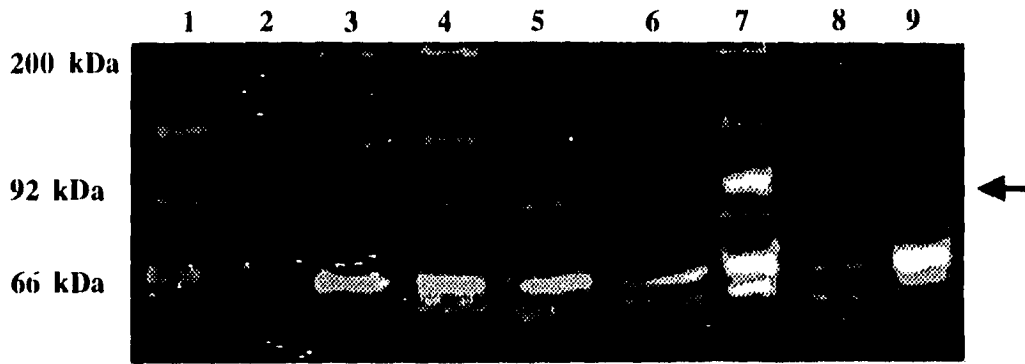
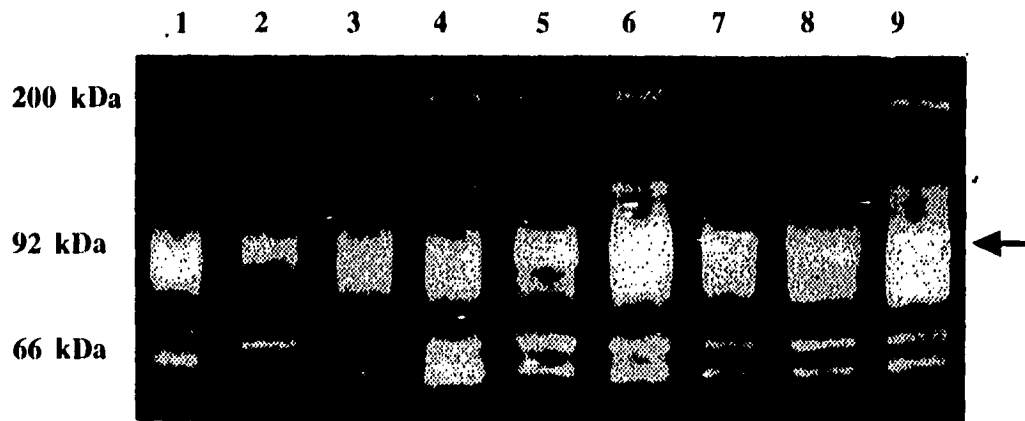


FIGURA 8. Distribución de los casos con LB y Ca CU, para ambas formas de la gelatinasa B secretada en cultivo: 84 kDa (figura 8A) y 92 kDa (figura 8B). Las barras horizontales representan la mediana en cada grupo.

Se pueden observar en los zimogramas las gelatinasas secretadas tanto por explantes de LB (figura 9A) como de explantes con Ca CU (figura 9B).



9A



9B

FIGURA 9. Zimogramas de gelatina de sobrenadantes de explantes con LB (carriles 1-9, figura 9A) y con Ca CU (carriles 1-9, figura 9B). En cada carril se aplicaron 4 μ g de proteína secretada por ambos tipos de cérvix. Son notables las diferencias entre ambos grupos, principalmente la forma latente de la gelatinasa B (92 kDa, flecha) para el caso de explantes con LB.

E. PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LAS GELATINASAS SECRETADAS POR EXPLANTES DE CERVIX.

Todas las pruebas bioquímicas revelaron que estas gelatinasas pertenecieron al grupo de las metaloproteinasas dependientes de Zn^{2+} : inhibición frente a 5mM de 1,10-fenantrolina (figura 10A). También se ilustra la activación de formas latentes en presencia de 1 mM de APMA (figura 10B).

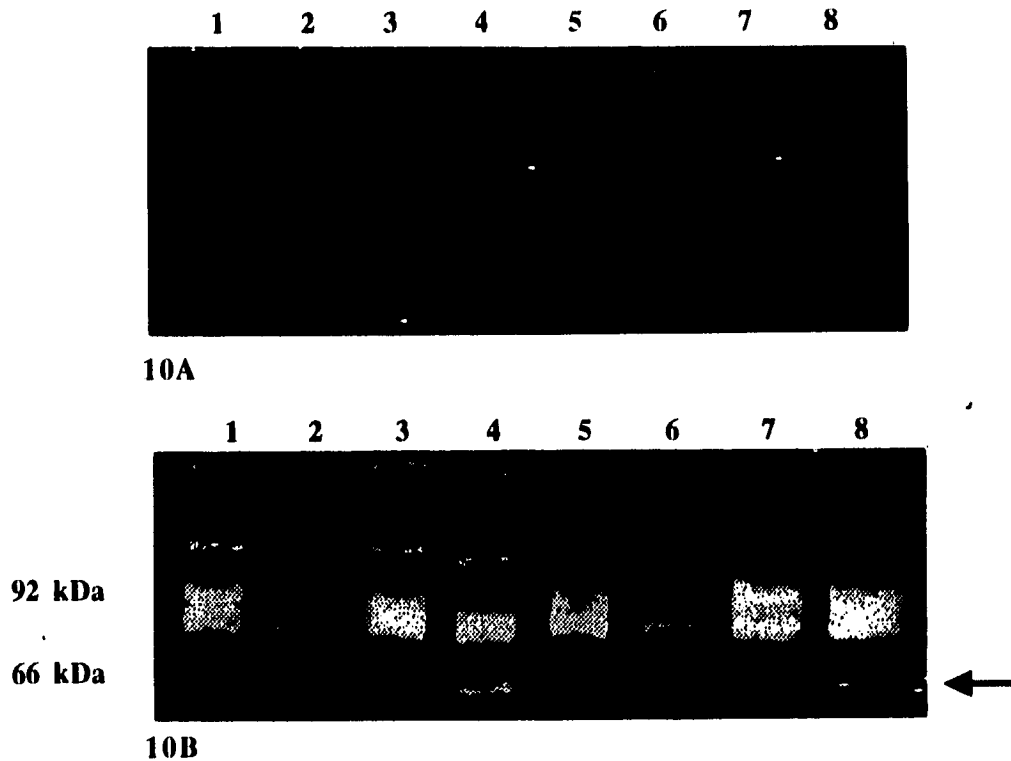
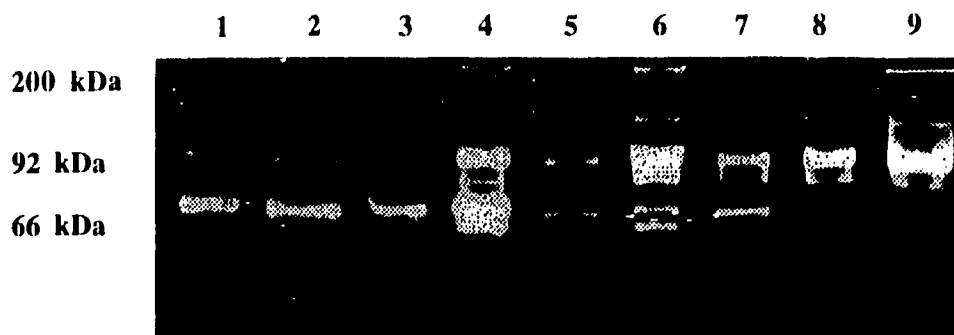
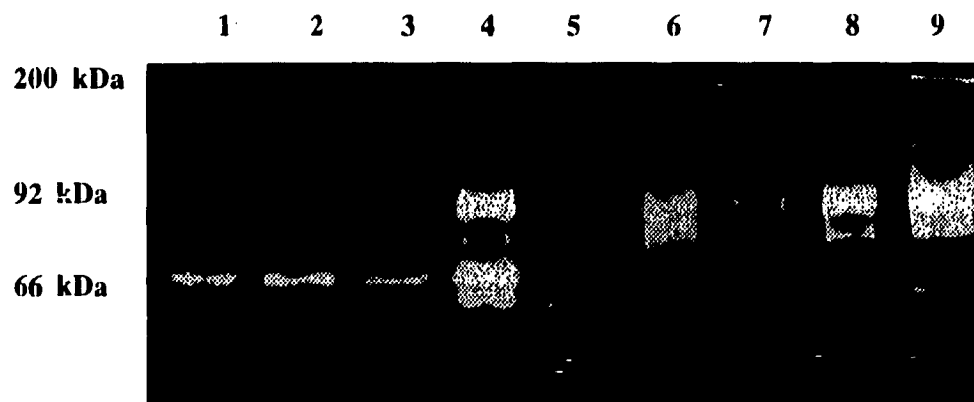


FIGURA 10. Zimogramas de gelatina de sobrenadantes de explantes de cérvix. En cada carril se aplicaron 4 μ g de proteína secretada. 10A. Zimograma de gelatina revelado en presencia de 5 mM de 1,10-fenantrolina (carriles 1-3, sobrenadantes de explantes con LB; Carriles 4-8, sobrenadantes de explantes con Ca CU). 10B. Zimograma de gelatina que revela sólo la presencia de formas activas (carriles 2, 4, 6, y 8) en presencia de 1 mM de APMA, después de 2 h de incubación a 37° C (flecha). Los carriles 1, 3, 5 y 7 representan muestras que no fueron expuestas a organomercurial. Todos los sobrenadantes fueron de explantes con Ca CU.

La actividad gelatinolítica no fue inhibida frente a 5mM de NEM (figura 11A) y 5 mM de PMSF (figura 11B). Ambos no son inhibidores específicos de MMPs.



11 A



11 B

FIGURA 11. Zimogramas de gelatina de sobrenadantes de explantes tanto con LB (carriles 1 al 3) como con Ca CU (carriles 4 al 9). En cada carril se aplicaron 4 μ g de proteína secretada por ambos tipos de cérvix. 11A. Zimograma de gelatina revelado en presencia de 5 mM de NEM. 11B. Zimograma de gelatina revelado en presencia de 5 mM de PMSF. Ambos inhibidores no son específicos de MMPs.

F. CORRELACIONES ENTRE LA PRESENCIA DE INFILTRADO INFLAMATORIO EN LOS EXPLANTES CON Ca CU Y LAS CANTIDADES DE GELATINASAS A Y B SECRETADAS.

Se evaluaron los cortes histológicos de los 49 explantes con Ca CU sembrados, con el objeto de verificar la presencia de células mononucleares (infiltrado inflamatorio). Se sabe que estas células pueden secretar gelatinasa B. Como se aprecia en el cuadro 2, el subgrupo de 12 explantes sin la presencia de infiltrado inflamatorio fue el que presentó las cantidades mayores de ambas formas de la gelatinasa B. Al compararse las cantidades de este subgrupo con los demás subgrupos, ninguna diferencia fue significativa ($p > 0.12$).

CUADRO 2. GELATINASAS A Y B SECRETADAS POR EXPLANTES DE Ca CU, DE ACUERDO A LA PRESENCIA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LOS EXPLANTES TUMORALES¹.

PRESENCIA DE INFLAMACION	n	GELATINASA A		GELATINASA B	
		66 kDa	72 kDa	84 kDa	92 kDa
0	12	2.1	8.5	93.5	226.5
+	12	7.4	41.0	35.1	156.0
++	15	7.8	17.1	73.0	183.6
+++	10	3.3	10.1	23.0	72.6

1. Se expresan como medianas de unidades densitométricas.

0. Ausencia de células inflamatorias.

+. Presencia de hasta 20 células inflamatorias por campo a 160.

++. Presencia de hasta 40 células inflamatorias por campo a 160.

+++. Presencia de más de 40 células inflamatorias por campo a 160.

G. GELATINASAS A Y B SECRETADAS POR EXPLANTES DE CERVIX UTERINO. PRINCIPALES CORRELACIONES CON DATOS CLINICO-PATOLOGICOS.

Al revelar las diferencias en la secreción tanto de la gelatinasa A como de la B entre ambos tipos de cérvix, se procedió a realizar las correlaciones con los datos clínico-patológicos de los casos con Ca CU. En el cuadro 3 se muestran las cantidades de ambas formas moleculares de las gelatinasas A y B, de acuerdo a la etapa clínica, tipo histopatológico, subtipos de carcinomas epidermoides, estado hormonal y respuesta a la radioterapia. Se compararon las cantidades de los subgrupos de etapas II, III y IV contra el subgrupo I. Ninguna diferencia fue significativa ($p > 0.2$). Se puede observar una relación directa entre las cantidades de ambas formas de la gelatinasa A y la etapa clínica de las pacientes. Se procedió a evaluar si esta tendencia guardaba una relación directa, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. No se observó una relación en las cantidades observadas tanto en la forma de 66 kDa ($p=0.12$) y 72 kDa ($p=0.39$) de la MMP-2 así como de la forma de 84 kDa ($p=0.54$) de la MMP-9. Son patentes las cantidades elevadas en las 2 formas moleculares de la gelatinasa B en los carcinomas adenoescamosos, seguido por los carcinomas epidermoides. Finalmente, de manera general se observaron cantidades menores de esta gelatinasa secretada por explantes con adenocarcinoma. Las comparaciones en las cantidades de cada forma molecular de las gelatinasas, entre el grupo con carcinoma epidermoide y los 2 grupos restantes no fueron significativas ($p > 0.1$). En el cuadro 3 se puede observar que los carcinomas epidermoides queratinizantes secretaron cantidades mayores de ambos tipos de gelatinasas. Excepto por la forma molecular de 92 kDa de la gelatinasa B, las pacientes menstruantes presentaron cantidades mayores de las formas moleculares de 66, 72 y 84 kDa. Ninguna de estas diferencias fueron significativas ($p > 0.01$).

CUADRO 3. GELATINASAS A Y B SECRETADAS POR EXPLANTES DE CERVIX UTERINO. CORRELACIONES CLINICO-PATOLOGICAS¹.

	<i>n</i>	<i>GELATINASA A</i>		<i>GELATINASA B</i>	
		<i>66 kDa</i>	<i>72 kDa</i>	<i>84 kDa</i>	<i>92 kDa</i>
CERVIX L B	26	13.5	190.5	0.0	55.2
CERVIX Ca CU:					
ETAPA CLINICA					
I	7	1.0	5.2	27.0	174.4
II	11	2.3	17.5	45.5	198.0
III	25	7.8	27.1	44.3	112.0
IV	5	23.2	34.0	74.1	162.5
FINC*	1	35.7	10.5	29.5	147.1
TIPO HISTOPATOLOGICO					
EPIDERMOIDE	38	6.5	19.0	43.3	130.2
ADENOCAMOSO	7	4.6	10.6	87.1	162.5
ADENOCARCINOMA	4	3.4	28.0	18.0	27.4
SUBTIPOS DE CARCINOMA EPIDERMOIDE					
NO QUERATINIZANTE	31	6.0	18.0	29.6	116.0
QUERATINIZANTE	7	13.6	24.1	60.6	166.2
ESTADO HORMONAL					
MENOPAUSICA	33	6.0	17.0	40.1	147.1
MENSTRUANTE	16	13.5	23.0	71.4	128.5
RESPUESTA AL TRATAMIENTO					
RESPUESTA	22 (45.5%)	6.0	18.4	50.2	188.6
NO RESPUESTA	11 (22.0%)	4.6	10.6	44.3	147.0

1. Se expresan como medianas de unidades densitométricas.

*. Paciente operada fuera del INCAn.

De los 49 casos con Ca CU estudiados, 16 casos (32.5%) no están en seguimiento (pacientes perdidas). De los 33 casos restantes (67.5%), 11 pacientes (22%) no respondieron (NR) al tratamiento. De este subgrupo de NR, la presentación de las etapas clínicas fue la siguiente: II, 3 casos; III, 6 casos; IVB, 1 caso; tratado fuera del INCAN, 1 caso. Ocho pacientes fueron menopausicas. Cuatro casos fueron carcinoma adenoescamoso: 3 fueron menopausicas y una fue menstruante. Los 7 casos restantes tuvieron diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide no queratinizante. El tiempo promedio, posterior al término del tratamiento y a la aparición de progresión y/o persistencia y/o metástasis fue de 4.6 meses (con un intervalo de 1 mes-12 meses). El manejo en los casos con persistencia y/o metástasis fue con quimioterapia, a base de VP-16-213, *cis*-platino y/o navelbine. El último subgrupo de 22 casos (45.5%) con respuesta (R) al tratamiento, la distribución por etapa clínica fue de la siguiente manera: I, 6 casos; II, 6 casos; III, 9 casos; IV, 1 caso. Tres de cuatro casos con tipo histopatológico de adenocarcinoma pertenecieron a este grupo. Un dato que llamó la atención es el hecho de que dos casos con carcinoma adenoescamoso y etapas clínicas III y IV pertenecieron a este grupo. Los demás casos fueron del tipo epidermoide. En 8 casos, las pacientes fueron menstruantes y el resto menopausicas. El tiempo promedio de seguimiento posradioterapia en este grupo fue de 14.5 meses (intervalo de 2-19 meses). En el cuadro 3 se ilustran las cantidades de gelatinasas secretadas de acuerdo a la respuesta al tratamiento. Se puede observar que las pacientes que respondieron a la radioterapia, presentaron medianas mayores de gelatinasas secretadas que las que no respondieron. Estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.2$).

H. OBSERVACION Y POSIBLE NATURALEZA DE BANDAS DE ALTO PESO MOLECULAR EN GELES DESNATURALIZANTES.

Durante el análisis zimográfico fueron patentes gelatinasas de alto peso molecular: 130/140 kDa, 170/180 y 200 kDa. Se ha propuesto que estas formas moleculares pueden corresponder a dímeros ó trímeros de las gelatinasas A y B⁶⁸⁻⁶⁹. Cuando una muestra de sobrenadante se preparó con buffer de Laemmli (conteniendo β -mercaptoetanol, dodecil

sulfato de sodio y azul de bromofenol, además de hervir 1 min la muestra en baño María) para gel desnaturizante, y se comparó con una muestra preparada con buffer de muestra para zimograma (conteniendo sólo dodecil sulfato de sodio), se observó la desaparición (figura 5, carriles 1, 2, 3) de bandas de alto peso molecular (de más de 100 kDa). Esto sugiere que estas bandas correspondieron a oligomerizaciones de ambas gelatinasas.

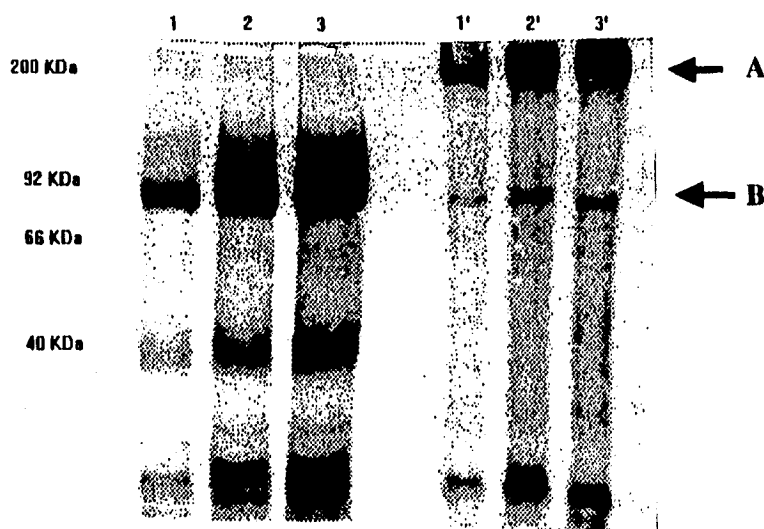


FIGURA 5. Gel desnaturizante de sobrenadante de explante tumoral, tratado con buffer de Laemmli (1, 2 y 3); se aprecia la desaparición de bandas de 200 kDa (A). Sobrenadantes tratados con buffer de muestra (1', 2' y 3'); es evidente la disminución de bandas de 87-90 kDa (B). Se ilustran diferentes cantidades de proteína: 2.5, 5.0 y 7.5 µg en los carriles 1 y 1'; 2 y 2'; 3 y 3', respectivamente.

I. SECRECIÓN DE GELATINASAS DE ALTO PESO MOLECULAR POR EXPLANTES DE CERVIX.

Finalmente, el análisis de gelatinasas de alto peso molecular se realizó tanto en los sobrenadantes de explantes de cérvix con LB como en aquellos provenientes de Ca CU (figura 12). Las cantidades de la banda de 140 kDa fueron de 0.0 y 3.23, para las muestras con LB y Ca CU, respectivamente. Para la banda gelatinolítica de 200 kDa, las cantidades

fueron de 0.035 y 6.3, respectivamente, para los explantes con LB y con Ca CU. Las diferencias en las cantidades de ambas gelatinasas fueron significativas ($p < 0.025$ y $p < 0.01$, respectivamente).

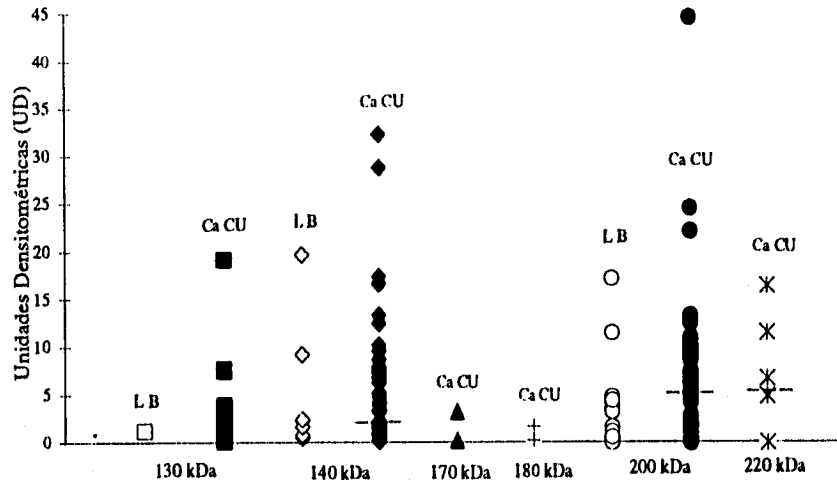


FIGURA 12. Distribución de los casos con LB y Ca CU, para formas de gelatinasas de alto peso molecular. Se indican las diferentes movilidades relativas. Las barras horizontales representan la mediana en cada grupo.

J. ANALISIS DE ESTROMELISINA-1 SECRETADA POR EXPLANTES DE CERVIX.

Del análisis de las proteinasas que degradaron caseína, se determinaron las medianas de degradación y las movilidades relativas. Como se describió anteriormente, en este sustrato se puede determinar la presencia de estromelisin^{11,38}. Algunas de las movilidades obtenidas fue de un par de bandas con pesos de 52 y 60 kDa que nunca aparecieron en zimogramas de gelatina. Estas bandas de degradación respondieron a la inhibición frente a 10 mM de 1,10-fenantrolina y permanecieron sin inhibición frente a 10 mM de NEM y 10 mM de PMSF. De esta manera, este par de proteinasas parecen corresponder a la forma activa y latente (respectivamente) de la estromelisin-1. De esta manera se procedió a determinar la distribución de los casos tanto con LB como con Ca CU. (figura 13). Las cantidades de la forma de 52 kDa del grupo de explantes con LB y con Ca

CU fueron: 9.9 y 11.7, respectivamente. Las cantidades de la forma de 60 kDa fueron de 8.1 y 10.6, respectivamente para el grupo de explantes con LB y Ca CU. Estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.1$).

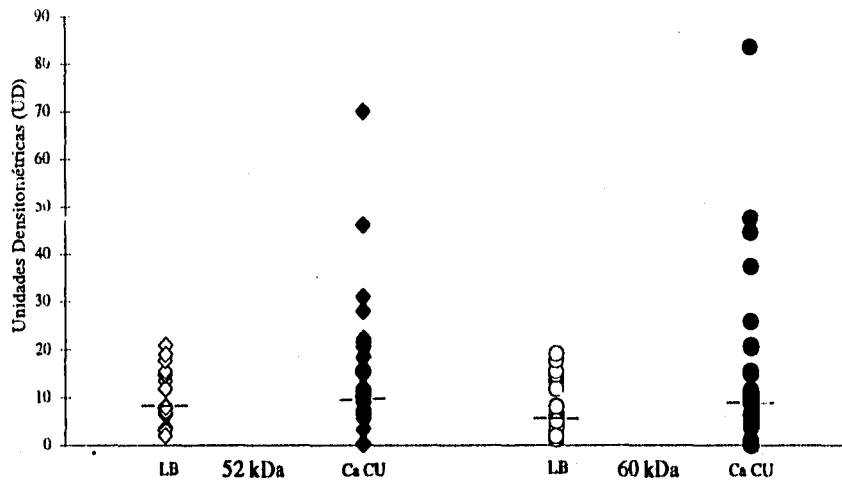


FIGURA 13. Distribución de los casos con LB y Ca CU, para ambas formas de la estromelisin-1 (52 kDa y 60 kDa) secretada en cultivo. Las barras horizontales representan la mediana en cada grupo.

K. CORRELACIONES ENTRE LOS NIVELES DE ESTROMELISINA-1 Y DATOS CLINICO-PATOLOGICOS

Posteriormente, se realizaron las correlaciones entre los datos clínico-patológicos de las pacientes y las cantidades de ambas formas de estromelisin-1. Las cantidades de estromelisin-1 distribuidas de acuerdo a la etapa clínica no revelaron datos importantes o alguna tendencia en particular (Cuadro 7).

CUADRO 7. ESTROMELISINA-1 SECRETADA POR EXPLANTES DE CERVIX UTERINO. CORRELACIONES CLINICO-PATOLOGICAS¹.

	<i>n</i>	<i>FORMAS MOLECULARES</i>	
		<i>52 kDa</i>	<i>60 kDa</i>
CERVIX L B	26	9.9	8.1
CERVIX Ca CU:			
TIPO HISTOPATOLOGICO			
EPIDERMOIDE	38	0.18	0.9
ADENOESCAMOSO	7	4.0	10.0
ADENOCARCINOMA	4	3.4	3.2
ESTADO HORMONAL			
MENOPAUSICA	33	5.6	6.5
MENSTRUANTE	16	0.0	0.0
RESPUESTA AL TRATAMIENTO			
RESPUESTA	22	0.0	0.6
NO RESPUESTA	11	0.18	7.0

1. Se expresan como medianas de unidades densitométricas.

Sin embargo, cuando se realizaron las correlaciones de acuerdo al tipo histopatológico del carcinoma, fueron evidentes cantidades elevadas de ambas formas moleculares de la estromelisin-1 en los carcinomas adenoescamosos. El grupo de carcinomas epidermoides reveló cantidades menores de esta proteasa (cuadro 8). Los explantes de las pacientes menopausicas presentaron cantidades mayores que las secretadas por explantes de pacientes menstruantes. Finalmente, las pacientes que no respondieron al tratamiento mostraron cantidades elevadas para ambas formas de la estromelisin-1. Las diferencias en estos dos últimos grupos (estado hormonal y respuesta al tratamiento) no fueron significativas ($p > 0.05$).

J. ANALISIS DE CASEINASAS MENORES DE 30 kDa SECRETADAS POR EXPLANTES DE CERVIX. CORRELACION CON DATOS CLINICO-PATOLOGICOS.

Durante el análisis de los zimogramas de caseína, también se revelaron otras bandas de menor peso molecular. Algunas de ellas fueron

1. Un par con movilidades de 46 y 34 kDa.
2. Una banda de 28 kDa.
3. Tres bandas de 24, 22 y 20 kDa.

Se realizaron ensayos de exposición al inhibidor de metaloenzimas 1,10-fenantrolina, de cisteín-proteinasas (NEM) y de serín-proteinasas (PMSF). El par de bandas de *Mr* de 46 y 34 kDa fueron inhibidas con 10 mM de 1, 10-fenantrolina por lo que reveló su naturaleza de MMP. Por su *Mr* calculada y su comportamiento bioquímico, es posible que corresponda a la colagenasa intersticial ó MMP-1. Sólo 18 casos con Ca CU fueron positivos a este par de proteinasas y, entre los hallazgos importantes cabe destacar que 14 de los 18 explantes también secretaron estromelina-1. Es importante mencionar que 5/7 casos con tipo adenoescamoso no respondieron al tratamiento y presentaron este par de bandas. Estas mismas pacientes también fueron positivas a la presencia de las bandas de 52/60 kDa de estromelina-1. Diez de los 12 casos con tipo histológico de carcinoma epidermoide fueron del tipo no queratinizante. Sólo 5 casos de este grupo de carcinomas positivos a las bandas de 46/34 presentaron actividad tumoral, sin embargo también secretaron estromelina-1.

Cinco muestras de pacientes revelaron la presencia de una banda de 28 kDa. Esta banda fue inhibida en presencia de 10 mM de NEM, por lo que puede representar una cisteín-proteasa. Los datos importantes de hacer notar son los siguientes: 2/5 pacientes tuvieron diagnóstico de carcinoma adenoescamoso, los casos restantes fueron carcinomas epidermoides no queratinizantes. Cuatro de estas cinco pacientes no respondieron al tratamiento y se encuentran con actividad tumoral.

Finalmente, algunos zimogramas de caseína revelaron una banda de 26 kDa, cuando se cargaron 7.5 µg de proteína, pero cuando se cargó menos proteína (4 µg de proteína), esta banda desapareció y se revelaron 3 bandas con movilidades de 24, 22 y 20

kDa. Estas tres bandas fueron inhibidas con 10 mM de NEM, lo que puede sugerir su naturaleza de cisteín-proteasa y 21 casos fueron positivos a ellas. El cuadro 8 ilustra los datos importantes. Los casos con tipo adenocarcinoma presentaron las cantidades más elevadas que el resto del grupo, sin embargo al compararse con las cantidades de los 2 grupos restantes no revelaron ninguna diferencia significativa ($p > 0.1$). Otro hecho que llamó la atención fueron las cantidades elevadas en el grupo de pacientes menstruales que en las pacientes menopausicas, una tendencia similar observada del análisis obtenido de las gelatinasas. Estas diferencias tampoco fueron significativas ($p > 0.2$). Los explantes de las pacientes que no respondieron a la radioterapia, también presentaron las cantidades más elevadas y sólo se observó una tendencia a la significancia al compararse con las cantidades de los explantes de las pacientes que sí respondieron al tratamiento ($p = 0.06$).

CUADRO 12. MEDIANAS DE DEGRADACION DE CASEINA DE SOBRENADANTES DE EXPLANTES CON Ca CU. ANALISIS DE BANDAS CON MOVILIDAD DE 24kDa, 22 kDa y 20 kDa¹.

		<i>M E D I A N A S</i>		
	<i>n</i>	<i>24 kDa</i>	<i>22 kDa</i>	<i>20 kDa</i>
TIPOS HISTOPATOLOGICOS:	49			
Epidermoide	38	0.65	2.0	5.1
Adenocarcinoma*	4	6.7	11.6	34.0
Adenoescamoso	7	1.5	2.7	8.7
ESTADO HORMONAL	49			
menopausicas	33	0.3	1.7	2.7
Menstruantes ^o	16	3.0	2.7	13.4
RESPUESTA RADIOTERAPIA	33			
Respuesta	22	0.4	1.3	2.7
No Respuesta [∞]	11	2.7	2.6	8.1

* $p > 0.1$ ^o $p > 0.2$ [∞] $p = 0.06$

1. Se expresan como medianas de unidades densitométricas.

DISCUSION

A. LA GELATINASA B COMO PROTEINASA CARACTERISTICA DE EXPLANTES CON Ca CU.

El objetivo del trabajo fue describir por un lado las MMPs secretadas por explantes tanto de LB como de Ca CU y por otro lado, establecer las correlaciones con los datos clínico-patológicos del grupo con Ca CU. De acuerdo a los resultados obtenidos, la gelatinasa B fue característica de explantes con Ca CU, ya que las diferencias en las medianas con el grupo de explantes con LB fueron estadísticamente significativas. Esta enzima se ha reportado en concentraciones séricas elevadas en pacientes con cáncer de mama y colon⁵⁹, se ha documentado en modelos murinos de cáncer de mama⁷⁰. Se ha verificado su secreción en sobrenadantes de explantes tumorales de próstata⁶², y de células embrionarias transformadas de rata⁷⁵ así como en líneas celulares de melanoma humano⁷². Esta gelatinasa se ha documentado en neoplasias epiteliales, sin embargo algunas células mononucleares como leucocitos y macrófagos también la secretan⁴¹. De esta manera, la presencia de infiltrado inflamatorio se debe evaluar principalmente en las biopsias tumorales de estudio. El análisis histológico de los 49 explantes con Ca CU reveló la presencia de células inflamatorias, sin embargo, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, se evidenciaron cantidades mayores en ambas formas de la gelatinasa B en el subgrupo de explantes que carecieron histológicamente de células inflamatorias. Lo que se observó más bien fue un efecto de represión en la secreción, ya que las cantidades de ambas formas de la gelatinasa B siempre fueron menores en los 3 subgrupos positivos a células inflamatorias. Sin embargo, es posible que en el sobrenadante de cultivo, también las células inflamatorias hayan contribuido a la secreción de MMPs. Este hecho sólo se podrá comprobar por medio de inmunohistoquímica. También es importante mencionar que esta enzima está involucrada directamente en los procesos de angiogénesis: induce la replicación de las células endoteliales⁷³ y por inmunohistoquímica se ha revelado que estas células son fuentes secretoras de esta

enzima^{73,74}. Experimentos de migración de células de músculo liso, provenientes de aortas de macacos demostraron que las MMPs, pero principalmente la MMP-9 son necesarias para la migración óptima de las células a través de la MEC. La migración fue inhibida por α 2-macroglobulina y 1,10-fenantrolina, inhibidor específico de MMPs⁷⁵. Finalmente, las altas concentraciones de la forma molecular de 92 kDa de esta gelatinasa, sugiere la capacidad potencial de poder convertirse a su forma activa de la misma (84 kDa) e incrementarse en consecuencia la degradación de la MEC. Este hecho se puede realizar, vía otras proteinasas que degradan componentes de la MEC como la plasmina^{7,8,27}. Con los resultados obtenidos en el presente estudio y específicamente en el grupo de Ca CU, se revela que esta neoplasia también es capaz de secretar la gelatinasa B y por lo tanto, degradar componentes de la MEC abriendo vías de colonización aseguradas por angiogénesis. La angiogénesis no es un requisito único pero sí indispensable para cualquier invasión tumoral⁷⁶. El crecimiento de un tumor sólido se desarrolla en 2 fases: una sin vascularización en la que el tumor existe como agregados de células neoplásicas mantenidas por difusión simple de oxígeno y nutrientes. La segunda fase es vascular e inicia cuando el crecimiento es superior a los 3 mm². Existe un balance entre la proliferación celular en la periferia y muerte (necrosis) en el centro del mismo. Una vez vascularizados los tumores, se mantienen por perfusión y su crecimiento tiende en estas condiciones a ser rápido y exponencial⁷⁷. Se sabe que el Ca CU es una neoplasia de invasión locoregional. Clínicamente, un gran número de pacientes con carcinoma invasor llegan con hemorragias importantes incluso con cuadros de anemia. El manejo de las pacientes es transfundir con paquete globular antes de entrar a la radioterapia. Estos hechos se pueden explicar en parte por la capacidad que tiene el Ca CU de secretar altas concentraciones de esta gelatinasa.

B. LA GELATINASA A COMO PROTEINASA CARACTERISTICA DE EXPLANTES DE CERVIX CON LB.

La gelatinasa A se ha estudiado y descrito ampliamente en diversas neoplasias. Su secreción en altas concentraciones ha servido como marcador de metástasis en neoplasias de mama^{63,78}, colo-rectales^{64,79,80}, próstata^{62,81}, pulmonares⁶⁰, de cavidad oral^{61,82}, de hueso⁸³ y de esófago⁸⁴ entre otras. También se ha descrito como marcadora tumoral en diversos modelos murinos de cáncer⁸⁵, en líneas celulares transfectadas con oncogenes^{71,86,87} y secretada en líneas tumorales humanas^{88,89}. Los cortes histológicos de los explantes de cervix con LB siempre mostraron componentes importantes de estroma, entre ellos a fibroblastos. Durante el desarrollo embrionario de ratones, la expresión de la gelatinasa A se restringe a tejidos derivados del mesénquima²⁶. De esta manera, el hecho de haber encontrado niveles elevados de esta enzima en explantes de LB, no es un hecho singular. Daneri-Navarro *et. al*⁴² también demostraron la aparición de una banda de 66 kDa que degradó gelatina, en el 50% de los extractos de cervix normal. Se ha reportado que las células del mesénquima son fuentes potenciales de esta gelatinasa, concretamente fibroblastos⁴¹. Además, durante el ciclo del endometrio humano la expresión del RNAm de la gelatinasa A se mantiene a lo largo del ciclo menstrual, localizándose los mensajeros en el estroma y no en el epitelio²⁶. También se ha descrito en cáncer de mama que el estroma que rodea a las células neoplásicas es fuente por excelencia de la gelatinasa A⁴⁰. Este hecho puede explicar el haber encontrado cantidades elevadas de la gelatinasa A por explantes de cervix con LB. Sin embargo, esta observación se podrá corroborar sólo con estudios de inmunohistoquímica. Marbaix³⁸ *et al* han reportado la secreción tanto de esta gelatinasa como de estromelisin-1 en explantes de endometrio, y la alteración en el patrón de las enzimas por efecto de progesterona. No describen en detalle su modelo de cultivo de explante. Lo que es patente es que los epitelios tanto del endometrio como del cervix uterino deben ser reemplazados debido al ciclo menstrual, por lo que también están sujetos al estímulo

hormonal. Las MMPs pueden ser reguladas y de hecho Marbaix³⁸ reporta que la progesterona es capaz de inhibir a la gelatinasa B. No sólo las hormonas esteroideas, sino también los factores de crecimiento, así como las monocinas son capaces de regular la secreción de MMPs⁹⁰. Nuovo⁴⁰ *et al* demostraron por RT-PCR que los DNAs complementarios de gelatinasas A y B así como de los TIMP-1 y TIMP-2, estaban restringidos sólo a las células neoplásicas y células del estroma circunvecino a las zonas de células tumorales en cortes histológicos con Ca CU.

C. CORRELACIONES ENTRE LOS NIVELES DE GELATINASAS A Y B, ESTROMELISINA-1, Y LOS DATOS CLINICO-PATOLOGICOS DE LAS PACIENTES.

La tendencia a incrementarse las cantidades de ambas formas moleculares de la gelatinasa A de acuerdo a la etapa clínica, puede revelar algunas fases durante la progresión tumoral de esta neoplasia. Sin embargo, en los 49 casos estudiados de Ca CU no se observó una relación directa (Kruskall-Wallis, $p > 0.12$). Es posible que la falta de significancia fue debida al número bajo de casos en cada grupo de acuerdo a la etapa clínica. Este hecho fue evidente para las dos formas moleculares de la gelatinasa A. Por otro lado, Guilles⁴¹ *et al* reportaron que líneas de epitelio cervical transfectadas con HPV-33 además con y sin cotransfección con el oncogen *ras*, se arreglan al inducir organoides con matrices en dos tipos morfológicos:

Grupo I. Lesiones similares a neoplasias intraepiteliales cervicales III y las células con morfología epitelial.

Grupo II. Lesiones organizadas como carcinomas microinvasores y las células con morfología de tipo mesenquimatoso (incluso vimentina positivos). En este último grupo, las células se comportan invasoras *in vitro* y a diferencia del primer grupo, fueron capaces de secretar además de gelatinasa B también la gelatinasa A. En este modelo *in vitro* de progresión tumoral, la presencia de gelatinasa A denotó las células con capacidad de progresión tumoral. Estos hechos pueden explicar la relación directa entre las medianas de

ambas formas de la gelatinasa A y las etapas clínicas de las pacientes. Otros autores también han reportado la correlación entre potencial invasor elevado y alta expresión de esta gelatinasa^{8,11}. Daneri-Navarro *et. al.*⁴² demostraron una correlación entre la actividad proteolítica de los extractos de las diferentes lesiones de cérvix uterino y las lesiones que se desarrollan en la historia natural del Ca CU: normal < lesiones de bajo grado < lesiones de alto grado < Ca CU. Estas tendencias se han reportado también de acuerdo al grado de diferenciación histológica en carcinoma de colón^{64,79} y de acuerdo a la etapa clínica en estudios de cáncer de próstata⁹¹.

De acuerdo al tipo histopatológico, los carcinomas adenoescamosos secretaron cantidades mayores de ambas formas moleculares de la gelatinasa B y de la estromelisin-1 así como en 5 de 7 casos la presencia además de colagenasa intersticial. Clínicamente, se sabe que las pacientes con este tipo histopatológico cursan con una enfermedad más agresiva, que la que se observa en pacientes con carcinomas epidermoides⁹². La gelatinasa B como se mencionó anteriormente es potencialmente angiogénica^{73,74} y de manera general se sabe que es de mal pronóstico observar un índice elevado de angiogénesis en cualquier tumor sólido⁹³. Esta gelatinasa secretada en altos niveles, puede reflejar una característica particular en el carcinoma adenoescamoso y que puede explicar el comportamiento biológico del mismo. También el haber observado cantidades elevadas de las cisteín-proteinasas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa, principalmente en casos con adenocarcinoma, pueden caracterizar a este tipo de carcinoma que también clínicamente se comporta con un curso más agresivo. Los carcinomas queratinizantes, por estar en una fase mejor diferenciada que los no queratinizantes, responden más lentamente a la radioterapia pero recurren menos que los no queratinizantes⁵⁶. Bajo estos hechos observados en la clínica, es difícil explicar porqué se observaron cantidades elevadas de ambas gelatinasas en el subgrupo de pacientes con carcinomas queratinizantes. Es posible que existan otros factores potenciales, quizá de tipo genético ó epigenético que estén induciendo ese fenotipo de alta secreción de proteinasas en los de tipo queratinizantes. Un hecho que puede mencionarse, es que el VPH-16 está estrechamente

asociado a los carcinomas epidermoides queratinizantes⁹⁴. Factores que estimulen las zonas promotoras de los genes del VPH (sitios AP-1, por ejemplo), pueden también activar algunos genes de MMPs que tienen también sitios AP-1 en sus zonas promotoras (por ejemplo de la gelatinasa B). Daneri-Navarro *et. al.*⁴² proponen también la posible influencia del VPH sobre algunos genes que codifican para algunas proteinasas, en las células tumorales y de lesiones premalignas.

Finalmente, se observó que en los mismos casos que secretaron estromelina-1 también se reveló una banda que (por la *Mr* de 34 kDa/46 kDa y la inhibición en presencia de 1,10-fenantrolina) parece corresponder a colagenasa intersticial. Se ha documentado *in vitro* que la expresión del gen de la estromelina-1 lleva también a la expresión del gen de la colagenasa intersticial, porque comparten las mismas zonas reguladoras en la región del promotor del gen^{7,8,26}. Esto puede explicar el hecho de haber encontrado en 14 de 18 carcinomas la secreción de ambas MMPs. Diez casos de 12 con carcinoma epidermoide fueron no queratinizantes y secretaron también las 2 bandas. En 5 de 7 casos con carcinoma adenoescamoso se revelaron también las bandas de 34 kDa/46 kDa. Daneri-Navarro *et. al.*⁴² también demostraron la presencia de una banda de 45 kDa en el 50% de los extractos con Ca CU evaluados.

El epitelio endometrial normal está sujeto a recambios dirigidos por el ciclo menstrual³⁸. En las mujeres menopausicas, los epitelios tanto de endometrio como del cérvix sufren atrofia, por lo que no requieren de recambios. No es posible saber si esta característica hormonal pueda también aplicarse al epitelio de cérvix tumoral y explicar el hecho de haber observado la secreción tanto de gelatinasas como de algunas caseinasas, en menores cantidades en explantes de pacientes menopausicas, que el secretado por explantes de pacientes menstruantes. Lo cierto es que las pacientes menopausicas responden mejor a la radioterapia⁹⁵. Hay que recordar que las hormonas esteroides modulan la secreción de MMPs^{38,96}. Si bien es cierto que tienen un efecto inhibitor, las células epiteliales normales del cérvix uterino requieren de estas hormonas para su proliferación y renovación³⁸. Quizá

este último hecho este promoviendo en las pacientes con Ca CU y menstruantes, a que las células tumorales estén sujetas más bien a proliferación y correlacione con el peor pronóstico que tienen estas pacientes.

Fue un resultado sorprendente el haber revelado medianas mayores de gelatinasas en los casos que sí respondieron a la radioterapia. Un análisis de subgrupos de pacientes menstruantes y menopausicas en este grupo de respuesta y no respuesta a tratamiento, también reveló la presencia de cantidades elevadas siempre en aquellos grupos con respuesta al tratamiento. No es posible dar una explicación a este hecho. Sin embargo, las pacientes sin respuesta a la radioterapia presentaron cantidades elevadas de ambas formas de la estromelisinina-1, así como a las bandas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa en zimogramas de caseína. Debido al grupo tan diverso en sus características clínico-patológicas, estos hechos se deberán evaluar con grupos terapéuticos para confirmar si tienen estas proteínas algún valor de tipo pronóstico.

La expresión del RNAm de diferentes estromelisininas, ya sea por análisis en Northern blot o por hibridación *in situ* se han realizado principalmente en neoplasias como carcinomas epidermoides de cabeza y cuello^{61,97,98}, cáncer pulmonar⁹⁸, cáncer de mama^{20,99}, cáncer epidermoide y basocelular de piel¹⁰⁰ y en cáncer de esófago⁸⁴. Sin embargo, ninguno de ellos ha revelado la presencia de la enzima en zimogramas. Algunos de los resultados que han obtenido destacan por un lado, la presencia de los RNAm de estromelisinina-1 y 2 en células tumorales localizadas a lo largo de la membrana basal, en grupos de células neoplásicas bien diferenciadas y no invasoras en cáncer de mama¹⁰¹. Finalmente, también en casos con cáncer de mama, tanto el RNAm como la proteína de la estromelisinina-3 se documentó en fibroblastos que rodean a las células neoplásicas y este patrón se observó tanto en tumores primarios como en metástasis¹⁰². Las correlaciones clínico-patológicas importantes al revelar la expresión del RNAm de las diferentes estromelisininas en las muestras estudiadas, destaca la relación directa con la invasión local, menor diferenciación del carcinoma, invasión vascular y metástasis a ganglios linfáticos. Del

análisis clínico-patológico de los resultados obtenidos en las 49 muestras de Ca CU que secretaron estromelina-1, cabe destacar que los casos con carcinoma adenoescamoso y en carcinomas epidermoides queratinizantes presentaron medianas elevadas de estromelina-1. Es importante puntualizar que el carcinoma adenoescamoso es clínicamente más agresivo que el tipo epidermoide⁹². Este hecho correlaciona con la propuesta de Matrisian, sustentada con el modelo de cáncer de piel experimental en ratones. El modelo reveló que tanto las lesiones de alto grado (papilomas independientes) así como en carcinomas con invasión a dermis y músculo y metastásicos, los niveles de RNAm de estromelina-1 se elevan de manera importante¹⁰³. Esto refleja el hecho de establecer una correlación entre carcinomas y/o lesiones con conducta biológica más agresiva y la expresión y/o secreción de estromelina-1 en niveles elevados, en comparación a carcinomas "teóricamente" menos agresivos como el tipo epidermoide¹⁰⁴. Los carcinomas que no responden al tratamiento (por ejemplo a la radioterapia), representan un grupo de neoplasias con comportamiento biológico agresivo. El grupo de pacientes que no respondieron a la radioterapia, presentaron el nivel mayor de estromelina-1. Sin embargo, entre las características importantes a destacar en el grupo de 11 casos sin respuesta al tratamiento son que 4 de los 7 casos con tipo histológico fueron adenoescamoso y ningún caso presentó etapa clínica I. Por otro lado, llama la atención que no se observaron niveles elevados tanto de las gelatinasas A y B, como de la estromelina-1 en los carcinomas epidermoides no queratinizantes. Este tipo de carcinomas pueden responder más rápido a la radioterapia pero recurren en las pacientes en menos tiempo¹²⁰. Justamente, en este grupo de pacientes sin respuesta a la radioterapia todos los casos (excepto los de tipo adenoescamoso) presentaron carcinomas epidermoides no queratinizantes.

D. CORRELACIONES ENTRE LOS NIVELES DE LAS PROTEINASAS MENORES DE 30 kDa Y LOS DATOS CLINICO-PATOLOGICOS DE LAS PACIENTES.

Las 3 bandas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa con naturaleza de cisteín-proteasa correlacionó con niveles elevados en casos con adenocarcinoma y en pacientes que no respondieron a la radioterapia. A pesar de no haber sido significativas las diferencias entre las cantidades en el grupo de adenocarcinoma, al compararse con los grupos de tipo epidermoide y adenoescamoso, son patentes las diferencias. Estas bandas pueden reflejar posiblemente una expresión característica (ó fenotípica) de los adenocarcinomas y por otro lado, al grupo de pacientes que no respondieron a la radioterapia. En este punto, es importante puntualizar que las diferencias tendieron a la significancia ($p=0.06$), al compararse las cantidades con el grupo de respuesta al tratamiento.

En relación a la banda que degradó caseína con *Mr* de 28 kDa y con posible naturaleza de cisteín-proteasa, cabe resaltar que 2 casos fueron de tipo histológico carcinoma adenoescamoso y 4 de los 5 casos que la secretaron no respondieron al tratamiento. Daneri-Navarro *et. al.*⁴² también demostraron la presencia de una banda de 28 kDa en el 50% y 30% de los casos con lesiones de alto grado y en aquellas con Ca CU, respectivamente.

E. NATURALEZA DE LAS BANDAS GELATINOLITICAS MAYORES DE 100 kDa.

Los trabajos de revisión de Woessner^{7,11}, Matrisian^{8,26} y Stetler-Stevenson^{9,10} en relación a MMPs, no han descrito enzimas con pesos moleculares superiores a los 100 kDa. Sin embargo algunos autores como Bernhard *et al*⁶⁹, Nakajima *et al*¹⁰⁵, y de Koshikawa *et al*¹⁰⁶ también han reportado MMPs mayores de 100 kDa, pero no existe consenso en relación a su naturaleza y significado biológico. Koshikawa¹⁰⁶ *et al* reportaron proteinasas de 150 kDa, sin embargo a pesar de su actividad gelatinolítica, por pruebas de inhibición con PMSF concluyeron su naturaleza de serín-proteasa y con anticuerpos

policlonales la definen como calicreína tisular. Bernhard *et al*⁶⁹ reportaron una gelatinasa de 240-250 kDa, secretada por células embrionarias y transformadas de rata. Daneri-Navarro *et al*.⁴² demostraron la presencia de una banda de 150 kDa en extractos de lesiones del cérvix uterino, con una frecuencia del 20% tanto en muestras con Ca CU, como en aquellas con lesiones de alto grado. En el presente estudio se revelaron también gelatinasas secretadas de alto peso molecular por ambos tipos de explantes. Todas las gelatinasas mayores de 100 kDa descritas en este estudio fueron inhibidas solamente con 5mM de 1,10-fenantrolina, por lo que se determinó su naturaleza de metaloenzima dependiente de Zn^{2+} . Se sabe que estas gelatinasas de alto peso molecular pueden corresponder a oligomerizaciones de las cuatro formas de gelatinasas⁶⁸. Por las intensificaciones de las bandas de 92 y 72 kDa de proteína en geles desnaturalizantes, después de someter a condiciones reductoras una muestra de sobrenadante; se puede proponer que estas metaloenzimas correspondieron a oligomerizaciones de las gelatinasas A y B.

F. UTILIDAD DEL MODELO DE HISTOCULTIVO DE EXPLANTES DE CERVIX UTERINO PARA EVALUAR PROTEINASAS.

Los estudios que han analizado las MMPs secretadas por tejidos tanto tumorales como normales del aparato ginecológico, no han tenido la consistencia desde su diseño como en los resultados obtenidos. Ya sea que revelen resultados generados de cultivos celulares^{39,41}, o que analicen un número muy pequeño de casos tanto de tejidos normales como tumorales³⁷. Finalmente, nadie ha descrito las condiciones de los cultivos³⁸ y este aspecto es importante de considerar, ya que tanto el suero fetal bovino, como otros suplementos del medio de cultivo, pueden alterar de manera importante la secreción de proteinasas en cualquier sistema *in vitro*, como quedó demostrado también en este estudio. El modelo de histocultivo utilizado en el presente estudio, es una modificación del descrito por Leighton¹⁰⁷ en 1951 y retomado por Hoffman¹⁰⁸ en 1987. Las gelatinasas secretadas por los explantes de ambos tipos de cérvix uterino, pueden reflejar potencialmente cómo estos tejidos

las pueden secretar *in vivo*. El modelo de histocultivo utilizado reveló la conservación de los elementos tisulares así como su organización topológica. También se demostró que el soporte de gelatina no interfirió de manera importante en la secreción de gelatinasas. El modelo de histocultivo de Hoffman¹⁰⁸ ha sido utilizado para evaluar quimiosensibilidad a antineoplásicos en diferentes tipos de neoplasias. Su modelo mostró una alta correlación entre la quimiosensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica. Este hecho respalda la utilización del modelo y con los resultados obtenidos abre las posibilidades de intensificar el estudio a cualquier tipo de neoplasia.

CONCLUSIONES

A. VENTAJAS Y APLICACIONES DEL MODELO DE HISTOCULTIVO DE EXPLANTES DE CERVIX UTERINO.

El modelo de histocultivo utilizado tiene varias ventajas sobre los ensayos clonogénicos. También sobre los estudios que evalúan proteínas de homogenizados celulares y/o tisulares. Los ensayos clonogénicos sólo estudian el comportamiento de uno ó algunos tipos celulares del carcinoma. Recordando que cualquier tumor es un complejo de varias clonas, estos ensayos solo analizan una fracción del tumor. Por otro lado, es importante reconocer las diferencias que existen en las proteínas determinadas como productos de secreción, de las contenidas en homogenizados celulares. En este contexto, Sawaya *et al*¹⁰⁹ reportaron niveles elevados de la gelatinasa de 72 kDa y baja secreción del activador del plasminógeno tipo tisular (APt) en cultivo de astrocitos de rata, después de exponer a radiación ionizante. Estas proteínas fueron determinadas como productos de secreción. Estos hallazgos fueron completamente contrastantes al análisis obtenido de proteínas contenidas en homogenizados celulares. El daño que se observa en los pacientes con tumores del sistema nervioso central debido a los efectos de la radiación correlacionó con los resultados reportados por Sawaya *et al*¹⁰⁹. La inyección intracerebral de la colagenasa de 72 kDa activada en ratas adultas produce después de 24 horas necrosis masiva, con infiltrado de polimorfonucleares, vasos sanguíneos llenos de fibrina, diapedesis de proteínas y eritrocitos¹¹⁰. El APt tiene entre otras funciones el iniciar la disolución de coágulos de fibrina, por lo que su secreción en bajas concentraciones impide permear los vasos sanguíneos afectados en la zona que recibió radiación ionizante¹¹¹. Estos resultados demuestran claramente la importancia de evaluar las proteínas como productos de secreción. En relación al modelo utilizado en este trabajo se demostró que el soporte de gelatina no afectó de manera importante la secreción de gelatinasas. El uso del soporte mantiene integrados todos los elementos tisulares del explante: células y matriz extracelular y en consecuencia su viabilidad. Finalmente la determinación de las proteínas como

productos de secreción en el cultivo de explantes de Ca CU que conservaron su histomorfología, revelan las posibilidades de que las células de cada explante las puedan secretar *in vivo*.. Por lo tanto, el modelo de histocultivo utilizado representa un sistema *in vitro* útil y de gran aplicación en el area de cultivo de tejidos y cáncer, así como en el area de invasión tumoral. Las condiciones finales de cultivo son en ausencia de SFB, rojo fenol y apoyados en un soporte de gelatina (Gelfoam).

B. CONDICIONES DE HISTOCULTIVO PARA EVALUAR PROTEINASAS EN EXPLANTES CON Ca CU.

Es posible que una fracción del total de las gelatinasas y en general de otras proteinasas, sean producto de la destrucción tisular por el corte de la biopsia y fragmentación del explante. En este momento, se conoce a partir de 6 horas de cultivo el sistema funciona con secreción celular. Este tiempo fue determinado de acuerdo a los resultados obtenidos en presencia de inhibidor de síntesis de proteína como la cicloheximida. El modelo de histocultivo utilizado tiene muchas aplicaciones potenciales para evaluar otros parámetros bioquímicos como el activador del plasminogeno tipo urocinasa entre otros, así como la presencia de los inhibidores tisulares de las MMPs y los inhibidores de los activadores del plasminógeno. También para realizar ensayos de cinética de secreción y/o inhibición en la secreción de proteinasas con drogas como los retinoides. Actualmente, el modelo se está aplicando al estudio de tumores del sistema nervioso central, carcinomas epidermoides de la boca y en tumores óseos con resultados importantes de apoyo al pronóstico de los pacientes.

C. PRINCIPALES PROTEINASAS REVELADAS DURANTE EL CULTIVO DE EXPLANTES DE CERVIX UTERINO: ALGUNAS CORRELACIONES CON LOS DATOS CLINICO-PATOLOGICOS DE LAS PACIENTES CON Ca CU.

Las gelatinasas secretadas por los explantes de cérvix tanto con LB como con Ca CU son MMPs ya que cumplieron los siguientes requisitos:

- a) Fueron inhibidas con 1,10-fenantrolina que es un quelante de iones Zn^{2+} .
- b) No fueron inhibidas con inhibidores de cisteín- y serín-proteinasas.
- c) En los casos que revelaron las formas latentes de las gelatinasas A y B, los zimogramas revelaron la desaparición de estas bandas después de la exposición a 1 mM de APMA.

Las *Mrs* calculadas revelaron a estas enzimas como la gelatinasa A (64 kDa/75 kDa) y la gelatinasa B (85 kDa/94 kDa). También se revelaron gelatinasas con *Mrs* mayores de 100 kDa y en ocasiones en pares: 130/140 kDa; 170 kDa/180 kDa y mayores de 200 kDa. Estas gelatinasas fueron secretadas principalmente por explantes de Ca CU. El significado biológico de estas di y trimerizaciones de las gelatinasas A y B no se conoce, pero sí se sabe al menos en bacterias que algunas proteinasas se organizan en más de una subunidad generando *Mrs* mayores a los 100 kDa^{112,113}. Estas formas pueden reducirse en monómeros durante la separación electroforética en zimogramas¹¹³. Es evidente que las células del Ca CU están mejor preparadas para la invasión y/o angiogénesis y al menos así se puede interpretar el hecho de haber observado mayor número de gelatinasas con *Mr* superiores a 100 kDa en este grupo. No se sabe si estas formas moleculares pueden sufrir algún tipo de modificación *in vivo* por rompimiento, generando formas monoméricas de la gelatinasas-A y gelatinasa-B.

La gelatinasa A fue característica de los explantes con LB, principalmente la forma de 72 kDa. Por otro lado, la gelatinasa B caracterizó a los explantes de Ca CU y las diferencias en las cantidades obtenidas por explantes con LB fue significativa. Es posible que el gran componente de estroma en los explantes de cérvix con LB y la ausencia de este en los explantes con Ca CU puedan explicar estos hechos.

Durante un tiempo se pensó que la presencia de infiltrado inflamatorio en un tumor podía tener 2 funciones:

- a) El de favorecer el desarrollo de una respuesta inmune, ya que las células neoplásicas muchas veces se ven rodeadas de células mononucleares pequeñas que por marcadores parecen corresponder a linfocitos. Este hecho abrió la idea de aplicar lo que se conoce como inmunoterapia adoptiva, utilizando los linfocitos que infiltran los tumores¹¹⁴.

b) Las enzimas liberadas por las células mononucleares (monocitos y polimorfonucleares) favorecen el mecanismo de invasión de las células tumorales, al degradar componentes moleculares de la membrana basal y del estroma¹⁵.

Sin embargo, hoy en día se sabe que dependiendo de la neoplasia, el infiltrado inflamatorio con ó sin necrosis puede tener un significado que incluso también puede afectar el pronóstico de los pacientes con cáncer¹⁵. Si la gelatinasa B se reconoce también como angiogénica⁷³ y aproximadamente el 75% de las biopsias de Ca CU estudiadas presentaron infiltrado inflamatorio, fue posible pensar que estos 2 hechos podrían participar en la inducción de angiogénesis. Los resultados mostraron que el subgrupo de explantes con Ca CU y sin células inflamatorias revelaron las medianas mayores de gelatinasa B. Por lo menos en lesiones displásicas en cuello uterino y de alto grado, se demostró la falta de correlación entre la presencia de inflamación y la evidencia de angiogénesis medida con inmunohistoquímica para la presencia del factor VIII¹¹⁶. Por los datos que existen en la literatura^{114,115}, la presencia de células inflamatorias es más bien una señal de que se está realizando una respuesta inmune, apoyado por el hecho de que pacientes con éstas características son candidatas a inmunoterapia adoptiva.

En zimogramas de caseína se revelaron dos pares de bandas de 52 kDa/60 kDa y de 34 kDa/46 kDa de *Mr*. Estas bandas pueden corresponder a las formas activas y latente, respectivamente de la estromelina-1 y colagenasa intersticial. Estas enzimas se inhibieron con 5 mM de 1,10-fenantrolina y en presencia de 1 mM de organomercurial, los geles sólo revelaron bandas de menor *Mr* que pueden corresponder a las formas activas. Estas pruebas revelaron su naturaleza de MMPs dependientes de Zn²⁺. Sin embargo, también se revelaron otras bandas que degradaron caseína, con *Mrs* de 28 kDa y de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa. Las pruebas en inhibidores revelaron que estas proteinasas parecen corresponder a cisteín-proteinasa. Se realizó la correlación entre estas cisteín-proteinasa y los datos clínicos. Se encontraron algunos datos importantes que ya fueron presentados en la sección de resultados. Las cisteín-proteinasa de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa pueden corresponder a algunas formas

de las conocidas como “tripsinogeno likes” descritas por Koshikawa *et al*¹⁰⁶

Los niveles de ambas formas moleculares de la gelatinasa A secretadas por explantes de CA CU reveló una relación directa con la etapa clínica. El pronóstico de las pacientes es afectado por la etapa clínica: el mayor tamaño tumoral (mayor etapa clínica) es de mal pronóstico¹¹⁷. De esta manera, la gelatinasa A correlaciona con la progresión tumoral en Ca CU, similar a los resultados obtenidos por Guilles *et al*⁴¹ en el modelo *in vitro* de progresión tumoral con una línea celular de Ca CU.

Clínicamente, los carcinomas adenoescamosos y adenocarcinomas son más agresivos (inducen recurrencias y formación de metástasis en menos tiempo, presentan radioresistencia), que los carcinomas epidermoides⁹⁵. Este hecho puede correlacionar con los niveles elevados de la gelatinasa B, estromelisin-1 y las cisteín-proteinasas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa encontradas, principalmente en estos carcinomas. Por lo tanto, estas proteinasas pueden caracterizar a Ca CU biológicamente más agresivos.

Todos los explantes con carcinomas epidermoides queratinizantes presentaron niveles elevados de ambas formas moleculares de las gelatinasas A y B, así como la forma de 60 kDa de la estromelisin-1. Es posible que algunos factores genéticos esten controlando positivamente la secreción de MMPs en estos carcinomas. En las neoplasias epidermoides no queratinizantes se documentó la aparición simultánea tanto de las bandas que correspondieron a estromelisin-1 como a colagenasa intersticial. Algún tipo de señales pueden controlar genéticamente en estos carcinomas y activar ambos genes. Algunas de ellas pueden ser desde el estrés oxidativo¹¹⁸ hasta factores genéticos más específicos como la presencia del VPH¹¹⁹.

Las pacientes con estado hormonal menstruante, revelaron medianas elevadas de las gelatinasas A y B, así como las bandas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa. Estas pacientes tienen peor pronóstico que las pacientes menopausicas⁹⁵. Sin embargo, durante las correlaciones con respuesta al tratamiento, las gelatinasas A y B no resultaron ser marcadoras de respuesta a la radioterapia. Sólomente la estromelisin-1 y las bandas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa son las proteinasas que aparecieron en el grupo de pacientes sin respuesta al

tratamiento y que pueden ser marcadoras de mal pronóstico.

Ocasionalmente existen algunos problemas en diagnosticar histológicamente y diferenciar el carcinoma adenoescamoso del carcinoma epidermoide poco diferenciado. También entre este último y el adenocarcinoma poco diferenciado. El diagnóstico histológico, la edad, el estado hormonal así como la etapa clínica, son algunos de los parámetros clínico-patológicos a considerar para establecer el pronóstico a una paciente¹¹⁷. Pueden ser importantes para complementar el pronóstico la determinación ya sea bioquímicamente o por inmunohistoquímica de estromelisin-1. También la determinación de las cisteín-proteinasas de 24 kDa, 22 kDa y 20 kDa reveladas en zimogramas de caseína pueden complementar el pronóstico y encaminar un estudio, con el objeto de evaluar el papel de estas enzimas en el Ca CU.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de enfermería y médicos adscritos al Servicio de Ginecología, en especial al Dr. José Luis Ramírez Gaytan, anterior Jefe del Servicio, y al Dr. Gilberto N. Solorza Luna, actual Jefe del Departamento de Ginecología por su gran disposición y siempre con el deseo de ayudarme. A la Dra. Mercedes Reyes Morales, médico adscrito al Servicio, por su entrega completa. A la enfermera Guadalupe Fernández Castañeda y a la Srita. Ma Guadalupe Durán Frías, del consultorio 7; así como a la Srita Gloria Meléndez del consultorio 9 de Ginecología, por su gran comprensión y paciencia. Agradezco a la Srita. Ma Luisa Delgado, secretaria de la Jefatura del Departamento de Ginecología, por su valiosa colaboración en la captura de los datos de los expedientes clínicos. A la Dra. Georgina González Avila del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y a la Biól. Catalina Trejo Becerril, por sus valiosos consejos en la realización de los zimogramas y en general de la técnica de electroforésis. Al Dr. Alvaro R. Osornio Vargas, actual Jefe de la División de Investigación Básica por la sugerencia de utilizar el Gel-Foam como soporte en el modelo del histocultivo. Al Dr. Ricardo Delgado Chávez, Jefe del Departamento de Patología Experimental por su apoyo en el análisis morfológico de los cortes histológicos, además de sus valiosos consejos y críticas durante el trabajo. Al C. Antonio Martínez Cedillo, del Departamento de Publicaciones del INCan, por su apoyo en capturar en computadora las imágenes tanto de los zimogramas como de las fotos de los cortes. A mis alumnas del laboratorio, tanto en aquella época como fue con la Q.F.B. Ma. Julieta Argüello Ramírez, como en este momento, especialmente a la Pas. en Biól. Blanca Angélica Segura Pacheco por ser una lucecita que quiere y debe brillar en el firmamento. Espero que en mi laboratorio encuentres parte de esa luz de inicio. Igualmente y no por ser la última tener menos importancia, a la Pas. de Q.F.B. Catalina Arenas Huertero, quién me acompañó y apoyó de manera incondicional durante ese primer año póstumo de nuestra madre, ¿recuerdas que importante fue nuestro apoyo?

Parte de los resultados de la presente tesis se organizaron en un documento que obtuvo el segundo lugar en la categoría de trabajos terminados del premio en cáncer "Aída Weiss" el 18 de Febrero de 1994.

Finalmente quiero dedicar el esfuerzo de este trabajo y de todo el que seguirá a la memoria de mi madre, la **SRA. CATALINA HUERTERO DE ARENAS**, quién fue una paciente más que murió con **CANCER CERVICO UTERINO**.



**La Coordinación de la Investigación Científica
a través del Programa Universitario de Investigación en Salud
otorga el presente diploma a:**

Biól. Francisco Jesús Arenas y Quím. María Julieta Argiuello

por su trabajo

*"Secreción de metalproteinasas de matriz
extracelular por explantes de cervix tumoral y normal."*

que obtuvo *el 2^{do} lugar* en el

PROGRAMA "AIDAWISS"

Para estimular la investigación y docencia en Oncología

Ciudad Universitaria, México D.F. a *18 de febrero de 1994.*

"POR MIRAZA HABLARA EL ESPIRITU"

[Firma]
el Coordinador de la Investigación Científica

D^r Gerardo Suárez Reynoso.

[Firma] *San Esteban*

el Director del Programa
Universitario de Investigación en Salud

D^r José Eduardo San Esteban.



GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

AMPc. Nucleótido monofosforilado cíclico.

APMA. Acetato de p-aminofenilmercúrico. Es un agente capaz de activar las formas latentes de las MMPs.

APt. Activador del Plasminógeno tipo tisular.

APu. Activador del Plasminógeno tipo urocinasa.

AP-1. En las regiones promotoras de algunos genes, corresponden a sitios de control realizados por factores de transcripción como la proteína Jun y/o Fos.

AP-2. En las regiones promotoras de algunos genes, corresponden a sitios de control realizados por los dos sistemas de transducción de señales: proteína cinasa-A y -C.

Ca CU. Cáncer cérvico-uterino.

CHIMP-3. Del inglés "Chicken Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-3".

EGF. Del inglés "Epidermal Growth Factor". Es un factor de crecimiento.

EIA. Es la onco-proteína de adenovirus que puede formar un complejo con la proteína del gen Rb.

ELISA. Del inglés "Enzyme Linked Immune Sorbed Assay".

FGF. Del inglés "Fibroblast Growth Factor". Es un factor de crecimiento.

INCAN. Instituto Nacional de Cancerología.

IL-1. Interleucina-1.

kDa. Kilodaltones.

LB. Lesión benigna del cérvix uterino.

MB. Membrana basal.

MEC. Matriz extracelular.

MMPs. Matriz Metaloproteinasas.

Mr. Movilidad relativa.

NGF. Del inglés "Neuronal Growth Factor". Es un factor de crecimiento.

NEM. N-etilmaleimida. Inhibidor de Cisteína-proteinasas.

NR. No respuesta a la radioterapia.

PBS. Solución amortiguada de fosfatos y salina.

PEA3. Corresponde a regiones en los promotores donde existe control por la proteína que se une también al "enhancer" en el DNA del virus del polio.

PDGF. Del inglés "Platelet Derived Growth Factor". Es un factor de crecimiento.

PMSF. Fenil-metil sulfonil fluoruro. Inhibidor de Serín-proteinasas.

R. Respuesta a la radioterapia.

RNA_m. RNA mensajero.

RT-PCR. Del inglés: "Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction".

TATA. Secuencia específica de nucleótidos, que residen en el promotor de los genes para unirse la RNA polimerasa II e iniciar la transcripción del RNA mensajero.

TIMP-1. Del inglés "Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1".

TIMP-2. Del inglés "Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-2".

TIMP-3. Del inglés "Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-3".

TIE. Del Inglés "TGF Inhibitor Element". Corresponde a una secuencia de la región promotora de algunos genes que se inhiben en presencia de este factor de crecimiento.

TGF-β. Del inglés: "Transforming Growth Factor-beta". Es un factor de crecimiento.

TNF-α. Del inglés "Tumor Necrosis Factor-alfa". Es una citocina.

UV. Ultravioleta.

VP-16-213. Es una droga antineoplásica conocida también como etopósido.

VPH. Virus del papiloma humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Liotta L A, Rao C N, Barsky S H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636.
2. Boone C W, Kelloff G J, Steele V E. Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer Res* 1992; 52: 1651.
3. Liotta L A, Nageswara R, Wever U M. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 1037.
4. Kanemoto T, Reich R, Royce L, *et al.* Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2279.
5. Wheelock E F, Robinson M K. Biology of the disease. Endogenous control of the neoplastic process. *Lab Invest* 1983; 48: 120.
6. Pauli B U, Knudson W. Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations. *Hum Pathol* 1988; 19: 628.
7. Woessner J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145.
8. Matrisian L M. The matrix-degrading metalloproteinases *Bioassays* 1992; 14: 455.
9. Stetler-Stevenson W G, Liotta L A, Kleiner D E. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993; 7: 1434.
10. Stetler-Stevenson W G, Aznavoorian S, Liotta L A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541.
11. Woessner F J. The family of matrix metalloproteinases. *Ann New York Acad Sci USA* 1994; 732: 11.
12. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370:

61.

13. Mignatti P, Rifkin D B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161.

14. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 728.

15. Okada Y, Nagase H, Harris E D. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986; 261: 14245.

16. Hasty k A, Pourmotabbed T F, Goldberg G I, Thompson J P, Spinella D G, Stevens R M, Mainardi C L. Human neutrophil collagenase: a distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1990; 265: 11421.

17. Freije J M P, Diez-Itza I, Balbin M, *et al.* Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1992; 269: 16766.

18. Wilhelm S M, Collier I E, Kronberg A, *et al.* Skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6725.

19. Chin J R, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial cells in parallel with collagenase: biosynthesis, isolation, characterization and substrates. *J Biol Chem* 1986; 261: 14.

20. Basset P, Bellocq J P, Wolf C. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699.

21. Woessner J F, Taplin C J. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of rat uterus. *J Biol Chem* 1988; 263: 16918.

22. Banda M J, Werb Z. Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem J* 1981; 193: 589.

23. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, *et al.* Regulation of matrixmetalloproteinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 732: 31.

24. Overall C M, Wrana J L, Sode K J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 14064.

25. Delany A M, Brinckerhoff C E. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J Cell Biochem* 1992; 50: 400.

26. Matrisian L M. Matrix metalloproteinase gene expression. *Annals New York Acad Sci* 1994; 732: 42.

27. Romanic A M, Madri J A. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathology* 1994; 4: 145.

28. Hanemaaijer R, Koolwijk P, Clereq L L, Uree W J A, Hinsbergh V W M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. *Biochem J* 1993; 296: 803.

29. De Clerck Y A, Shimada H, Taylor S M, Langley K E. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression *Ann N Y Acad Sci USA* 1994; 732: 22.

30. Fidler I J, Hart I. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982; 217: 998.

31. Vescio R A, Connors K M, Kubota T, Hoffman R M. Correlation of histology and drug response of human tumors grown in native-state three-dimensional histoculture and nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5163.

32. Kleinman H K, Mc Garvey M L, Hassell J R, *et al.* Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 1986; 25: 312.

33. Iozzo R V, Bolender R P, Wight T N. Proteoglycan changes in the intercellular matrix of human colon carcinoma. *Lab Invest* 1982; 47: 124.

34. Stetler-Stevenson W, Krutzsch H C, Wacher M P, *et al.* The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem* 1989; 264: 1353.

35. Liotta L A. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 1992; 266: 34.

36. Iozzo R V. Biology of disease. Proteoglycans: structure, function, and role in neoplasia. *Lab Invest* 1985; 53: 373.
37. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, *et al.* Different pattern of zymography between human gynecologic normal and malignant tissues. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 478.
38. Marbaix E, Donnez J, Courtoy P J, Eeckhout Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11789.
39. Miyagi E, Yasumitsu H, Hirahara F, *et al.* Characterization of matrix-degrading proteinases and their inhibitors secreted by human gynecological carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 568.
40. Nuovo G J, MacDonell P B, Simsir A, Valea F, French D H. Correlation of the *in situ* detection of polymerase chain reaction amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 267.
41. Gilles C, Polette M, Piette J, Birembaut P, Foidart J-M. Epithelial-mesenchymal transition in HPV-33-transfected cervical keratinocytes is associated with increased invasiveness and expression of gelatinase A. *Int J Cancer* 1994; 59: 661.
42. Daneri-Navarro A, Toro-Arreola S, Bravo-Cuellar A, Cabrera N, Orbach-Arbouys S, Pérez-Montfort R. Proteolytic activity in extracts of invasive cervical carcinoma and precursors lesions. *Biomed & Pharmacother* 1995; 49: 304.
43. Terranova V P. Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. *Science* 1984; 226: 982.
44. Leibel S A, Fuks Z. Is local failure a cause of or a marker for metastatic dissemination in carcinoma of the uterine cervix?. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1992; 24: 377.
45. Frost P, Levin B. Clinical implications of metastatic process. *The Lancet* 1992; 339: 1458.

46. Mohar-Betancourt A, Frias-Mendivil M, Beltrán-Ortega A, *et. al.* Epidemiología descriptiva del cáncer cervicouterino. Instituto Nacional de Cancerología 1985-1991. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 1993; 39: 1849.
47. Escandón-Romero C, Benítez-Martínez M G, Navarrete-Espinoza J, Vázquez-Martínez J L, Martínez-Montañez O G, Escobedo-De la Peña J. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Publica Mex* 1992; 34: 607.
48. Muñoz N, Bosch F X, de Sanjosé S, *et. al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 743.
49. Aiello-Crocifoglio V, Mora Macias T, Pérez Domínguez E. Morbilidad hospitalaria en el Instituto Nacional de Cancerología 1992-1994. Anuarios estadísticos.
50. Bosch F X, Muñoz N, de Sanjosé S, *et. al.* Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 750.
51. Schiffman M H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 394.
52. Bosch F X, Muñoz N, Shah K V, Meheus A. Second international workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer* 1992; 52: 171.
53. Baker V V, Hatch K D, Shingleton H M. Amplification of the *c-myc* proto-oncogene in cervical carcinoma. *J Surg Oncol* 1988; 39: 225.
54. Rofstad E K, Wahl A, Brustad T. Radiation sensitivity *in vitro* of cell isolated from human tumor surgical specimens. *Cancer Res* 1987; 47:317.
55. Deaun I, Peckham M J, Steel G G. The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival. *Cancer Radiother Oncol* 1984; 1: 317.
56. Fagundes H, Pérez C A, Grigsby P W, Lockett M A. Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1992; 24: 197.

57. Handbook for staging of cancer. American Joint Committee on Cancer. 1993. U.S.A. J. B. Lippincott Company. pp 161-168.
58. Benítez-Bribiesca L, Villanueva C, Freyre R, *et al.* Niveles de proteinasas séricas y alteraciones funcionales y morfológicas de las plaquetas en pacientes con carcinoma cérvico uterino. Correlación con el grado de progresión de la neoplasia. *Arch Invest Med (Méx)* 1986; 17: 211.
59. Zucker S, Lysik R M, Zarrabi M H, Moll U. Mr 92,000 type collagenase is increased in plasma with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 140.
60. Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, *et. al.* Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res* 1992; 52: 4548.
61. Muller D, Wolf C, Abecassis J, *et. al.* Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas *Cancer Res* 1993; 53: 165.
62. Lokeswar B L, Selzer M G, Block N L, Gunja-Smith Z. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 4493.
63. Ogilvie S J, Hailey J A, Juacaba S F, Lee E C G, Tarin D. Collagenase secretion by human breast neoplasms: a clinicopathologic investigation. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74: 19.
64. Van der Stappen J, Hendriks T, Wobbes T. Correlation between collagenolytic activity and grade of histological differentiation in colorectal tumors. *Int J Cancer* 1990; 45: 1071.
65. 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: 248.
66. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the

head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680.

67. Muskin R, Soreq H. Sensitive autoradiographic quantification of electrophoretically separated proteases. *Annal Biochem* 1981; 118: 252.

68. Vartio T, Baumann M. Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett.* 1989; 255: 285.

69. Bernhard E J, Muschel R J, Hughes E D. Mr 92,000 gelatinases release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* 1990; 50: 3872.

70. Tarin D, Hoyt B J, Evans D J. Correlation of collagenase secretion with metastatic colonization potential in naturally occurring murine mammary tumors. *Br J Cancer* 1982; 46: 266.

71. Gingras M C, Jarolin L, Finch J, Bowden J A, Greenber A H. 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.

72. Montgomery A M P, De Clerck Y A, Langley K E, Reisfeld R A, Mueller B M. Melanoma dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways. *Cancer Res* 1993; 53: 693.

73. Bellon G, Caulet T, Cam Y, *et al.* Immunohistochemical localization of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol* 1895. 66: 245.

74. Kubota T, Nakagawa T, Hosotani K, *et al.* Immunohistochemical study of extracellular matrix in schwannomas: *in vivo* and *in vitro* observations. *Brain Tumor Pathol* 1992; 9: 23.

75. Kenagy R D, Clowes A W. A possible role for MMP-2 and MMP-9 in the migration of primate arterial smooth muscle cells through native matrix. *Ann N Y Acad Sci USA* 1994; 732: 462.

76. Hart I R, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453.

77. Sipos E P, Tamargo R J, Wiengart J D, Bren H. Inhibition of tumor

angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci USA* 1994; 732: 263.

78. Montecagudo C, Merino M J, San-Juan J, Liotta L A, Stetler-Stevenson W. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990; 136: 585.

79. Iriinura T, Yamori T, Bennett S C, Ota D M, Cleary K R. The relationship of collagenolytic activity to stage of human colorectal carcinoma *Int J Cancer* 1987; 40: 24.

80. D'Errico A, Garbisa S, Liotta L A, Castronovo V, Stetler-Stevenson W, Grigioni W F. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki-67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 1991; 4: 239.

81. Pajouh M S, Nagle R B, Breath-Nach R, Finch J S, Brawer m K, Bowden G T. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117: 144.

82. Kusakawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 18.

83. Sasaguri Y, Komiya S, Sugama K, *et. al.* Production of matrix metalloproteinases 2 and 3 (stromelysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone. *Am J Pathol* 1992; 141: 611.

84. Shima I, Sasaguri Y, Kusakawa J, *et. al.* Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 2747.

85. Powell W C, Knox J D, Navre M, *et al.* Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1993; 53: 417.

86. Tuck A B, Wilson S M, Khokha R, Chambers A F. Different patterns of gene expression in *ras*-resistant and *ras*-sensitive cells. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 485.

87. Engel G, Popowicz P, Marshall H, *et. al.* Elevated stromelysin-1 and

reduced collagenase-IV expression in invasive rat embryo fibroblast expressing E1A deletion mutants plus T24-H-ras. *Int J Cancer* 1992; 51: 761.

88. Brown P D, Levy A T, Margulies I M K, Liotta L A, Stetler-Stevenson W. 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.

89. Zucker S, Lysik R M, Malik M, Bauer B A, Caamano J, Klein-Szanto A J P. Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung cancer cell lines and revertant cell lines: not an invariant correlation with metastasis. *Int J Cancer* 1992; 52: 366.

90. Laiho M, Keski-Oja J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: A review. *Cancer Res* 1989; 49: 2533.

91. Stearns M E, Wang M. Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 1993; 55: 878.

92. Eifel P J, Morris M, Oswald M J, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix: prognosis and patterns of failure in 367 cases. *Cancer* 1990; 65: 2507.

93. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 441.

94. Wilczynski S P, Bergen S, Walker J, Liao S-L, Pearlman L F. Human Papillomavirus and cervical cancer: analysis of histopathological features associated with different viral types. *Hum Pathol* 1988; 19: 697.

95. Martin J D, Hähnel R, McCartney A J, De Klerk N. The influence of estrogen and progesterone receptors on survival in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1986; 23: 329.

immunodeficient mice. *Cancer Res* 1993; 53: 417.

96. Werb Z. Proteinases and matrix degradation. En: Textbook of rheumatology. 3rd ed. W B Saunders. Philadelphia, U.S.A. p 300.

97. Polette M, Clavel C, Muller D, Abecassis J, Binnering I, Birembaut P. Detection of mRNAs encoding collagenase I and stromelysin 2 in carcinoma of the head and neck by *in situ* hybridization. *Inv Metastasis* 1991; 11: 76.

98. Muller D, Breathnach R, Engelmann A, *et al.* Expression of collagenase related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. *Int J Cancer* 1991; 48: 550.

99. Basset P, Wolf C, Rouyer N, *et al.* Stromelysin-3 in stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer* 1994; 74: 1045.

100. Majmudar g, Nelson B R, Jensen T C, Voorhees J J, Johnson T m. Increased expression of stromelysin-3 in basal cell carcinomas. *Mol Carcinogenesis* 1994; 9: 17.

101. Clavel C, Polette M, Doco M, Benninger I, Birenbaud P. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer Paris* 1992; 79: 261.

102. Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, *et al.* Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1843.

103. Matrisian L M, Bowden G T. Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 107.

104. Randall M E, Constable W C, Halm S S. Results of the radiotherapeutic management of carcinoma of the cervix with emphasis on the influence of histologic classification. *Cancer* 1988; 62: 48.

105. Nakajima M, Morikawa K, Fabra A, Bucana C D, Fidler I J. Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1890.

106. Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 5046.

107. Leighton J. A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1980.

108. Hoffman R M, Vescio R A, Redfern Ch H, Nelson T J, Ugoretz S, Stern P H. *In vivo*-like responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported

primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5029.

109. Sawaya R, Tofilon P J, Mohanam S, *et al.* Induction of tissue-type plasminogen activator and 72 kDa, type-14 collagenase by ionizing radiation in rat astrocytes. *Int J Cancer* 1994; 56: 214.

110. Rosenberg G A, Kornfeld M, Estrada E, Kelley R O, Liotta L A, Stetler-Stevenson W G. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barriers by type-IV collagenase. *Brain Res* 1992; 576: 203.

111. Duffy MJ, Plasminogen activators and cancer. *Blood Coag Fibrin* 1990; 1: 681.

112. Miller C H G. Protein degradation and proteolytic modification. En : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Ingraham J L, Brooks L K, Magasarrik B, Schaechter M, Umbarger E. (editores). American Society for Microbiology. U.S.A. 1995. p. 680.

113. Chung Ch H, Goldberg A L. Purification and characterization of protease So, a cytoplasmic serine protease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1983; 154: 231.

114. Hilders C G, Ras L, van Eendenburg J D, Nooyen Y, Fleuren G J. Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1994; 57: 805.

115. Opdenakker G, Damme J V. Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine* 1992; 4: 251.

116. Smith-McCune K K, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical carcinoma dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 800

117. Kapp D, Fischer D, Gutiérrez E, Kohorn E I, Schwartz P E. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariable analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1983; 9: 445.

118. Labrecque S, Matlashewski G J. Viability of wild type p53-containing and p53-deficient tumor cells following anticancer treatment: the use of human papillomavirus E6

to target p53. *Oncogene* 1995; 11: 387.

119. Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993; 67: 6476.