

Tesis Doctoral

Caracterización del sistema TGF- β /T β Rs en carcinomas de mama y pulmón murinos. Rol en la progresión tumoral

Daroqui, María Cecilia

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Daroqui, María Cecilia. (2004). Caracterización del sistema TGF- β /T β Rs en carcinomas de mama y pulmón murinos. Rol en la progresión tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3727_Daroqui

Cita tipo Chicago:

Daroqui, María Cecilia. "Caracterización del sistema TGF- β /T β Rs en carcinomas de mama y pulmón murinos. Rol en la progresión tumoral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3727_Daroqui

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

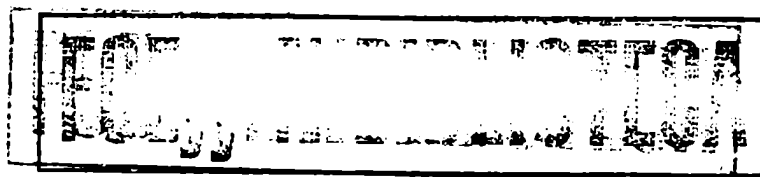


UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Tesis para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires**



Título:

**Caracterización del sistema TGF- β /TBRs en carcinomas de
mama y pulmón murinos. Rol en la progresión tumoral**

Autor:

María Cecilia Daroqui

Directora:

Dra. Lilia Lauría de Cidre

Directora Asistente:

Dra. Lydia Puricelli

Departamento de Biología Celular

Area Investigación

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

Año 2004

g r o w

"If it be true that the essence of life is the accumulation of experience through the generations, then one may perhaps suspect that the key problem of biology is how living matter manages to record and perpetuate its experiences..."

Max Delbruck, 1949

A mi familia

INDICE

	Pág.
Resumen	1
Abstract	3

PRIMERA PARTE – INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

Procesos de invasión y metástasis	5
Proteasas y cáncer	13
Factores de crecimiento	18
Factores de crecimiento transformante tipo beta (TGF- β)	22
TGF- β en procesos fisiológicos	32
Tejido mamario y cáncer de mama	33
Cáncer de pulmón	36
TGF- β y cáncer	37

CAPITULO II – OBJETIVOS	42
--------------------------------	-----------

SEGUNDA PARTE – METODOLOGÍA GENERAL

CAPITULO III – MODELOS EXPERIMENTALES	44
--	-----------

CAPITULO IV – MATERIALES Y MÉTODOS	54
---	-----------

TERCERA PARTE – RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO
--

CAPITULO V – CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENDÓGENO TGF- β /T β RS

V.1. Actividad biológica de TGF- β	74
V.2. Expresión de TGF- β	77
V.3. Expresión de los receptores de TGF- β , T β Rs	77

CAPITULO VI - VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDAS POR TGF- β

VI.1. Familia Smads	79
VI.2. Otras vías de transducción de señales	79

CAPITULO VII - EFECTO DE TGF- β SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO

Análisis transcripcional	82
--------------------------	----

CAPITULO VIII - EFECTOS *IN VITRO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA

VIII.1. Efecto de TGF- β sobre la proliferación celular	84
VIII.2. Acción de TGF- β sobre la secreción de proteasas	87
VIII.2.1. Secreción de metaloproteinasas (MMPs)	87
VIII.2.2. Sistema de activación del plasminógeno	91
VIII.2.2.a) Actividad del uPA secretado	91
VIII.2.1.b) Actividad del uPA asociado a membrana (mb-uPA)	91
VIII.2.1.c) Actividad del inhibidor de uPA (PAI)	92
VIII.3. Efecto de TGF- β sobre el citoesqueleto de actina	97
VIII.4. Efecto de TGF- β sobre la migración celular	103
VIII.5. Acción de TGF- β sobre la invasión <i>in vitro</i>	103

CAPITULO IX - EFECTOS *IN VIVO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA

IX.1. Efecto de TGF- β sobre la capacidad angiogénica	107
IX.2. Acción de TGF- β sobre el crecimiento tumoral	107
IX.3. Efecto de TGF- β sobre la formación de metástasis	109

CAPITULO X – TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA MURINO

DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	132

CUARTA PARTE – RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO

CAPITULO XI - CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENDÓGENO TGF- β /T β RS

XI.1. Expresión de TGF- β	135
XI.2. Expresión de T β Rs	135
XI.3. Actividad biológica de TGF- β	137

CAPITULO XII - VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDAS POR TGF- β

XII.1. Familia Smads	139
XII.2. Otras vías de señalización	139

CAPITULO XIII - EFECTOS *IN VITRO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN

XIII.1. Efecto de TGF- β sobre la proliferación celular	143
XIII.2. Acción de TGF- β sobre la secreción de proteasas	143
XII.2.1. Secreción de metaloproteinasas (MMPs)	143
XII.2.2. Sistema de activación del plasminógeno	143
XIII.3. Efecto de TGF- β sobre el citoesqueleto de actina	147
XIII.4. Efecto de TGF- β sobre la migración celular	147

CAPITULO XIV - EFECTOS *IN VIVO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN

Acción de TGF- β sobre la capacidad angiogénica	151
---	-----

CAPITULO XV - TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN MURINO

DISCUSIÓN	153
-----------	-----

CONCLUSIONES	160
--------------	-----

CONCLUSIONES GENERALES	163
------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	164
--------------	-----

AGRADECIMIENTOS	184
-----------------	-----

ABREVIATURAS	187
--------------	-----

RESÚMEN

En este trabajo analizamos el rol de TGF- β en la progresión tumoral, empleando dos modelos de adenocarcinoma murino, de mama y de pulmón.

Nuestro modelo de tumor de mama está constituido por los tumores parentales M3 y MM3, poco y altamente metastásicos, respectivamente, y por las líneas celulares derivadas LM3 y LMM3, altamente invasivas y metastásicas. Todas las células de nuestro modelo expresan el sistema completo TGF- β y sus receptores específicos T β Rs, y éste es funcional.

Además, mediante estudios *in vitro* determinamos que TGF- β activa la vía de transducción de señales Smads y otras vías, como p38Mapk y MEK/ERK, en las células de carcinoma de mama de nuestro modelo. En cuanto a su acción biológica, TGF- β tiene un efecto antiproliferativo sobre los cultivos primarios de M3 y MM3, mientras que las líneas son resistentes a dicho efecto. Por otra parte, TGF- β induce la actividad de MMP-9 en todas las células de nuestro modelo. Determinamos por primera vez que las vías de señalización p38Mapk y MEK/ERK bloquean la inducción de MMP-9 por TGF- β y que los receptores de señalización T β RI y T β RII son esenciales en esta respuesta. Además, estudiamos el rol de TGF- β sobre la expresión y/o actividad de distintos componentes del sistema de activación del plasminógeno, incluyendo activadores como el uPA y el uPA unido a membrana, e inhibidores como PAI-1. Detectamos que TGF- β inhibe el balance neto de este sistema en las células poco metastásicas, mientras que lo estimula en las células de fenotipo más agresivo.

Por otro lado, analizamos la función de TGF- β en la reorganización del citoesqueleto de actina y determinamos que TGF- β no modula las tropomiosinas ni la proteína HSP27, moléculas relacionadas con actina. Sin embargo, demostramos por primera vez que la actividad del complejo Arp2/3, fundamental en la polimerización de actina, aumenta en respuesta a TGF- β , si bien su consecuencia biológica debe aún esclarecerse mediante otros estudios. Además, TGF- β induce una leve remodelación de la actina cortical en nuestro modelo, sin producir cambios fenotípicos como la formación de fibras de stress y la transición epitelio-mesenquimática como ocurre en sistemas epiteliales no-tumorigénicos. Asimismo, determinamos que la vía de

señalización MEK/ERK bloquea la formación de fibras de stress en las células tumorales en estudio y que además está involucrada en la inducción de la migración celular por TGF- β , junto con la vía p38Mapk.

Por otra parte, TGF- β estimula la capacidad invasiva *in vitro* de todas las células de nuestro modelo de tumor de mama. Observamos que la presencia de T β RI y T β RII funcionales, así como las vías de señalización p38Mapk y MEK/ERK, son esenciales en este proceso. Estos datos son muy novedosos, ya que no ha sido descrito previamente un mecanismo de acción de TGF- β en la invasión celular.

Mediante estudios *in vivo* determinamos que TGF- β no modula la capacidad angiogénica en nuestro modelo. Por otro lado, empleando células LM3 transfectadas con formas dominantes negativas de los receptores de señalización de TGF- β , encontramos que la tasa de crecimiento tumoral y la capacidad metastásica de las células de adenocarcinoma mamario en estudio dependen de un sistema funcional TGF- β /T β Rs.

Por otro lado, estudiamos el sistema TGF- β /T β Rs en la línea de adenocarcinoma de pulmón LP07, altamente metastásica.

Encontramos que estas células han perdido la capacidad de expresar la proteína TGF- β , respecto del tumor P07 que le dio origen. Además, determinamos que las células LP07 expresan los receptores de señalización T β RI y T β RII.

Por medio de estudios *in vitro* detectamos que si bien las células LP07 no producen TGF- β , la vía de Smads y otras vías de transducción de señales pueden ser activadas por TGF- β , por lo que son capaces de responder a la citoquina. Así, TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento de LP07. Además, TGF- β inhibe marcadamente la actividad de las proteasas uPA y MMP-2 en las células LP07 y controla su motilidad *in vitro*. Y también es capaz de inhibir la angiogénesis *in vivo* de LP07.

De este modo, nuestros resultados indican que TGF- β podría funcionar como un supresor tumoral en nuestro modelo de adenocarcinoma de pulmón, y que la pérdida de funcionalidad del sistema TGF- β /T β Rs podría contribuir a la progresión tumoral en estas células.

ABSTRACT

In the present work we have studied the role of TGF- β in tumor progression, by using a mammary and a lung murine adenocarcinoma experimental models.

The mammary tumor model is composed by two closely related tumors, the poorly metastatic M3 and the highly metastatic MM3 ones, as well as the derived highly invasive and metastatic cell lines, LM3 and LMM3. We determined that all these cell types express both TGF- β and its receptors (T β Rs), so they present the complete TGF- β /T β Rs system.

By *in vitro* studies we found that TGF- β induces the activation of different signaling pathways in our model, including Smads, p38Mapk and MEK/ERK. Besides, TGF- β exerts an antiproliferative action on M3 and MM3 primary cultures while the derived cell lines are resistant to this effect. On the other hand, TGF- β stimulates MMP-9 activity in all the cell types of our tumor model. We show here for the first time that p38Mapk y MEK/ERK pathways block MMP-9 by TGF- β , as well as that the TGF- β signaling receptors, T β RI and T β RII, are key components of this response. We also studied the role of TGF- β on the expression and/or activity of distinct components of the plasminogen activation system, including activators like uPA and membrane-bound uPA and inhibitors like PAI-1. We found that TGF- β inhibits the net balance between activators and inhibitors in the poorly metastatic cells, enhancing it in those cells with the more aggressive phenotype.

On the other hand, we studied TGF- β action on actin cytoskeleton reorganization and we determined that TGF- β is not able to modulate the actin-related molecules tropomyosins and HSP27. However, we show here for the first time that TGF- β enhances Arp2/3 complex activity, although its biological significance remains to be fully determined. Besides, we found that TGF- β induces only a slight remodelling on the cortical actin in our tumor model, without affecting the cellular phenotype like the formation of stress fibers and the epithelial-to-mesenchymal transition showed by some normal epithelial cells. We also demonstrate that the MEK/ERK pathway blocks stress fiber formation in the tumor cells studied here, and that this pathway is also implicated in TGF- β -mediated cell migration, together with the p38Mapk pathway.

Besides, we found that TGF- β induces the *in vitro* invasive ability of all the cell types studied here, and that this effect requires T β R I and T β R II activity as well as p38Mapk and MEK/ERK pathways. This is the first time that a signaling pathway is implicated in TGF- β -induced cellular invasion.

By *in vivo* studies we showed that TGF- β is not able to modulate the angiogenic ability of the mammary tumor cells studied here. Finally, by using LM3 cells stably transfected with dominant negative forms of TGF- β signaling receptors, we determined that the tumor growth rate as well as the ability to form metastases depend on a functional TGF- β /T β Rs system.

On the other hand, we studied the role of the TGF- β /T β Rs system in the highly metastatic lung tumor LP07 cell line.

We found that LP07 cells do express T β Rs but they have lost the ability to express TGF- β at the protein level showed by P07 parental cells.

Using *in vitro* studies we detected that despite LP07 cells do not produce TGF- β , Smads and other signaling pathways can be activated by TGF- β , so these cells are able to respond to the cytokine. Besides, TGF- β markedly inhibits the activity of proteases like uPA and MMP-2 in LP07 cells as well as it reduces the *in vivo* angiogenic ability of these cells.

So, our data suggest that TGF- β could function as a tumor suppressor in our lung tumor model, and that a disruption in the TGF- β /T β Rs system regulation may thus contribute to tumor progression.

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

PROCESOS DE INVASION y METASTASIS

El diagnóstico y tratamiento de los tumores sólidos comienza en general en un estadio tardío, cuando la mayoría de los pacientes presentan metástasis (Kohn y Liotta, 1995). La metástasis es un fenómeno de profunda relevancia clínica atribuible a la capacidad que presentan las células neoplásicas de diseminarse y generar tumores secundarios en sitios distantes del tumor primario (Price y col., 1997; Nicolson, 1998).

La **metástasis** es la consecuencia de un proceso selectivo que ocurre a través de una serie secuencial de pasos mediante los cuales la célula tumoral se disocia del tumor primario, invade los tejidos del huésped, viaja por la circulación sanguínea y/o linfática, escapa de la vigilancia inmunológica, se detiene en un órgano "blanco", lo invade y finalmente prolifera en un nuevo sitio para formar un tumor secundario (Poste y Fidler, 1980) (Fig. I.1). La célula capaz de desarrollar metástasis debe atravesar exitosamente cada etapa de esta secuencia, ya que si fracasa en uno de estos pasos, será eliminada (Nakajima y col., 1990). De este modo, se cree que sólo un pequeño porcentaje de células son capaces de alcanzar la circulación, sobrevivir, colonizar el órgano "blanco" y desarrollar nódulos metastásicos.

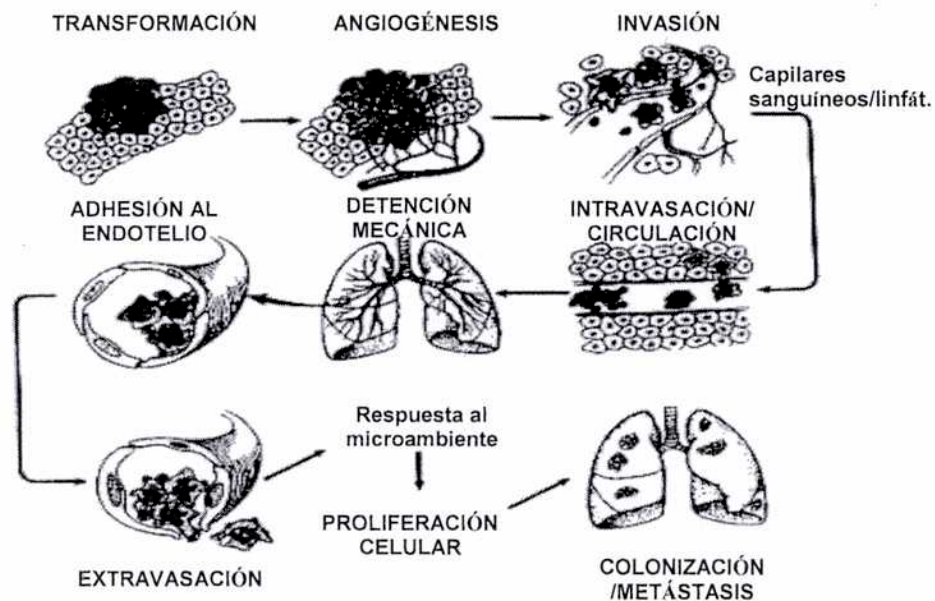


Fig. I.1. Cascada metastásica.

Se ha postulado que la formación del tumor primario consta en principio de una etapa avascular, donde las primeras células transformadas deben proliferar en condiciones nutricionales de gran deficiencia. Pero para que un tumor pueda nutrirse y continuar creciendo más allá de unos pocos milímetros de diámetro, debe ser vascularizado (Folkman, 1990; Liotta y col., 1991). La neovascularización de un tumor se denomina **angiogénesis** y consiste en el desarrollo de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes. Este proceso es complejo y consiste típicamente en los siguientes pasos: disolución de la **membrana basal (MB)** de los vasos, usualmente en una vénula post-capilar; migración de células endoteliales hacia el tumor; proliferación de estas células; canalización, ramificación y formación de loops vasculares; y por último formación de nuevas MB. Se cree que la neovascularización es un prerequisite para la expansión clonal rápida asociada con la formación de tumores macroscópicos y es crítica para la supervivencia de las células tumorales (Engbring y Kleinman, 2003). El proceso de angiogénesis es regulado por múltiples factores, que se clasifican como pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Estos factores pueden ser liberados y/o inducidos por las células tumorales y pueden actuar directamente sobre las células endoteliales o indirectamente a través de la activación de células inflamatorias locales (Weinstat-Saslow y Steeg, 1994).

Existe una relación recíproca entre la célula metastásica y el microambiente del órgano blanco, ya que las células tumorales pueden liberar factores a los cuales las células normales responden, produciendo a su vez factores que afectan a la propia célula tumoral (Park y col., 2000a). Las interacciones entre las células tumorales y el medio extracelular, así como también las interacciones con otras células del huésped, definen en gran parte el comportamiento metastásico (Delpech, 1991).

Tanto la invasión local de un tumor primario, como la invasión denominada "secundaria" a nivel del órgano blanco, dependen de la capacidad de la célula tumoral para adherirse a la **matriz extracelular (MEC)**, degradar sus componentes y luego migrar a través de esa matriz parcialmente degradada. La repetición cíclica de estos tres procesos permite a la célula tumoral penetrar en los tejidos vecinos (Nagase y Woessner, 1999; Morgunova y col.,

1999). Entonces, se hace evidente la importancia de los procesos de migración celular e invasión tumoral, donde la matriz extracelular juega un rol esencial.

La MEC es una red tridimensional compleja en remodelación constante constituida por macromoléculas de gran tamaño y que provee información contextual y un sostén para la adhesión celular y la migración. Está compuesta principalmente por colágeno y glicosaminoglicanos; puede presentar además laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina (Hay, 1991) (**Tabla I.I**). Además de ser un soporte para las células, los componentes de la MEC pueden tener otras funciones, como la de activar vías de señalización intracelulares mediante su unión a receptores de adhesión en la membrana celular; o bien pueden secuestrar **factores de crecimiento (GF)** o presentarlos a las células, modulando así la transducción de señales.

Tabla I.I. Composición proteica de la MEC.

TIPO	COMPONENTE	FUNCIÓN
Colágeno	Colágenos tipo I, III, IV y V	Estructura de sostén de las MB y matrices intersticiales
Glicoproteínas	Laminina	Adhesión entre células epiteliales y endoteliales
	Fibronectina	Importante en procesos de remodelación tisular y reparación de heridas
	Vitronectina	Participa de la migración de células normales y transformadas
	Entactina	Estabiliza los distintos componentes de la MEC

Las MEC pueden formar estructuras altamente especializadas, como las membranas basales donde se apoyan los epitelios. La MB está compuesta mayoritariamente por colágeno IV, si bien otras moléculas como laminina también se encuentran en esta matriz (Birk y col., 1991). Es sintetizada por las células que soportan, por lo que su composición es variable de acuerdo a los distintos tejidos (Yurchenko y Schitny, 1990). Durante la transición

desde un carcinoma benigno a uno invasivo se producen cambios en la organización de la MB, que involucran pérdida de parte de sus componentes. Esto puede deberse a una síntesis alterada; a un incorrecto ensamblado; o a un incremento en la degradación de la MB causado por proteasas inducidas por las células tumorales (Stetler-Stevenson y col., 1993).

Normalmente, las células se unen a la MEC para mantener la integridad tisular. La adhesión célula-célula determina la polaridad de las células y participa en el mantenimiento de los tejidos. Su disminución permite a las células tumorales desobedecer el orden tisular, lo que resulta en la destrucción de la estructura tisular, marca morfológica de los tumores malignos. Durante la progresión del cáncer, se reduce la adhesión intercelular, las células se vuelven más móviles y adquieren capacidad invasiva. Las uniones adherentes intercelulares son regiones especializadas de la membrana plasmática conectada con los filamentos de actina del citoesqueleto. Las cadherinas son las principales moléculas de adhesión célula-célula, de las cuales la E-cadherina es la más importante en los tejidos epiteliales. La **E-cadherina** es una glicoproteína transmembrana dependiente de calcio, que se conecta con los filamentos de actina mediante la proteína citoplasmática **β -catenina**. La E-cadherina es considerada un gen supresor de tumor; y existe evidencia de inactivación del sistema de adhesión por E-cadherina por diversos mecanismos durante la carcinogénesis humana (Frixen y col., 1991; Hirohashi y Kanai, 2003).

El proceso de **migración celular** es un ciclo de múltiples pasos, que incluye la extensión de protrusiones, la pérdida de adhesión celular, y la polimerización del citoesqueleto de actina (Lee y col., 1993; Lauffenburger y Horwitz, 1996). Entre los factores que estimulan la capacidad migratoria, se encuentran factores secretados por la propia célula tumoral, GF y componentes de la MEC (Stracke y col., 1992). Se ha observado en muchos modelos experimentales y en tumores humanos que las células tumorales más invasivas y metastásicas presentan un mayor grado de motilidad (Aznavorian y col., 1990; Stracke y col., 1991).

Dentro de las proteínas que regulan la dinámica y organización del citoesqueleto de actina se encuentran entre otras la α -actinina, las miosinas y las tropomiosinas, el complejo

Arp2/3, y otras moléculas de asociación a actina como HSP27 y MLC2 (Ayscough, 1998) (Fig. 1.2).

El **complejo Arp2/3** tiene un rol fundamental en la remodelación del citoesqueleto de actina, al estimular el proceso de nucleación *de novo* de monómeros de actina a partir de filamentos preexistentes, dando como resultado la polimerización de estructuras de actina ramificadas (Dayel y col., 2001, Amann y Pollard, 2001). Recientemente, se describió que el complejo Arp2/3 es unido y activado por miembros de la familia de proteínas WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins*), mediante un dominio C-terminal denominado VCA (*Verprolin, Cofilina o central, Acidic*), lo que lleva a la polimerización de actina mediada por miembros de la familia de quinasas Rho (Rohatgi y col., 1999; Suetsugu y col., 2001; Cory y col., 2003).

Las **tropomiosinas (TM)** son proteínas rígidas que se unen a lo largo de los filamentos de actina, contribuyendo en el ensamblado y estabilización de estos filamentos en células no-musculares (Pawlak y Helfman, 2001). Existen múltiples isoformas de TM de alto peso molecular, que son expresadas por splicing alternativo de los genes α -TM y β -TM (Goodwin y col., 1991). La TM1 es un producto del gen β -TM; mientras que las isoformas TM2, 3 y 6 son productos del gen α -TM (Temm-Grove y col., 1998).

La *Heat Shock Protein* **HSP27** es un miembro de la familia de pequeñas HSP. Se expresa en forma constitutiva en una variedad de tejidos de Mamíferos. Además de sus funciones en la supervivencia celular durante el stress, interviene en la organización de microfilamentos de actina en respuesta a factores de crecimiento. De este modo, tiene una actividad de chaperona *in vitro* y modula la dinámica de los filamentos de actina, uniéndose a sus extremos y estabilizándolos (Jakob y col., 1993). Los cambios en el citoesqueleto de actina son producidos por HSP27 una vez que ésta es fosforilada por quinasas en las vías de señalización de diversas citoquinas (Stokoe y col., 1992).

Además, la proteína **MLC2** (*Myosin II regulatory Light Chain*) también forma parte del ensamblado de actina. Al ser activada por fosforilación, MLC2 induce el entrecruzamiento de los filamentos de actina, lo cual resulta en la formación y mantenimiento de haces paralelos de actina muy estables denominados fibras de stress (SF) (Chrzanowska-Wodnicka y BurrIDGE, 1996).

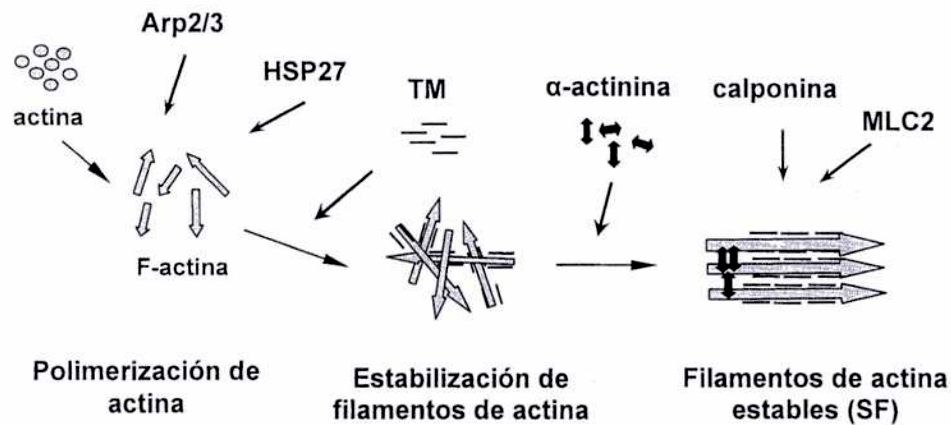


Fig. I.2. Moléculas relacionadas con actina y formación de SF.

El proceso de **invasión** implica la degradación de MB y de la MEC por las células tumorales y es crucial para el desarrollo exitoso de la metástasis. Este proceso se inicia con la adhesión de las células tumorales a la MB y continúa con su disolución mediante enzimas proteolíticas y con la migración celular a través de la MEC alterada, la cual es inducida en parte por factores quimioattractantes (**Fig. I.3**). La invasión involucra la participación de numerosas moléculas con actividades específicas, como moléculas de adhesión y receptores (integrinas, glipicanos) (Zetter, 1993), enzimas proteolíticas (serino- y cisteín-proteasas, metaloproteinasas) (Miguez y col., 1986) y diversas citoquinas y factores de crecimiento (Tripathy y Benz, 1994).

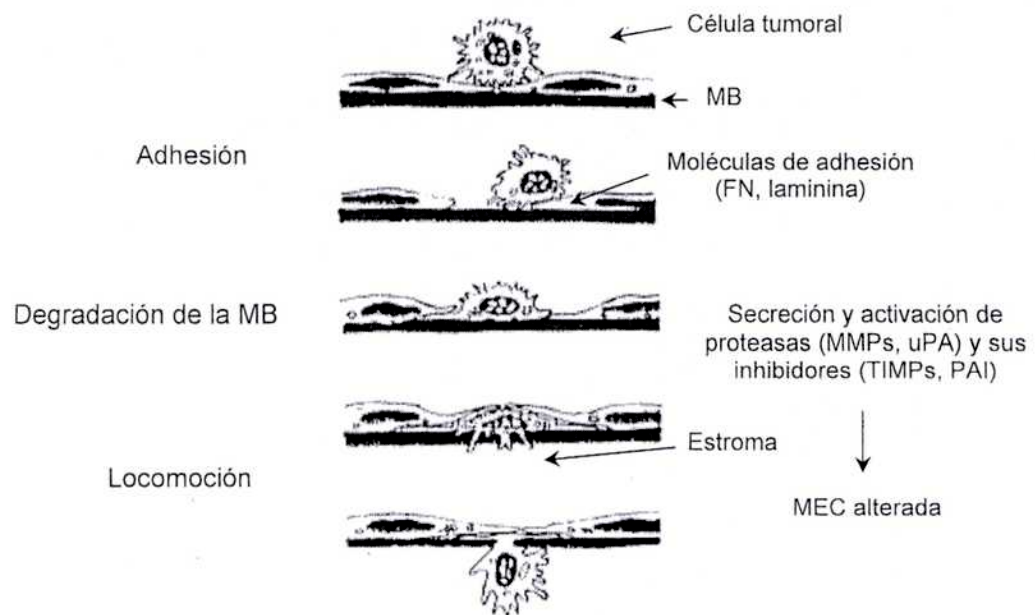


Fig. 1.3. Proceso de invasión tumoral.

Si bien se acepta que la cascada metastásica involucra distintas etapas, en la actualidad sus determinantes genéticos son poco entendidos, así como los mecanismos empleados por las células tumorales y/o las células del huésped para llevar a cabo cada uno de estos pasos. A nivel mecanístico, se considera que los procesos de invasión y metástasis están relacionados, ya que ambos utilizan estrategias similares que involucran cambios en la relación célula-microambiente y la activación de proteasas extracelulares (Hanahan y Weinberg, 2000).

El potencial invasivo y metastásico de las células tumorales en general se incrementa durante la progresión tumoral. Esto conlleva alteraciones genéticas, llevando a la expresión de diferentes proteínas, como GF, proteasas, moléculas de adhesión y factores angiogénicos. Estudios clínicos han indicado una correlación entre la sobreexpresión de algunas de estas proteínas y un mayor riesgo de metástasis, sugiriendo que el fenotipo metastásico se desarrolla a través de una acción concertada de varios genes.

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las bases moleculares de la progresión tumoral, lo cual permitirá mejorar el diagnóstico y el tratamiento

de la enfermedad. Se ha demostrado que el establecimiento de un foco tumoral primario es el resultado de múltiples alteraciones genéticas, que llevan al crecimiento celular descontrolado. Estas alteraciones pueden involucrar tanto la activación de oncogenes como la inactivación de genes supresores de tumor. Hasta el momento no se ha identificado un único gen que regule el proceso metastásico, hecho no sorprendente considerando su naturaleza de etapas múltiples.

Para el desarrollo de metástasis se necesita de la expresión coordinada de muchos genes. Pero se requiere un solo gen para bloquear la metástasis, ya que la incapacidad de completar algún paso de la cascada impide a la célula metastatizar (Fidler y Radinsky, 1996). Así como se conoce la existencia de genes supresores y promotores del crecimiento y progresión tumoral, se conocen ahora genes que participan en la formación de metástasis. Se han descrito genes promotores de metástasis o "metastogenes", que contribuyen a la formación de focos metastásicos a partir de un tumor en crecimiento (Lucke-Huhle, 1994; Zoller, 1995). Por otra parte, recientemente, se ha definido una nueva clase de genes denominados "genes supresores de metástasis" (Steeg y col., 1988), identificados por su expresión reducida en las células tumorales metastásicas, comparado con lo encontrado en las células tumorigénicas pero no metastásicas, generalmente en modelos experimentales. Los genes supresores de metástasis suprimen la formación de metástasis espontáneas macroscópicas, sin afectar la tasa de crecimiento del tumor primario. Como su nombre implica, estos genes son distintos de los genes supresores de tumor, que suprimen el crecimiento tumoral. Los genes supresores de metástasis parecen operar en distintas fases del proceso metastásico, incluyendo la etapa final de colonización clínicamente detectable. Además, se cree que la pérdida de función de estos genes tienen un rol importante en la adquisición de la capacidad metastásica. Debido a todo esto, se los considera potenciales agentes terapéuticos (Yang y col., 1997; Steeg, 2003).

PROTEASAS y CÁNCER

Tanto en la fisiología normal de los tejidos como en la progresión del cáncer, la acción de enzimas proteolíticas es clave, debido a que contribuyen directa o indirectamente a las capacidades invasiva y metastásica, principalmente mediante la degradación de la MEC (Egeblad y Werb, 2002). Las proteasas pueden ser producidas tanto por las propias células tumorales como por las células del estroma y las células inflamatorias del huésped. Pero se conoce que las células tumorales producen mayores cantidades de estas enzimas que las células normales de la misma estirpe (Mac Dougall y Matrisian, 1995).

Existen dos grandes familias de enzimas proteolíticas estrechamente relacionadas con el cáncer, la familia de las metaloproteinasas y el sistema de activación del plasminógeno.

Las **metaloproteinasas** ó MMPs constituyen una amplia familia de endopeptidasas que requieren de la unión de un átomo de cinc en su sitio activo y de la presencia de calcio en el medio extracelular para desarrollar su actividad. Son secretadas en forma de zimógenos y se activan mediante diversos mecanismos, que incluyen la acción de las propias MMPs y de otras proteasas como el sistema de activación del plasminógeno o las catepsinas (Nagase, 1997 y 1999). Asimismo, su actividad es específicamente controlada por inhibidores endógenos denominados TIMPs (Matrisian, 1990).

Hasta el momento se conocen 25 MMPs en humanos y moléculas homólogas en distintas especies (**Tabla I.II**). En su conjunto, las MMPs presentan la capacidad de degradar todos los componentes de la MEC (Nelson y col., 2000). Sin embargo, cada una de ellas exhibe cierta selectividad de acción sobre un sustrato particular (Nagase y Woessner, 1999; Massova y col., 1998). Las MMPs denominadas "colagenasas tipo IV" o "gelatinasas" son MMPs que se secretan, a diferencia de las MT-MMPs, que están unidas a membrana. Las colagenasas tienen la capacidad de degradar colágenos no fibrilares y colágenos fibrilares desnaturalizados (gelatina). Hasta el momento, las gelatinasas son las únicas MMPs descritas capaces de clivar colágeno laminar tipo IV, que es el principal componente de las MB. La gelatinasa-A ó **MMP-2** y la gelatinasa-B ó **MMP-9** son las MMPs más fuertemente vinculadas con el proceso invasivo (Chambers y Matrisian, 1997; Werb, 1997).

Tabla I.II. Proteasas involucradas en la invasión tumoral y la metástasis.

FAMILIA DE PROTEASAS	ENZIMAS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
ADAMs	20 isoformas (ADAM-1, -2, etc.)	Proteólisis pericelular Adhesión Señalización intracelular
Aspartil	Catepsina D	Degradación lisosomal de proteínas
Cisteíno	Catepsina B	Amplio espectro de acción Activa uPA y MMPs
Glicosidasas	Hialuronidasa Heparanasa	Degrada ácido hialurónico Degrada heparinas; heparán sulfato
Serino	Activadores del plasminógeno: uPA (tipo uroquinasa) tPA (tisular) Plasmina	Activa plasminógeno a plasmina Degrada componentes de MEC Degrada componentes de MEC Activa uPA y MMPs
Metaloproteinasas	Colagenasa intersticial Estromelisin Gelatinasas Matrilisinas MT-MMPs (o de membrana)	Degrada colágeno tipo I Degradan glicosamino y proteoglicanos Degradan colágeno tipo IV y gelatina Degradan caseína y elastina Proteólisis pericelular. Activan MMP-2

Las células tumorales pueden producir MMPs y/o ser capaces de inducir su expresión por parte de las células del estroma, ya sea en forma directa o indirectamente mediante la secreción de factores paracrin, como citoquinas y GF (Sternlicht y Werb, 2001). Algunas MMPs son exclusivamente producidas por células tumorales, mientras que otras son expresadas únicamente por células del estroma peritumoral.

Las MMPs tienen una importante participación en el proceso de angiogénesis tumoral, ya que un microambiente rico en proteasas conduce a una mayor capacidad

migratoria e invasiva de las células endoteliales angiogénicamente activas. También pueden actuar como moléculas pro-angiogénicas o anti-angiogénicas (Stetler-Stevenson, 1999). Así, por ejemplo, MMP-2 activa funciona como un factor pro-angiogénico al ejercer su acción fibrinolítica por unión a integrinas de membrana (Xu y col., 2001). Por otra parte, se ha descrito que niveles elevados de MMP-9 son pro-angiogénicos, mediante la inducción de VEGF (Bergers y col., 2000). Sin embargo, estudios muy recientes indican una nueva vía de acción antiangiogénica de MMP-9, mediante la liberación de un fragmento denominado "tumstatina", que parece inhibir tanto la angiogénesis como el crecimiento tumoral (Hamano y col., 2003).

Como se mencionó anteriormente, varios miembros de la familia de MMPs juegan un rol crítico en la migración e invasión tumoral y en la formación de metástasis (Tryggvason, 1993). Se han detectado niveles elevados de MMP-9 tisulares y circulantes en pacientes con cáncer de mama y colorrectal, así como aumento de MMP-2 en pacientes con cáncer de pulmón y ovario (Zucker y col., 1993; Garbisa y col., 1992). Menos se conoce acerca de la actividad de estas proteasas en relación al cáncer. Trabajos recientes demostraron que la actividad de MMP-9 está elevada en el plasma de pacientes con cáncer de mama, pulmón y cabeza y cuello (Fariás y col., 2000; Ranuncolo y col., 2002).

El **sistema de activación del plasminógeno** es complejo y comprende dos moléculas activadoras del plasminógeno, una tipo Uroquinasa (uPA) y otra Tisular (tPA); el receptor de superficie celular específico uPAR; el plasminógeno, sustrato de ambos activadores; el producto de su acción catalítica, la plasmina; y los inhibidores específicos, PAI-1 y PAI-2 (Blasi y col., 1987) (**Fig. 1.4**).

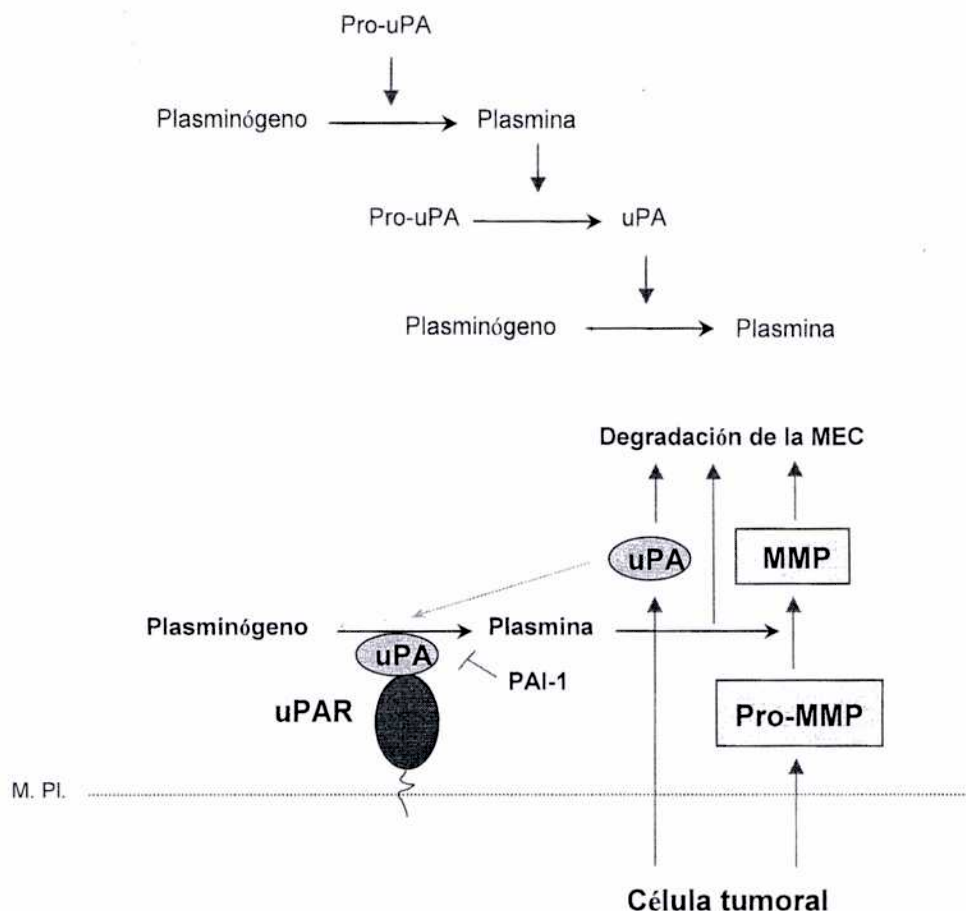


Fig. I.4. Sistema de activación del plasminógeno.

Este sistema es central a un amplio espectro de procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos, que incluyen fibrinólisis, inflamación, formación de placas ateroscleróticas, remodelación de matrices durante la cicatrización de heridas, invasión tumoral, angiogénesis y metástasis (Blasi y col., 1987; Choong y Nadesapillai, 2003).

El uPA es una serino-proteasa secretada como pro-enzima, que se origina por clivaje proteolítico de una cadena precursora única y que presenta una amplia especificidad de sustrato. El uPA es capaz de degradar *per se* componentes de la MEC, pero su función principal es la de activar el plasminógeno a plasmina, como una primera etapa en la degradación de la MEC (Blasi y col., 1987).

La plasmina es una serino-proteasa fibrinolítica capaz de degradar componentes de la MEC, y también de activar MMPs, representando de este modo un sistema proteolítico para los procesos de migración y reparación/remodelación tisular (Preissner y col., 2000).

Además, su acción induce un mecanismo de feedback positivo, a través de la activación de pro-uPA (Chapman, 1997).

El uPA, como casi todas las proteasas, tiene inhibidores endógenos que controlan la proteólisis celular en condiciones fisiológicas (Laiho y Keski-Oja, 1989). Dentro de los inhibidores específicos de uPA, PAI-1 desempeña un rol predominante, principalmente debido a su eficacia de acción. PAI-1 es parte de las serpinas (*serine protease inhibitor*), inhibidores que se unen a la proteasa blanco en una relación estequiométrica (Murphy y col., 1992).

El receptor específico de uPA, uPAR, es una proteína altamente glicosilada, de múltiples funciones (Moller, 1993). La activación del plasminógeno a plasmina ocurre cuando el uPA se une a su receptor, lo que focaliza la actividad degradativa de uPA en la periferia celular y acelera ~40 veces la proteólisis pericelular, comparada con la del uPA soluble (Ossowski, 1988; Koshelnick y col., 1999). Independientemente de su actividad catalítica, el uPAR está involucrado en la señalización celular, interacciones con integrinas, motilidad celular, adhesión, invasión y angiogénesis (Laiho y Keski-Oja, 1989; Wei y col., 1996).

Se ha descripto ampliamente que el uPA es un determinante crítico en la invasión tumoral (Yu y Schultz, 1990). Se ha encontrado correlación entre la producción de uPA y la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales (Laiho y Keski-Oja, 1989; Hearing y col., 1988). Además, niveles elevados de uPA se correlacionan con mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Foekens y col., 1992; Duggan y col., 1995). Algo similar se observó en cáncer de pulmón (Veale y col., 1990; Pedersen y col., 1994), así como en cáncer de ovario, colorrectal y otros tipos (Kobayashi-Fijishiro y Terao, 1994; Sier y col., 1994). Por otra parte, la expresión de PAI se regula negativamente en los tumores donde se detecta un aumento en la expresión de uPA, si bien esto no ocurre siempre. Esto hace que el balance entre proteasas e inhibidores se desplace hacia la proteólisis, estableciendo un fenotipo invasivo y metastásico (Laiho y Keski-Oja, 1989). Pero el sistema de activación del plasminógeno es aún más complejo, ya que por ejemplo altos niveles de PAI-1 también se correlacionan con mal pronóstico en algunos tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama (Grondahl-Hansen y col., 1993; Tsuchiya y col., 1997).

FACTORES DE CRECIMIENTO

El éxito de las células tumorales en el establecimiento de focos metastásicos en el órgano blanco está regulado en parte por la acción de factores reguladores del crecimiento producidos tanto por las propias células tumorales como por las células del huésped (Tripathy y Benz, 1994; Laiho y Keski-Oja, 1989).

Los **factores de crecimiento (GF)** son polipéptidos que pertenecen a la gran familia de las Citoquinas. Son moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular, que ejercen sus efectos a través de un mecanismo autocrino o paracrino. Los GF pueden ser secretados en forma de pro péptidos latentes o inactivos, que ante determinados estímulos son activados extracelularmente para inducir una respuesta biológica. Además, poseen acción pleiotrópica, ya que tienen la capacidad de afectar distintos procesos biológicos en una misma célula blanco, o bien de inducir diferentes respuestas sobre distintos tipos celulares.

Si bien los GF fueron clásicamente definidos como estimuladores de la proliferación celular, actualmente se conoce que presentan muchas funciones, como la regulación de la diferenciación celular y de proteínas relacionadas con el control de la proliferación celular (ciclinas, CDKs y CDIs); la modulación de los componentes de la MEC y de la capacidad migratoria celular (Sheng y col., 1997). Además, son capaces de modular la angiogénesis y la respuesta inmune (Torre-Amione y col., 1990).

Debido a la naturaleza hidrofílica de los GF, su acción se inicia con la unión de la molécula-ligando extracelular a un receptor de membrana celular. Los **receptores de factores de crecimiento ó GF-R** son proteínas transmembrana conformadas por tres dominios, uno extracelular (DE) de unión al ligando; un dominio que permite el anclaje a membrana, denominado DT; y un dominio citoplasmático (DI) con actividad catalítica intrínseca (DC) (**Fig. 1.5A**).

Los GF-R son activados por la unión del ligando, iniciando una cascada de eventos intracelulares sucesivos que finalizan en la modulación de la expresión de genes blanco. Este proceso consiste en la activación de moléculas determinadas por modificación bioquímica y es comúnmente conocido como "cascada de transducción de señales". Debido

a que los receptores de membrana tienen actividad catalítica y pueden actuar directamente como enzimas con actividad quinasa, la activación de las proteínas intracelulares de señalización se produce generalmente por fosforilación (Alonso y col., 1998) (**Fig. 1.5B**).

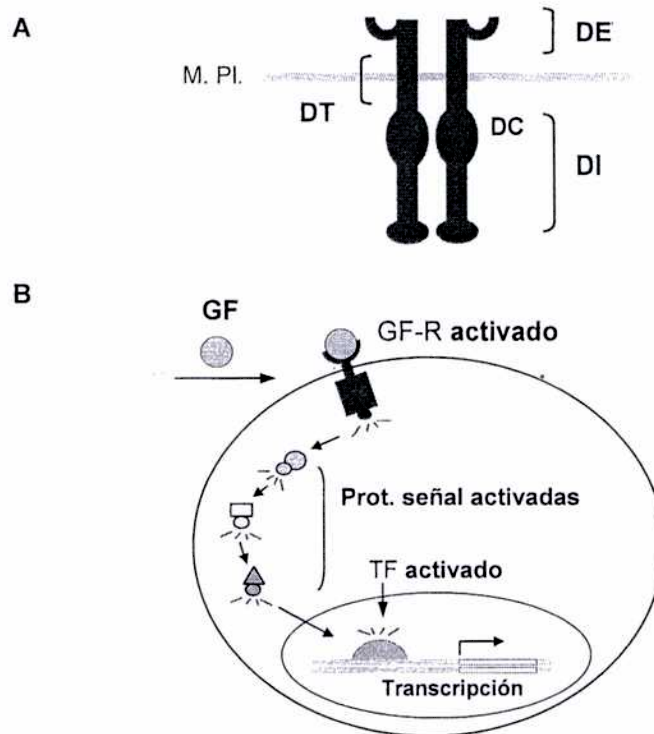


Fig. 1.5. Factores de crecimiento y sus receptores. **A.** Dominios proteicos de un GF-R: extracelular (DE), transmembrana (DT), dominio catalítico (DC) e intracelular (DI). **B.** Cascada de transducción de señales intracelulares de un GF.

Existen diversas **cascadas de señalización intracelular**. La familia de *Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos* ó **MAPK** se considera dentro de las moléculas centrales que transducen las señales extracelulares y juegan roles claves en la proliferación, diferenciación, apoptosis, remodelación del citoesqueleto y regulación del ciclo celular (Seger y Krebs, 1993). Las cascadas MAPK están organizadas por un módulo de señalización principal, compuesto por tres proteínas quinasas, denominadas MAP quinasa quinasa quinasa ó MAPKKK, MAP quinasa quinasa ó MAPKK, y MAP quinasa ó MAPK, muy conservadas en sus dominios catalíticos. Estas enzimas son activadas en forma secuencial, de modo que MAPKKK fosforila a MAPKK en residuos serina dentro de su dominio de activación, la cual es una quinasa de especificidad dual que fosforila a MAPK en residuos treonina y tirosina, activándola. Por último, las proteínas MAPK actúan fosforilando diversos sustratos, incluyendo factores de transcripción (TFs), los cuales a su vez regulan la expresión de determinados genes y pueden así producir una respuesta específica frente al estímulo externo recibido (Whitmarsh y Davis, 1998) (**Fig.1.6**).

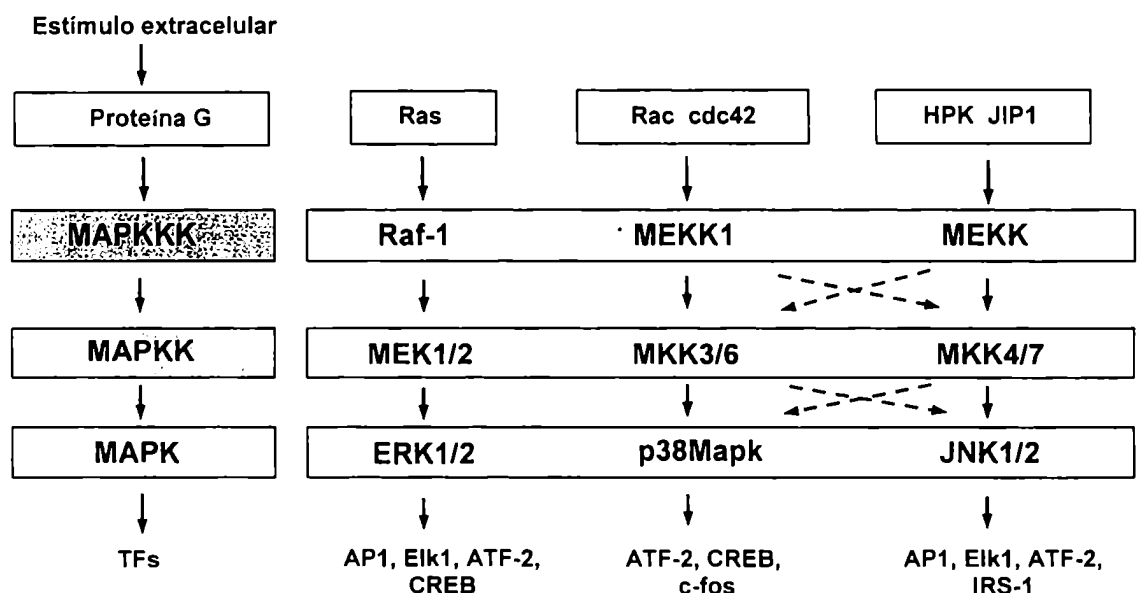


Fig. 1.6. Vías de señalización intracelular MAPK.

A su vez, dentro de la familia de MAPK existen diversas cascadas, las cuales funcionan en forma independiente pero pueden regularse unas a otras. Las vías más importantes dentro de las MAPK son: la vía de "quinasas reguladas por señales extracelulares" ó **MEK/ERK**; la vía Jun quinasas ó **JNK**, también conocida como "proteínas quinasas activadas por stress" ó **SAPK**; y la vía de **p38Mapk** (Chang y Karin, 2001) (**Fig. I.6**).

La vía MEK/ERK es una cascada clave en la transmisión de señales mitogénicas inducidas por receptores tirosina-quinasa activados por GF. El receptor activado induce la activación de Ras, que a su vez activa a su efector Raf-1, una serina/treonina-quinasa que funciona como la MAPKKK en esta cascada. Raf-1 activa a una MAPKK denominada MEK, la cual directamente activa a ERK, que es la MAPK final de esta vía. Así activada, ERK es capaz de translocarse al núcleo, donde fosforila y regula factores de transcripción que median cambios en la expresión génica.

El subgrupo JNK es activado en respuesta a estímulos extracelulares como la irradiación UV, citoquinas pro-inflamatorias y ciertos mitógenos (Minden y Karin, 1997). La vía p38Mapk fue inicialmente descrita por participar en respuestas inflamatorias en monocitos y otros tipos celulares; en la respuesta a stress y en la inducción de apoptosis (Cuenda y col., 1995; Sethi y Sodhi, 2004), si bien recientemente se determinó que p38Mapk también participa en el desarrollo y oogenesis en *Drosophila melanogaster* (Martin-Blanco, 2000), por lo que sus funciones aún no se han dilucidado completamente.

Las diversas respuestas biológicas inducidas por factores de crecimiento se originan no sólo en la diversidad de vías de transducción de señales existentes, sino también en la capacidad de regularse unas a otras, mediante un mecanismo molecular denominado diálogo cruzado o "crosstalk". Se considera que varias vías de señalización están probablemente activadas en una célula en un momento dado; por lo tanto, la integración de las diversas vías activadas sería responsable de una respuesta determinada (Minden y Karin, 1997).

FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE TIPO BETA (TGF- β)

La familia de factores de crecimiento transformante tipo beta TGF- β comprende un gran número de GFs polipeptídicos relacionados estructuralmente y muy conservados evolutivamente, capaces de regular potencialmente cualquier proceso biológico (Roberts y Sporn, 1990; Barnard y col., 1990; Massagué, 1990). Estas citoquinas son expresadas en patrones complejos tiempo- y tejido-específicos, siendo sus efectos dependientes del tipo celular.

Además de los denominados TGF- β , otros miembros de la superfamilia incluyen las proteínas de morfogénesis ósea, *Bone Morphogenetic Proteins* ó BMPs, identificadas como factores de reparación de hueso; el producto del gen *decapentaplegic* ó dpp, que dirige la orientación dorsoventral durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*, y las activinas, identificadas como reguladores de la función endocrina (Massagué, 1998) (Tabla I.III). Todas estas moléculas comparten entre 25 y 40% de identidad de secuencia con TGF- β , pero por lo general no se unen a los receptores específicos de TGF- β (Fynan y Reiss, 1993).

Tabla I.III. La superfamilia TGF- β .

NOMBRE SUBFAMILIA (homólogos)	ACTIVIDADES REPRESENTATIVAS
Activina Activinas β A, β B, β C, β E	Estimulación de producción de FSH; diferenciación eritroide; inducción mesodérmica en sapos.
BMP2 BMP2 (Dpp ^D) BMP4	Gastrulación, neurogénesis, condrogénesis, patrón mesodérmico en sapos; dorsalización en mosca de la fruta.
BMP3 BMP3/osteogenina GDF10	Diferenciación ósea; formación de hueso endocondral.
BMP5 BMP5 (60 A ^D) BMP6/Vgr1 BMP7/OP1 BMP8/OP2	Desarrollo de todos los órganos, junto con BMPs 2 y 4; varios roles en neurogénesis.
GDF5 GDF5/CDMP1 GDF6/CDMP2 GDF7	Condrogénesis.
TGF-β TGF- β 1 TGF- β 2 TGF- β 3	Arresto del ciclo celular en células epiteliales y hematopoyéticas y estimulación de la proliferación en fibroblastos; control de la diferenciación de células mesenquimáticas; inmunosupresión; control de la producción de MEC.
Vg1 GDF1 (Vg1 ^X) GDF3/Vgr2	Inducción mesodérmica en sapo y peces.
Miembros intermedios Nodal (Xnr 1-3 ^X) Dorsalina GDF8 GDF9	Inducción mesodérmica; regulación de la diferenciación neural; inhibición del crecimiento del músculo esquelético.

Miembros distantes MIS/AMH Inhibina [] GDNF	Regresión de los ductos Müllerianos; inhibición de la producción de FSH; desarrollo renal y supervivencia de neuronas dopaminérgicas.
--	---

(Los miembros listados han sido identificados en humanos y/o ratón. Entre paréntesis: homólogos importantes en *Drosophila* (^D) y *Xenopus* (^X). GDF: Growth and Differentiation Factor; CDMP: Cartilage-Derived Morphogenetic Protein; MIS/AMH: Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone; GDNF: Gliál cell-Derived Neurotrophic Factor).

TGF- β 1 fue originalmente aislado como uno de dos componentes (TGF- α y TGF- β) capaces de inducir un fenotipo transformado en fibroblastos normales de riñón de rata (de Larco y Todaro, 1978). Luego, se determinó que TGF- β , a diferencia del TGF- α mitogénico, es un potente inhibidor del crecimiento de varios tipos celulares (Roberts y Sporn, 1990).

En Mamíferos, se han descrito tres isoformas de TGF- β altamente homólogas codificadas por genes distintos, denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, que pueden exhibir funciones diferentes (Norgaard y col., 1995; Massagué, 1998). Los TGF- β s son secretados como complejos latentes de alto peso molecular, en los cuales TGF- β está unido a una de varias LTBP (Latent TGF- β -Binding Proteins) (Fig. I.7). Estos complejos inactivos son incapaces de unirse a los receptores específicos (Miyazono y col., 1990). La secreción de TGF- β como un complejo latente requiere de la existencia de procesos de activación muy regulados. La forma madura y biológicamente activa de TGF- β es una proteína homodimérica de 24 kDa, que se libera del precursor tanto *in vivo*, por degradación por enzimas como plasmina, catepsina D y trombospondina-1 (Crawford y col., 1998), como *in vitro*, por diversos mecanismos como agentes caotrópicos, calor o pH extremo (Baillie y col., 1996; Barcellos-Hoff y Ewan, 2000).

La existencia de estos complejos latentes representa una importante protección contra la activación descontrolada de los factores de crecimiento y podría estabilizar al TGF- β inactivo en la MEC, donde está normalmente secuestrado (Miyazono y col., 1993). De este

modo, la MEC funciona como un reservorio de TGF- β , del cual la citoquina puede ser reclutada en cualquier momento sin la necesidad de síntesis *de novo*.

La acción biológica de TGF- β es ejercida a través de la unión a receptores de alta afinidad, conocidos como T β RI (53-65 kDa), T β RII (70-85 kDa) y T β RIII (200-400 kDa). Los receptores tipo I y II constituyen una nueva superfamilia de serina-treonina quinasas de un solo paso de membrana y están involucrados directamente en la transducción de señales de TGF- β . En Mamíferos existe un solo tipo de receptor II (T β RII) y dos tipos de receptor I, de los cuales la forma presente en humanos se conoce como Alk5 (Activin receptor-like kinase 5) ó T β RI. El receptor tipo III, en cambio, es un proteoglicano cuya función principal es incrementar la afinidad del ligando por los receptores catalíticos (Wrana y col., 1992; Massagué y col., 1994).

El proceso de señalización de TGF- β comienza con la unión de la citoquina al dímero constitutivamente activo T β RII, el cual recluta al dímero T β RI con la consecuente formación de un complejo heterotetramérico. La activación de T β RI por T β RII se produce mediante la fosforilación de residuos serina y treonina en una región altamente conservada rica en glicinas y serinas denominada "dominio GS", dentro del dominio citoplasmático de T β RI. Este proceso de activación unidireccional de T β RI por T β RII es esencial para la propagación de las señales de TGF- β y se denomina "transfosforilación" (Wrana y col., 1994). Una vez activado T β RI, es capaz de fosforilar y activar proteínas blanco intracelulares (Derynck y Feng, 1997) (**Fig. 1.7**).

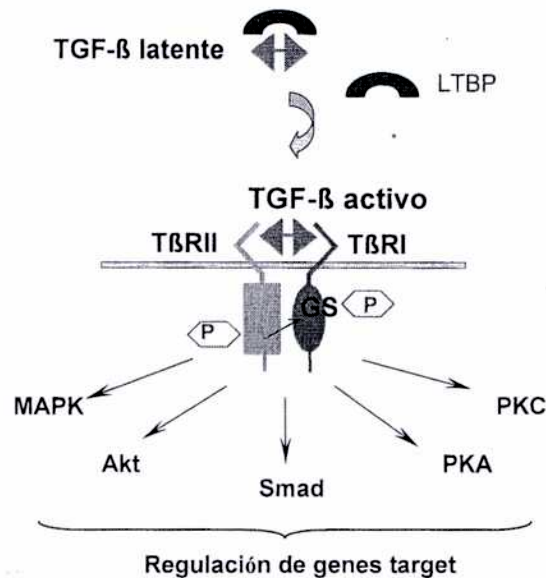


Fig. I.7. TGF-β y TβRs.

Las **Smads** constituyen la vía de señalización central de TGF-β. Son moléculas de 42 a 60 kDa, estructuralmente muy relacionadas y muy conservadas entre distintas especies (Massagué, 1998). Están compuestas por dos regiones conectadas por un dominio de unión o "linker" rico en prolinas: el dominio *Mad-Homology domain 1* ó MH1, en la región N-terminal de Smads, es el de unión al DNA; y el dominio denominado MH2, en la porción C-terminal, cuyas funciones son la interacción con TβRI y oligomerización de Smads (Heldin y col., 1997) (Fig. I.8).



Fig. I.8. Smads: dominios y funciones.

Las Smads pueden ser activadas por distintos miembros de la superfamilia TGF- β . En la señalización de TGF- β , son activadas en todas las células que responden a TGF- β y juegan roles centrales en las actividades biológicas de la citoquina. Se clasifican en tres subtipos, de acuerdo a su función: las R-Smads (*Receptor-regulated*) son activadas por T β Rs activados; las Co-Smads (*Common-partner*) son comunes a la señalización de los distintos miembros de la superfamilia TGF- β ; y las Smads inhibitorias ó I-Smads, denominadas así por su función de control sobre las demás Smads (**Tabla I.IV**). En la señalización de TGF- β , Smad2 y 3 son las R-Smads, Smad4 es la Co-Smad y Smad7 es la I-Smad (Derynck y Zhang, 1998; Massagué y Wotton, 2000a).

Tabla I.IV. La familia Smad.

NOMBRE SUBFAMILIA	MIEMBROS
R-Smads	TGF-β: Smads 2, 3 BMP: Smads 1, 5, 8 Activina: Smads 2, 3 Homólogos: En <i>Drosophila</i>: Mad En <i>C. elegans</i>: Sma 2, 3
Co-Smads	Smad4 Homólogos: En <i>Drosophila</i>: Medea En <i>C. elegans</i>: Sma-4
I-Smads	TGF-β: Smad 7 BMP: Smads 6, 7 Homólogos: En <i>Drosophila</i>: Dad

Smad2 y Smad3 son transductores centrales en la señalización de TGF- β . Una vez activadas por fosforilación por T β RI, forman complejos heteroméricos con Smad4 y así se translocan al núcleo celular, donde actúan como reguladores transcripcionales inducidos por TGF- β sobre genes determinados (Liu y col., 1997; Heldin y col., 1997) (**Fig. I.9**). La estructura de los complejos formados por Smads no se conoce totalmente; se ha propuesto que podría ser un heterotrímero compuesto de dos moléculas de R-Smads y una de Co-Smads, o bien un heterodímero formado por una molécula de cada clase (Kawabata y col., 1998; Wu y col., 2001). Por otra parte, Smad4 es una molécula clave de unión a R-Smads, cuya función es la de reclutar coactivadores de la transcripción y estabilizar la interacción entre coactivadores y las R-Smads (Feng y col., 1998).

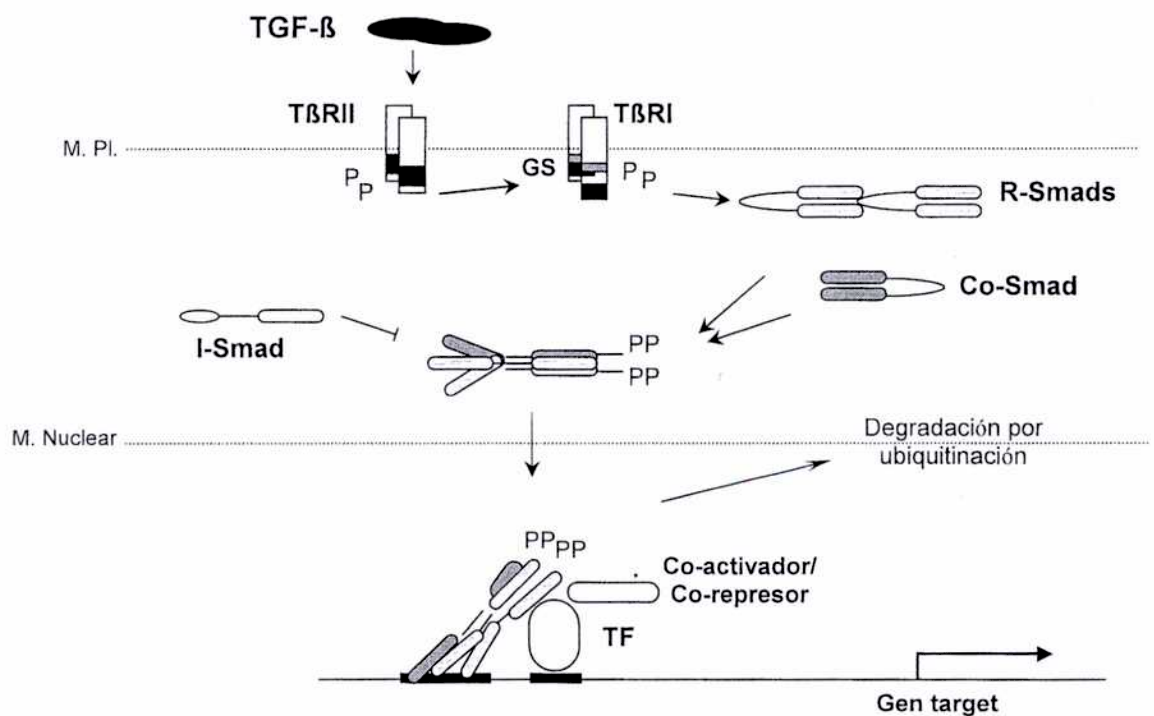


Fig. I.9. Señalización de TGF- β vía Smad.

Las R-Smads y las Co-Smads circulan entre el núcleo y el citoplasma, debido a señales de importación y exportación nuclear en los distintos dominios proteicos. Smad3 y Smad4, pero no Smad2, tienen actividad intrínseca de unión a DNA. Las secuencias óptimas para la unión de Smads al DNA son copias en tándem, denominadas *Smad-Binding Element* ó SBE y son suficientes para conferir respuesta a TGF- β en promotores mínimos *in vitro*. El SBE óptimo es palindrómico y presenta la secuencia AG(C/A)CAGACA, también denominada "caja CAGA". Esta secuencia se encuentra en los promotores de muchos genes de respuesta a la citoquina, con mínimas modificaciones (Zawel y col., 1998; Miyazono y col., 2003).

En el núcleo, los complejos Smad activados pueden reconocer directamente genes target que contengan varias copias de la secuencia CAGA; sin embargo, la mayoría de los elementos de un promotor respondedor a Smad contiene solamente una copia de este motivo, que por sí misma tiene baja afinidad por las Smads. Para que tales genes sean reconocidos efectivamente bajo condiciones fisiológicas, el complejo Smad debe incorporar cofactores adicionales de unión a DNA, que reconozcan secuencias en el promotor target. De esta manera, las Smads y los cofactores adquieren alta afinidad y selectividad por promotores blanco con los elementos de unión apropiados. Dichos cofactores pueden ser co-activadores, como p300, CBP, SMIF, o co-represores, como p107, SKI, SNON, TGIF, SIP1, lo que resulta en la transducción de una gran variedad de señales intracelulares en las células blanco (Derynck y Zhang, 1998; Chen y col., 2002; Gosh y col., 2000). Más de 30 TFs, incluyendo AP-1, CREB, ATF-2, SP1 y el receptor de vitamina D, interactúan con Smads (Miyazono y col., 2000; Massagué y Wotton, 2000a). De este modo, las Smads y otros factores regulan cooperativamente la transcripción de genes target a través de la unión específica a un determinado promotor, exhibiendo efectos biológicos específicos.

TGF- β puede activar o reprimir la transcripción de genes blanco y ambas acciones pueden ser mediadas por las proteínas Smad. Además, se encontró que distintas Smads pueden mediar la transcripción de diferentes genes. Así, por ejemplo, la inducción de MMP-2 por TGF- β ocurre vía Smad2; mientras que la autoinducción de TGF- β depende de Smad3 (Massagué, 1998).

Las Smads permanecen en el núcleo solamente por el período de duración del estímulo TGF- β . La inactivación de las actividades de las R-Smads es crucial para controlar la extensión de los efectos de TGF- β . En dicha regulación, las I-Smads proveen múltiples mecanismos de feedback negativo (Nakao y col., 1997). Así, las I-Smads pueden interactuar físicamente con T β RI activado, compitiendo con las R-Smads por la unión al receptor; pueden interferir en la formación de complejos entre R-Smads y Co-Smads; y también son capaces de reprimir la transcripción génica (Hayashi y col., 1997).

Además de las I-Smads, existen otros reguladores directos de Smads, como diversos represores de la transcripción, y también proteasas dependientes de ubiquitina, que degradan Smads y atenúan la señal de TGF- β (Zimmerman y Padgett, 2000). Si bien la defosforilación de R-Smads, activadas por fosfatasa aún no identificadas, se cree que contribuye a la disociación de complejos Smad en el núcleo, nuevas evidencias indican que las R-Smads fosforiladas son inactivadas, al menos parcialmente, por degradación irreversible con intervención del sistema ubiquitina–proteasoma. Dicha degradación ocurre por diferentes proteínas Smurf ubiquitin–ligasas y en diversas localizaciones subcelulares, lo que lleva a pensar que la actividad de las distintas Smads es regulada por diferentes mecanismos (Lo y Massagué, 1999; Zhang y col., 2001 y 2003).

De acuerdo a su linaje, su estadio de desarrollo y al microambiente, las células contienen un determinado arreglo de cofactores de Smads, por lo que se generan repertorios variados de complejos transcripcionales de Smad y respuestas génicas. Así, las respuestas a TGF- β dependen del contexto celular (Siegel y Massagué, 2003).

Actualmente se cree que la señalización vía Smad es esencial para muchas, pero no todas, las respuestas génicas a TGF- β . Además de activar Smads, TGF- β es capaz de activar directa o indirectamente otras vías de señalización intracelular, incluyendo JNK (Atfi y col., 1997; Engel y col., 1999), ERK1/2 (Mulder y Morris, 1992; Mucsi y col., 1996), p38Mapk (Yamaguchi y col., 1995; Adachi-Yamada y col., 1999; Bakin y col., 2002) y PI3K-Akt (Higaki y Shimokado, 1999; Bakin y col., 2000) (**Fig. I.10**). La manera exacta en que TGF- β activa estas quinasas se desconoce. La activación transcripcional por Smads a través de su interacción física y cooperatividad funcional con TFs, permite un crosstalk con otras vías de

señalización. Pero la activación de otras vías por TGF- β puede ser independiente de las Smads. Por ejemplo, la activación de las vías JNK y p38Mapk podría regular la transcripción inducida por TGF- β en promotores con AP-1 que responden a TGF- β y en sitios de unión de Smads (Yue y Mulder, 2000). Por otra parte, la vía Ras puede afectar la señalización de Smads tanto positiva como negativamente, por mecanismos indirectos (Saha y col., 2001; Janda y col., 2002). Entonces, la complejidad de la señalización de TGF- β se incrementa debido a que TGF- β puede activar directamente vías MAPK y otras vías, así como interactuar recíprocamente con estas vías cuando éstas ya están activadas por otros motivos (Wakefield y Roberts, 2002).

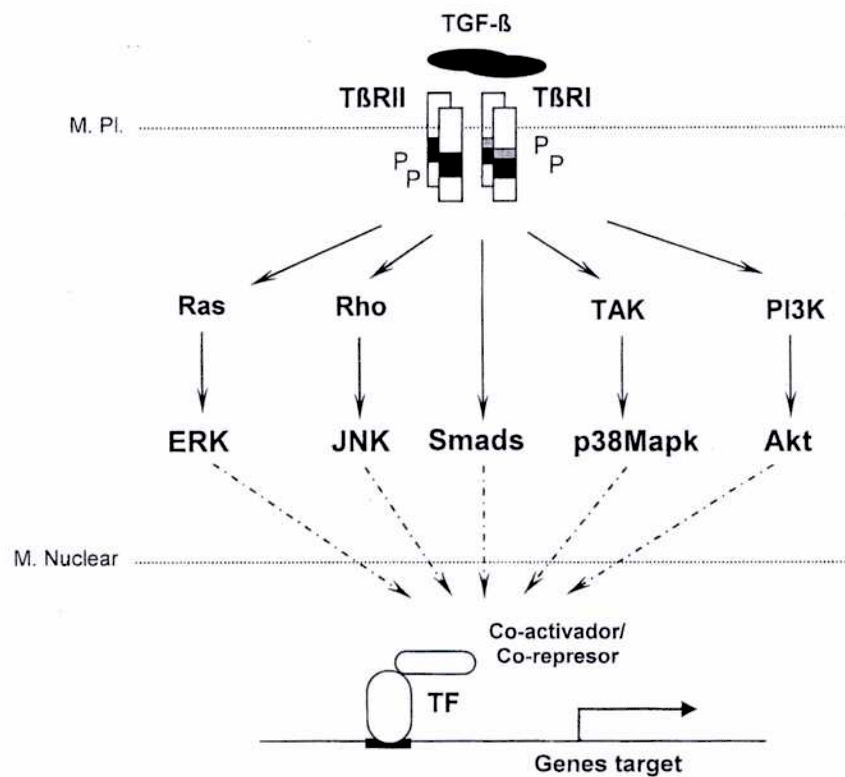


Fig. I.10. Vías de transducción de señales activadas por TGF- β .

TGF- β EN PROCESOS FISIOLÓGICOS

Los TGF- β s poseen múltiples funciones. Se conocen como potentes inhibidores de la proliferación de células de estirpe epitelial, si bien también son capaces de estimular el crecimiento de células mesenquimáticas (Kelly y Rizzino, 1999). Se ha descrito que fibroblastos fetales y adultos, células de músculo liso jóvenes y adultas, células epiteliales mamarias humanas normales creciendo en distintos sustratos *in vitro*, son diferencialmente sensibles al efecto antiproliferativo de TGF- β (McCaffrey y Falcone, 1993; Takahashi y col., 1990). Además, aún aquellas células que carecen de una respuesta antiproliferativa a TGF- β , podrían responder con respuestas especializadas de la MEC, que a su vez podría modificar el microambiente tumoral de modo tal de afectar el crecimiento (Stampfer y col., 1993).

La señalización de TGF- β también controla el crecimiento de varios tipos de células no epiteliales, incluyendo las células endoteliales, inmunes y del sistema nervioso. TGF- β es un potente quimioattractante sobre las células del sistema inmune, por ejemplo de monocitos y también sobre fibroblastos, lo que sugiere un rol en los procesos de inflamación y de reparación tisular (Roberts y col., 1986; Yang y Moses, 1990). TGF- β posee actividad inmunomoduladora, en parte mediante la inhibición de la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T y B, neutrófilos y macrófagos (Letterio y Roberts, 1998). Por otro lado, TGF- β suprime la citotoxicidad de linfocitos T citotóxicos (Inge y col., 1992).

Además de regular el ciclo celular, TGF- β posee otras funciones. Es un fuerte regulador de la diferenciación celular y la morfogénesis y participa tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis durante el desarrollo embrionario (Siegel y Massagué, 2003). TGF- β es un potente regulador negativo de la diferenciación de adipocitos y otros tipos celulares (Rahimi y col., 1998).

Además, TGF- β es capaz de inducir o suprimir la apoptosis, dependiendo en gran medida del tipo celular (Shin y col., 2001; Jang y col., 2002).

La exposición crónica a TGF- β induce un cambio fenotípico que resulta en la adquisición de un fenotipo mesenquimático en células epiteliales mamarias (Miettinen y col., 1994), o bien características miofibroblásticas en células estromales (Desmouliere y col., 1993).

TGF- β incrementa la formación de tejido conectivo en procesos como la reparación tisular y la cicatrización de heridas. Por otra parte, TGF- β participa del control de la producción de componentes de la MEC, estimulando la expresión de un amplio número de proteínas de matriz, como fibronectina, laminina y varios tipos de colágeno e induciendo la deposición de componentes de MEC, ya sea inhibiendo su degradación o induciendo a inhibidores de proteasas (Derynck y col., 2001). De esta forma, TGF- β es capaz de regular la expresión de proteasas como las MMPs, el uPA y la estromelisina, así como la de inhibidores de proteasas como PAI-1 y TIMP (Birkedal-Hansen, 1995).

Además, se conoce que TGF- β tiene la capacidad de autoinducirse (Massagué, 1998), a modo de un mecanismo de amplificación de la señalización y por lo tanto, de sus efectos biológicos.

Por último, como los TGF- β s pueden ser producidos por cualquier tipo celular y pueden actuar en forma autocrina o paracrina (Oft y col., 1998), sus acciones pueden ser innumerables. Además, la naturaleza y las condiciones de una célula, más que TGF- β por sí mismo, determinan la respuesta final a esta citoquina.

TEJIDO MAMARIO y CÁNCER DE MAMA

El desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria es mayormente post-natal tanto en humanos como en ratones. En ratones, en la pubertad el árbol mamario epitelial se establece dentro del estroma adiposo conocido como "fat pad". Este periodo de crecimiento es caracterizado por una unidad morfológica especializada denominada "end-bud", la cual es una estructura multicelular, de multicapas, cuya función es extender los ductos epiteliales hacia los fat pad. En la preñez, bajo los efectos de las hormonas, se produce la diferenciación lobuloalveolar del epitelio en unidades secretorias funcionales. Luego de este periodo, ocurre la involución de la glándula mamaria, que destruye la mayor

parte del epitelio secretorio dejando a los ductos preparados para ciclos repetidos de crecimiento y diferenciación (Daniel y Silberteín, 1987).

Los distintos estadios de desarrollo de la glándula mamaria son altamente influidos por las vías de señalización de TGF- β , tanto en el epitelio como en el estroma (Siegel y Massagué, 2003). Se ha estudiado el rol de TGF- β durante el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria murina. Se determinó que las tres isoformas de TGF- β en Mamíferos se expresan en el epitelio durante todas las fases del desarrollo mamario (Robinson y col., 1991). Por otra parte, en el tejido mamario normal humano, se ha detectado expresión de TGF- β tanto en el epitelio como el estroma de la glándula, así como también en el medio condicionado de células epiteliales de mama humana en cultivo. Además, se ha detectado la presencia de los tres tipos de receptores de TGF- β en la mama normal humana, por lo que el sistema TGF- β /T β Rs parece estar ampliamente expresado en el epitelio y en el estroma de la mama (Gomm, 1991; Baillie y col., 1996; Chakravarthy y col., 1999).

Los roles específicos de la acción de TGF- β en la glándula mamaria no se conocen completamente, en parte debido a la complejidad de sus efectos en distintos tipos celulares, que son regulados en múltiples niveles y son modificados por el contexto celular (Barcellos-Hoff, 1996). Además, no se ha podido determinar cómo se desarrolla la glándula mamaria en ratones TGF- β -nulos, ya que, si bien depende de la cepa de ratón, éstos mueren alrededor de la época del desarrollo mamario debido a una severa respuesta inflamatoria (Kulkarni y col., 1993; Kallapur y col., 1999). Soriano y col. (1996) determinaron que líneas establecidas de células mamarias exhiben una respuesta bifásica a TGF- β , dado que concentraciones picomolares de la citoquina inhiben la morfogénesis de la ramificación ductal de la mama, mientras que concentraciones fentomolares la estimulan. Sin embargo, otro estudio mostró que TGF- β abuele la morfogénesis ductal de células epiteliales mamarias humanas (Bergstraesser y col., 1996).

Hasta hace poco, no se conocía qué fuente de TGF- β (sistémica, epitelial o estromal) era crítica en el desarrollo de la glándula mamaria. Ahora se conoce que tanto las respuestas epiteliales como estromales a la actividad de TGF- β juegan un rol en definir la maduración del tejido mamario murino (Joseph y col., 1999). Aún se desconoce cuándo y en qué sitios se activa el TGF- β latente durante el desarrollo normal y la homeostasis de la glándula

mamaria. Se cree que TGF- β tiene un rol fundamental en la regulación de la formación del epitelio mamario, quizás mediante interacciones con el estroma, y además está involucrado en las decisiones de células individuales.

Los tumores epiteliales ó carcinomas comprenden más del 80% de los tumores humanos y surgen a través de un proceso de múltiples etapas, durante el cual la polaridad epitelial se pierde gradualmente, se destruye la estructura del órgano y las células epiteliales se dediferencian. La progresión a carcinomas metastásicos requiere de cambios adicionales, como la degradación proteolítica de las membranas basales, la conversión de un fenotipo sésil a uno migratorio, la supervivencia en la circulación sanguínea y la formación de metástasis a sitios distantes (Liotta y col., 1991).

La elevada mortalidad del cáncer de mama en humanos ha originado la necesidad de identificar los precursores de este tipo de cáncer. Se considera que el cáncer de mama invasivo podría desarrollarse gradualmente a partir de lesiones microscópicas definidas. Sin embargo, si bien este tipo de lesiones son frecuentes en el cáncer de mama humano, sólo una pequeña proporción de ellas parece progresar hacia un tumor invasivo (Berardo y col., 1998).

El cáncer de mama invasivo humano surge probablemente del epitelio normal del ducto terminal o de la unidad lobular, por medio de una serie de lesiones proliferativas anormales que incluyen hiperplasia benigna (típica y atípica) y carcinoma *in situ* no invasivo. Las neoplasias malignas comprenden carcinomas ductales *in situ* (DCIS) de bajo y alto grado. Los DCIS de bajo grado están compuestos por células epiteliales regulares relativamente pequeñas. Los de alto grado, en cambio, se caracterizan por células epiteliales grandes irregulares (Berardo y col., 1998). Por otra parte, los carcinomas lobulillares pueden ser *in situ* o invasivos. Los carcinomas lobulillares *in situ* se caracterizan por la proliferación de uno o más conductos terminales, de conductillos o acinos, o de ambos a la vez y están compuestos por células grandes con raras mitosis. El carcinoma lobulillar invasivo, en cambio, surge probablemente de los conductillos terminales del lobulillo mamario. Histológicamente consisten en células pequeñas organizadas en anillos en torno a los conductos normales (Cotran y col., 1998).

CÁNCER DE PULMÓN

A pesar de los innumerables avances en el tratamiento de otros tipos de cáncer, los carcinomas de pulmón continúan siendo fatales.

Los diferentes tipos de cáncer de pulmón han sido divididos en varias categorías. Dentro de las más frecuentes se encuentra el carcinoma de pulmón a células pequeñas ó SCLC, el cual se considera que tiene un origen neuroendócrino. En cambio, los carcinomas a células no-pequeñas ó NSCLC se cree que surgen de un progenitor celular broncoalveolar (Weintraub, 1998).

El SCLC es un tumor muy maligno, formado por una variedad muy particular de células, denominadas "células en avena". Son células epiteliales pequeñas, con escaso citoplasma, similares a los linfocitos pero con el doble de tamaño. Presentan granulaciones neurosecretoras, que producen polipéptidos hormonales como la enolasa de neuronas y el péptido similar a la paratohormona. Esto implica que este tumor procede de las células neuroendócrinas del epitelio de revestimiento de los bronquios (Kobzik y Schoen, 1998).

El NSCLC, en cambio, está constituido por células poligonales de mayor tamaño, con núcleos vesiculosos. Estos tumores corresponderían a adenocarcinomas muy indiferenciados. Parte de los carcinomas NSCLC contienen mucina intracelular; otros muestran gran número de células multinucleadas; y otros tienen un característico aspecto histológico fusiforme (Kobzik y Schoen, 1998).

Estudios citogenéticos en ambos tipos de cáncer de pulmón demostraron que éstos presentan en general varias anomalías cromosómicas, tanto en los tejidos pulmonares como en las líneas celulares derivadas de ellos. Esto sugiere que existiría un set de mutaciones específicas que ocurre en cada tipo de cáncer de pulmón. Actualmente, se conoce que varios genes son frecuentemente expresados en forma aberrante en el cáncer de pulmón. Entre ellos, el gen p53 y el gen Rb son los más estudiados. Tanto p53 como Rb son genes supresores de tumor y la alteración de su actividad promueve la carcinogénesis de pulmón (Weintraub, 1998). Es necesario entender el rol de estos y otros genes supresores de tumor en

el mantenimiento de la fisiología celular normal, así como el significado de su inactivación en la patogénesis del cáncer.

Recientemente, se estudió la presencia de TGF- β en distintos estadios del desarrollo pulmonar del ratón, así como en su transformación inducida por el carcinógeno uretano (Jakowlew y col., 1998). Se determinó que TGF- β se expresa en el epitelio de los bronquiolos en el pulmón normal y se mantiene en los adenomas pulmonares resultantes de la carcinogénesis química. Debido a ello, se relacionó a TGF- β con la tumorigénesis de células pulmonares. Además, se encontró que ciertas isoformas de TGF- β son determinantes de la ramificación que ocurre durante el desarrollo del pulmón murino (Liu y col., 2000). Y se determinó que la vía de señalización Smad inhibe la morfogénesis de la ramificación pulmonar (Zhao y col., 1998).

TGF- β y CÁNCER

El hecho de que TGF- β posee múltiples efectos sobre una amplia variedad de células, sugiere un rol central de la citoquina no sólo en procesos fisiológicos sino también en diversas patologías.

En el cáncer, se considera actualmente que TGF- β tendría un rol dual. Esto se debe a que TGF- β actúa como supresor de tumor en las etapas tempranas de la tumorigénesis, inhibiendo el desarrollo de carcinomas *in situ* mediante su función antiproliferativa. Pero cuando el tumor progresa, cambios genéticos o bioquímicos involucran a TGF- β en la progresión tumoral mediante sus actividades pleiotrópicas, tanto sobre las células tumorales como sobre los tipos celulares del estroma no-maligno del tumor (Akhurst y Derynck, 2001; Derynck y col., 2001). TGF- β se comporta como un importante regulador endógeno de la homeostasis de células no-malignas, actuando como un supresor de tumor. Pero su rol como regulador de la homeostasis epitelial se pierde durante la tumorigénesis. Como se mencionó anteriormente, TGF- β regula su propia producción y/o estabilidad. Una consecuencia de la depleción crónica de TGF- β es el desarrollo tumoral sostenido, lo que indica que su acción como supresor de tumor está impedida (Tang y col., 1998).

Hasta el momento, no se conoce mucho acerca de la expresión de TGF- β en las lesiones precursoras del cáncer de mama invasivo (Berardo y col., 1998). Sin embargo, TGF- β parece expresarse en la mayoría de los cánceres de mama invasivos, lo que sugiere que las células tumorales han perdido la capacidad de responder a sus efectos inhibitorios. Muchos tipos de células tumorales suelen mostrar una producción incrementada de TGF- β y dicha sobreexpresión está asociada con la progresión tumoral en varios tipos de cáncer humano, como el de próstata, páncreas, mama, sarcomas, glioblastomas y melanomas (Kelly y Rizzino, 1999; Dumont y Arteaga, 2000). Además, en cáncer de mama humano, se ha observado una alta expresión de TGF- β en los frentes de avance del tumor primario. Esto puede deberse a varios mecanismos, que incluyen además de la propia producción del factor, un aumento en la secreción y/o actividad de proteasas y la inducción de un fenotipo mesenquimático, ya que los tumores fibroblastoides de origen epitelial han sido caracterizados como altamente malignos e invasivos. Por ejemplo, se conoce que TGF- β tiene actividad promotora de tumor a través de sus efectos sobre la invasión de las células tumorales y de los cambios en el microambiente tumoral (Derynck y col., 2001).

La **transición epitelio-mesenquimática (TEM)** de las células tumorales tiene un importante rol en el fenotipo tumoral invasivo. La capacidad de las células epiteliales o de un carcinoma de sufrir TEM *in vitro* se correlaciona con cambios celulares que facilitan la invasión y la metástasis *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, TGF- β puede inducir TEM en células epiteliales de mama tanto normales como transformadas *in vitro* e *in vivo*, así como en carcinomas de ovario y melanomas (Miettinen y col., 1994; Oft y col., 1996; Portella y col., 1998). La inducción de TEM por TGF- β se ha caracterizado en las células epiteliales de mama murina no-tumorigénicas NMuMG, en las cuales TGF- β induce cambios fenotípicos reversibles que alteran la forma celular; modificaciones en las uniones intercelulares epiteliales, como la downregulación de la expresión de E-cadherina, ZO-1, vinculina y queratina; induce la expresión *de novo* de marcadores fibroblásticos como la vimentina; y produce la reorganización del citoesqueleto celular, con formación de SF (Piek y col., 1999; Bakin y col., 2000).

TGF- β también está involucrado en el proceso de angiogénesis, por mecanismos que combinarían efectos directos e indirectos. TGF- β induce la expresión de VEGF y también induce directamente la formación de capilares de células endoteliales cultivadas sobre una matriz de colágeno (Pertovaara y col., 1994). Una estimulación indirecta podría ocurrir a través de la potente actividad quimioattractante de TGF- β por monocitos, que liberan citoquinas angiogénicas. Además, TGF- β aumenta la expresión de MMP-2 y MMP-9, así como disminuye la expresión de TIMPs, tanto en las células tumorales como en las células endoteliales del huésped, lo que provee un microambiente rico en proteasas que conduce a una mayor capacidad migratoria e invasiva de células endoteliales angiogénicamente activas (Hagedorn y col., 2001). En tumores de mama humanos, niveles altos de mRNA de TGF- β 1 se asocian con una densidad de microvasos aumentada, y ambos parámetros se correlacionan con peor pronóstico del paciente (de Jong y col., 1998). En carcinoma de pulmón a células no-pequeñas NSCLC, TGF- β 1 también parece afectar la angiogénesis tumoral y jugar un rol importante en la progresión tumoral (Hasegawa y col., 2001).

En cuanto al sistema de señalización de TGF- β , se conoce que los niveles de T β RII están disminuídos en muchos tumores humanos avanzados, como colon, gástrico y gliomas, frecuentemente a través de mecanismos epigenéticos que involucran supresión de la transcripción (Markowitz y col., 1995; De y col., 1998; Kim y col., 2000). Si bien menos comunes, las mutaciones inactivantes en T β RI se han observado en cáncer de ovario, mama y páncreas (Chen y col., 1998 y 2001). Frecuentemente, estas alteraciones resultan en un receptor truncado e inactivo. No se han encontrado mutaciones de T β RI acompañadas por mutaciones en T β RII. En conjunto, estas alteraciones sugieren que los receptores tipo I y II de TGF- β podrían funcionar como supresores de tumor en el desarrollo de carcinomas.

Recientemente, se han identificado mutaciones en las proteínas Smad relacionadas con el cáncer. Smad4 fue originalmente identificado como un supresor de tumor frecuentemente delecionado en carcinoma de páncreas, por lo que se lo denominó DPC4 (*Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4*; Hahn y col., 1996). Se conoce que Smad4 es un supresor de tumor y está frecuentemente alterado (por mutación o deleción) también en

cáncer de colon, mama y pulmón. Dichas mutaciones conllevan pérdida de función. Con menor frecuencia, se han detectado alteraciones en Smad2 asociadas con cáncer de pulmón, colorrectal y de cabeza y cuello (Riggins, 1997; Duff y Clarke, 1998). No se han encontrado mutaciones en los genes que codifican Smad3 y Smad7. En general la frecuencia de mutaciones de los genes Smad es baja, lo que sugiere que estas proteínas podrían funcionar como supresores de tumor (Massagué y col., 2000b). Por ello, la pérdida de función de componentes de las vías de señalización de TGF- β es una ruta hacia la pérdida de control del crecimiento por TGF- β en el cáncer (Massagué y col., 2000b).

En la actualidad, se está haciendo incapie en la búsqueda de mecanismos de señalización de TGF- β . Así, se determinó que la señalización de TGF- β es regulada por diversos mecanismos y que muchas proteínas, tanto oncogénicas como anti-oncogénicas participan del desarrollo de tumores a través de la modulación de las actividades de TGF- β (Miyazono y col., 2003). Considerando los roles complejos de la señalización de TGF- β tanto en la supresión como en la progresión tumoral, los cuales son contexto- y estadio-dependiente, las estrategias para explorar los mecanismos empleados por TGF- β con propósitos terapéuticos será difícil. Por ejemplo, la estimulación de la señalización de TGF- β podría suprimir el crecimiento tumoral, pero podría también promover la invasión y la metástasis, en particular en aquellas células que ya no responden al efecto inhibitorio del crecimiento de la citoquina. Para suprimir la progresión del cáncer mediante la administración exógena de TGF- β , la inducción de su síntesis o bien favoreciendo una señalización incrementada, requeriría que el tumor en cuestión fuera sensible al efecto antiproliferativo de TGF- β . Sin embargo, la resistencia a dicho efecto es generalmente adquirida en estadios tempranos del desarrollo de tumores humanos, incluso antes del diagnóstico. Pero de cualquier modo, se supone que cualquier terapéutica que inhiba la señalización de TGF- β induciría la regresión de cánceres avanzados pero al mismo tiempo estimularía el crecimiento de lesiones pre-malignas quiescentes. Por ello, una de las consideraciones actuales consiste en intentar activar TGF- β a modo preventivo, pero inhibir su señalización

en el cáncer metastásico. Se cree que la inhibición de la producción y/o señalización de TGF- β mediante terapia con RNA antisentido, con anticuerpos específicos anti-TGF- β o mediante receptores solubles, podría inhibir la progresión del cáncer (Derynck y col., 2001, Muraoka y col., 2002).

CAPITULO II

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión del sistema TGF- β s/T β Rs, las múltiples respuestas biológicas asociadas al fenotipo tumoral metastásico y las vías intracelulares de señalización inducidas por TGF- β , en dos modelos experimentales de adenocarcinomas murinos de mama y de pulmón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En los modelos experimentales *in vivo* de adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3, que difieren en su capacidad metastásica, y en el adenocarcinoma murino de pulmón P07, así como en sus cultivos primarios y líneas derivadas, nos proponemos:

1. Estudiar la expresión endógena del sistema TGF- β s/T β Rs.

a) Determinar la capacidad de las células tumorales de sintetizar las distintas isoformas de TGF- β .

b) Establecer si las células en estudio secretan la citoquina y definir la proporción de las formas latente y biológicamente activa de TGF- β .

c) Analizar la expresión de los tres tipos de receptores específicos para TGF- β .

2. Evaluar si TGF- β modula la expresión génica en las células tumorales en estudio, con respecto a células normales de la misma estirpe.

3. Determinar el rol de TGF- β en la modulación de eventos relacionados con la invasión y la metástasis:

a) Establecer el efecto de TGF- β sobre la proliferación celular.

b) Estudiar la capacidad de TGF- β de regular enzimas proteolíticas que contribuyen al proceso metastásico, como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y las metaloproteinasas (MMPs) así como sus inhibidores específicos.

c) Analizar si TGF- β interviene en la regulación de componentes del citoesqueleto celular.

d) Evaluar si TGF- β regula los procesos de invasión y migración celular.

4. Estudiar las vías de señalización involucradas en los distintos efectos pleiotrópicos de TGF- β , en relación a la progresión tumoral:

a) Evaluar la participación de las proteínas Smad en las respuestas biológicas a TGF- β .

b) Establecer si TGF- β induce la activación de otras cascadas de transducción de señales.

c) Analizar la relación entre las diferentes vías de señalización en respuesta a la citoquina.

5. Analizar la acción *in vivo* de TGF- β sobre el desarrollo tumoral y metastásico de los modelos en estudio. Para ello, intentaremos:

a) Establecer el rol de TGF- β sobre la angiogénesis tumoral.

b) Evaluar el efecto de la citoquina sobre el crecimiento del tumor primario y sobre la capacidad metastásica.

SEGUNDA PARTE

METODOLOGÍA GENERAL

CAPITULO III

MODELOS EXPERIMENTALES

MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA

Tumores:

Utilizamos un modelo de tumores de mama murinos, compuesto por dos tumores primarios emparentados y con diferente capacidad metastásica, y sus líneas derivadas (Tabla III.I).

El adenocarcinoma mamario M3 surgió espontáneamente en un ratón BALB/c endocriado en el Bioterio del Instituto de Oncología "A.H. Roffo". Es moderadamente metastásico en pulmón, su órgano blanco; esto significa que sólo el 40% de los ratones inoculados con células M3 presenta bajo número de metástasis. El tumor MM3, una variante de M3, es altamente metastásico (95%) en pulmón y fue seleccionado por un procedimiento *in vivo* (Colombo y col., 1980). Los tumores M3 y MM3 no muestran invasividad local (Fig. III.1A).

Todos los animales fueron utilizados acorde a la "NIH Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals".

Cultivos primarios:

Los tumores M3 y MM3 fueron mantenidos por trasplante subcutáneo (sc) con trócar en el flanco de ratones singeneicos BALB/c de ambos sexos, de dos meses de edad. Al cabo de un lapso igual a tres cuartas partes de la sobrevida global (40 y 45 días, respectivamente), los animales se sacrificaron para obtener la masa tumoral.

Los cultivos primarios se obtuvieron por doble digestión enzimática de fragmentos de tejido tumoral con 0,01% pronasa/0,0035% DNAasa (Sigma, St. Louis, MO, USA), según se describió anteriormente (Bal de Kier Joffé y col., 1986). Brevemente, los fragmentos tumorales se obtuvieron en forma estéril, se eliminó la cápsula de tejido conectivo y las zonas necróticas y se disgregaron mecánicamente primero y luego en forma enzimática con pronasa/DNAasa, a 37°C. El material obtenido se centrifugó a 800 rpm durante 10 min. La viabilidad celular fue siempre mayor al 60%, por el método de exclusión de Azul Tripán.

Las células obtenidas se cultivaron en medio de cultivo completo (medio MEM 41500, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GEN,

Buenos Aires, Argentina), 2 mM L-glutamina y 80 µg/ml gentamicina, a 37°C en atmósfera 5 % de CO₂ en aire.

Los cultivos primarios están constituidos por más de 90% de células epiteliales y presentan una morfología similar a la observada en las líneas celulares derivadas (ver más adelante).

Líneas celulares:

Se utilizaron las líneas continuas LM3 y LMM3, establecidas a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de células M3 y MM3, respectivamente (Urtreger y col., 1997) (**Tabla III.I**). Ambos tipos celulares presentan en cultivo una morfología epitelial polihédrica y regular (**Fig. III.1B**).

En cuanto a su comportamiento *in vivo*, las células LM3, al contrario del tumor parental, adquirieron con los sucesivos pasajes un fenotipo altamente invasivo y metastásico al ser inoculadas en ratones singéneos, que también se observa en la línea celular LMM3 (**Fig. III.1C**).

Las células fueron mantenidas en MEM con 5% de SFB. Las monocapas confluentes se repicaron dos veces por semana empleando 0,25% tripsina/0,02% EDTA (Sigma), en PBS libre de calcio y magnesio. En este trabajo, se utilizaron células LM3 y LMM3 de repique n° 100-130.

Por otra parte, en los bioensayos para detectar actividad de TGF-β se utilizó también una línea no-transformada de células epiteliales de pulmón de visón denominada Mv1Lu (CCL-64, ATCC). Estas células se mantuvieron en D-MEM suplementado de 3,7 g/lit bicarbonato de sodio y adicionado de 10% SFB, bajo las mismas condiciones ambientales que las otras células.

En adelante, se referirá como "medio completo" al MEM + 5% SFB para las líneas celulares y al MEM + 10% SFB para los cultivos primarios.

Tabla III.I. Características del modelo de adenocarcinoma de mama, conformado por los tumores parentales M3 y MM3 y sus líneas derivadas, LM3 y LMM3, respectivamente (Colombo y col., 1980; Untreger y col., 1997).

	M3	LM3 (R 111)	MM3	LMM3(R 130)
Latencia (días) ^A	6 (5-10)	7 (7-11)	15 (7-18)	11 (8-16)
Tasa de crecimiento tumoral (mm/día) ^B	0,86 ± 0,17	0,35 ± 0,07	0,55 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Tumorigenicidad (%)	100	90	100	80
Invasividad local	No	Sí	No	Sí
Supervivencia (días)	42	64	60	62
Incidencia metástasis espontáneas (%)	40	100	90	85
Nº nódulos pulmonares ^A	1 (0-5)	28 (5-91)	20 (0-65)	7 (0-77)

(^A: Mediana (rango); ^B: media ± SD).

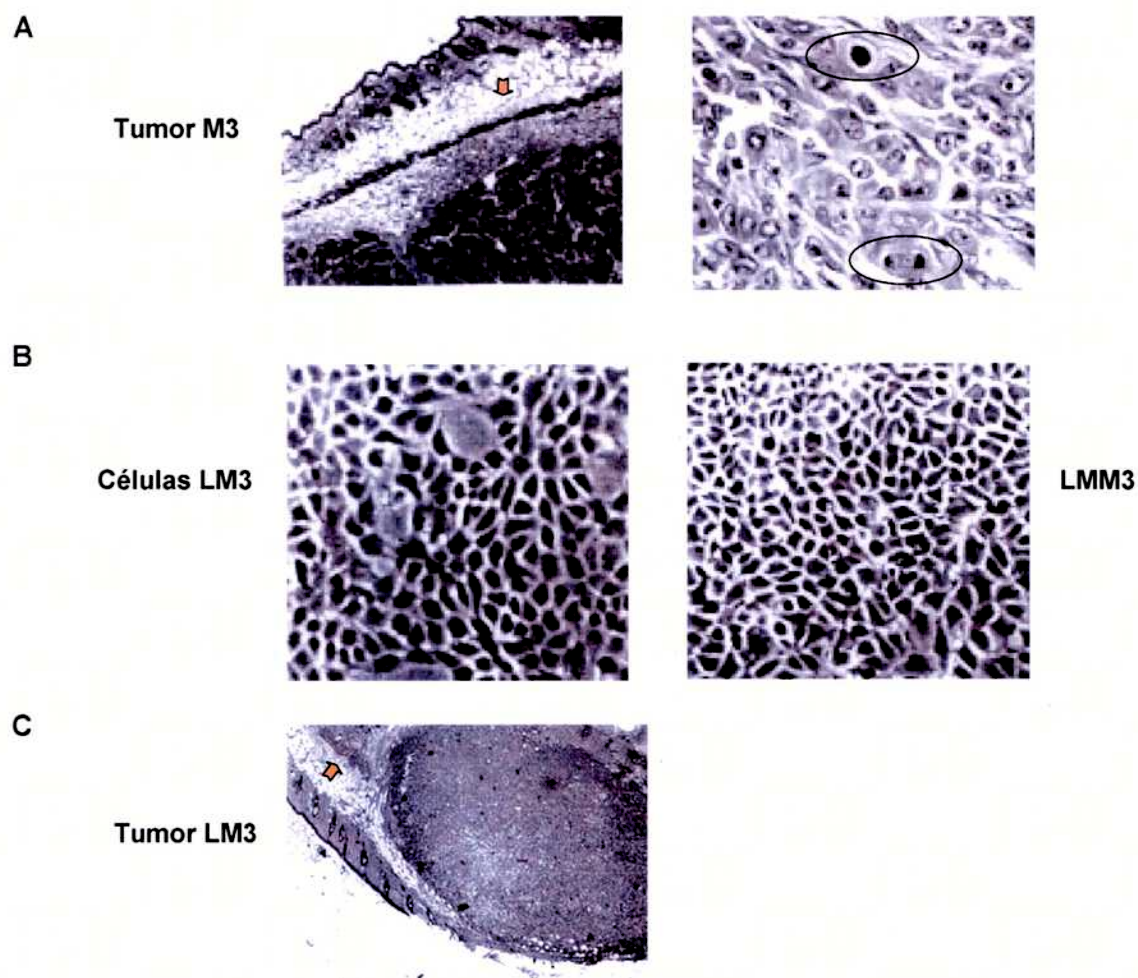


Figura III.1

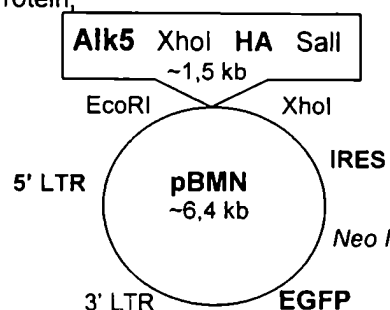
(A) Corte histológico del tumor parental M3. La flecha indica la integridad del tejido muscular. A la derecha, se observa un detalle de imágenes mitóticas indicando la gran capacidad replicativa de estas células tumorales.

(B) Líneas celulares LM3 y LMM3, bajo microscopio óptico (400X).

(C) Corte histológico del tumor formado por inoculación sc de células LM3 en ratones singeneicos BALB/c. La flecha indica el tejido muscular y su desintegración por la invasión del tumor.

Además, se obtuvieron células LM3 que expresan formas dominante negativas (*dn*) de los receptores tipo I y II de TGF- β . Para ello, se utilizaron los vectores retrovirales pBMN-T β RI-K232R-IRES-EGFP (Bakin y col., 2002) y pGABE-T β RII-K277R-EGFP (Oft y col., 1998), que codifican mutantes de dichos receptores. Como se muestra en el esquema, todas estas construcciones codifican la Enhanced Green Fluorescent Protein,

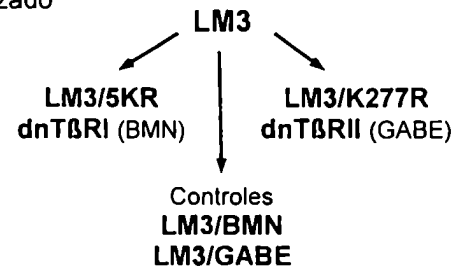
EGFP. Son vectores bisincrónicos en los cuales la expresión de EGFP es controlada por 5' LTR e IRES (Internal Ribosome Entry Site). Cuando es expresada por las células, la proteína EGFP no está fusionada. Además, todas las construcciones contienen un tag de hemaglutinina, HA-tag.



El dnT β RII contiene una mutación puntual K277R, inactivante del sitio de unión a ATP, por lo que es quinasa-inactivo. El dnT β RI codifica el receptor humano Alk5, con una mutación K232R dentro del dominio de transactivación por T β RII. Ambos mutantes son incapaces de transducir las señales inducidas por TGF- β . Además, las células fueron infectadas con los retrovirus control pBMN-IRES-EGFP (obtenido del Dr. Gary Nolan, Universidad de Stanford) ó pGABE, que codifican Alk5 wild type ó solamente EGFP, respectivamente. En los experimentos realizados, se utilizaron indistamente cualquiera de estos dos controles, luego de corroborar que se obtuvieran idénticos resultados.

Las distintas formas mutadas de T β Rs se obtuvieron cultivando la línea de células empaquetadoras Phoenix (HEK293T, células renales epiteliales humanas que expresan dos oncogenes virales: E1a adenoviral y el antígeno SV40; Gary Nolan), previamente transfectada en forma transitoria con las distintas construcciones retrovirales. Para obtener las células LM3 mutadas, se infectaron células LM3 parentales con sobrenadantes libre de células obtenidos de las células Phoenix. Posteriormente, mediante citometría de flujo se seleccionaron las células GFP-positivas.

La expresión de los receptores mutados se confirmó mediante inmunoblotting contra HA. Todo el proceso de obtención y selección de células LM3 mutadas se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Bakin (USA), siguiendo un procedimiento utilizado previamente en su laboratorio para construir los mismos mutantes en la línea NMuMG de células epiteliales mamarias de ratón no transformada (Bakin y col., 2002). Estas células mantienen en cultivo un fenotipo normal, por lo que fueron utilizadas como control.



Entonces, como se muestra en el esquema, las líneas celulares transfectadas se denominaron: células control LM3/BMN; aquellas que expresan dnTβRI, LM3/5KR; y las que expresan dnTβRII, LM3/K277R. En la **Fig. III.2**, se observan las distintas líneas obtenidas y la expresión de EGFP.

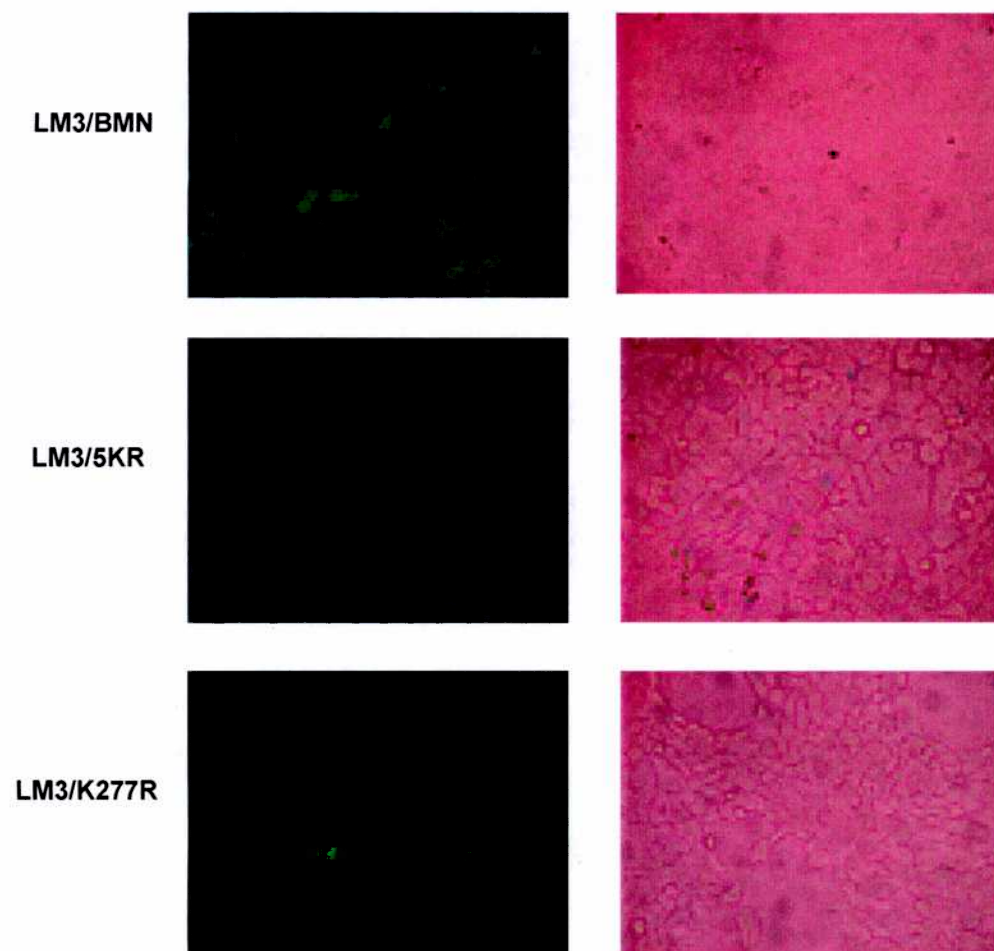


Figura III.2

Líneas celulares transfectadas con dnT β RI, LM3/5KR y con dnT β RII, LM3/K277R. Las células LM3/BMN constituyen el control de transfección.

A la izquierda, se observa la expresión de la proteína EGFP, bajo microscopio de fluorescencia. Las imágenes de la derecha son las correspondientes a luz blanca.

MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

El cáncer de pulmón espontáneo murino es infrecuente. Además, no existen líneas celulares derivadas de tumor murino de pulmón en la literatura que asemejen la fisiopatología del cáncer de pulmón humano, como la presencia de síndromes paraneoplásicos, siendo pocos los estudios experimentales que describan dichos síndromes (Mundy y Guise, 1997; Diament, 2001).

El modelo experimental de tumor de pulmón utilizado en este trabajo consta del adenocarcinoma P07, espontáneamente surgido en un ratón BALB/c endocriado en nuestro Bioterio, y su línea derivada LP07 (Tabla III.II).

La totalidad de los ratones portadores de tumor P07 desarrollan metástasis en pulmón a los 35-40 días. Los tumores P07 son adenocarcinomas pobremente diferenciados, sin evidencia de invasividad local, que inducen síndromes paraneoplásicos, tales como hipercalcemia, leucocitosis y caquexia en los animales portadores (Diament y col., 1998; Parma y col., 1999).

Los cultivos primarios del tumor P07 se obtuvieron tal como se describió para el modelo de tumores de mama.

Para la obtención de la línea continua, se utilizó el mismo procedimiento que para las líneas celulares de mama (Utreger y col., 2001). Las monocapas de LP07 están mayormente (95%) compuestas por células epitelioides polihédricas altamente heterogéneas en morfología y tamaño, de origen epitelio-glandular con un bajo grado de diferenciación. Presentan gran cantidad de gránulos secretorios, similar a lo encontrado en cultivos primarios del tumor parental P07 (Fig. III.3). Las células LP07 se mantienen en cultivo en MEM adicionado de 10% SFB. El comportamiento *in vivo* de las células LP07 es muy similar al tumor primario P07, con una elevada incidencia (90%) de metástasis espontáneas en pulmón.

Las células P07 y LP07 se cultivaron en MEM 10% SFB, a 37° C en atmósfera humidificada de 5% CO₂ en aire. Se utilizaron los repiques nº 10-40 de las células LP07.

Todas las células utilizadas en este trabajo fueron periódicamente controladas para contaminación con micoplasma, mediante tinción con Hoescht 33258 (Sigma).

Tabla III.II. Características del modelo de adenocarcinoma de pulmón, constituido por el tumor parental P07 y su línea derivada LP07 (Diamant y col., 1998; Urtreger, y col. 2001).

	P07	LP07
Latencia (días) ^A	9 (8-10)	3 (2-4)
Nº células requeridas para 100% de toma tumoral	8×10^5	5×10^4
Tasa de crecimiento tumoral (mm/día) ^B	$0,53 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,03$
Incidencia metástasis espontáneas (%)	100	90
Incidencia metástasis experimentales (%)	0	100
Invasividad local	No	No

(^A: Mediana (rango); ^B: media $\pm$ SD).

Células LP07

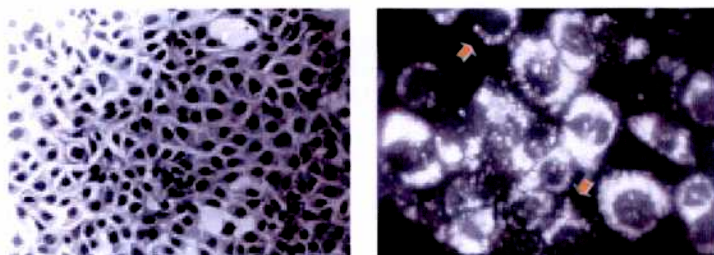


Figura III.3

Células LP07 en cultivo, a la izquierda (400X). A la derecha, se muestra la presencia de gran cantidad de gránulos secretorios en estas células, indicados por las flechas.

CAPITULO IV

MATERIALES y MÉTODOS

TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Los cultivos primarios y líneas celulares fueron cultivados en medio completo hasta subconfluencia (70-90%); se lavaron exhaustivamente con PBS y se trataron con 0,04 a 40 ng/ml de TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 (proteínas recombinantes humanas purificadas, Oncogene Research Products, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) en MEM con o sin SFB, durante distintos periodos de tiempo.

En adelante, cuando no se especifique de qué isoforma se trata indicará que se utilizaron las tres isoformas de TGF- β .

PREPARACIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS (MC) y LISADOS CELULARES (LC)

Para la obtención de MC, las células se cultivaron hasta subconfluencia en medio completo, se lavaron con PBS para eliminar restos de suero y se cultivaron 24 hs más en ausencia de suero. El medio de cultivo se recolectó y se centrifugó a 5.000 rpm para eliminar restos celulares.

Los LC se obtuvieron a partir de cultivos subconfluentes tratados con buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasas (5 mM DTT, 10 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml aprotinina; Sigma, Saint Louis, MO, USA) y de fosfatasa (Sigma). El contenido proteico celular se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1985).

Todas las muestras se alicuotaron y conservaron a -20°C hasta su uso.

EXPRESIÓN y CUANTIFICACIÓN DE TGF- β y T β RS

Cuantificación de la actividad biológica de TGF- β por un bioensayo:

Este método permite detectar la actividad de TGF- β secretado, en base a la capacidad de la citoquina de inhibir la proliferación de las células reporter MvLu1 (Stampfer y col., 1993), muy sensibles al efecto antiproliferativo de TGF- β .

Se sembraron 2×10^4 células Mv1Lu/50 μ l/well en placas multiwell 96-wells (Corning Costar Corporation, NY, USA) en D-MEM (Gibco, Rockville, MD, USA) suplementado con

0.4% SFB. Una hora más tarde, cuando las células se adhirieron a la placa, se las estimuló con 50 µl de distintas diluciones de MC (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,1%, 1,6%) obtenido de células sin tratar y recolectado como se describió más arriba. Esta metodología permite detectar tanto las formas latente como activa de TGF-β. La forma activa de TGF-β presente en el MC 24 hs se mide ensayando MC tal cual se recolectó sobre las células reporter. Para medir la totalidad de TGF-β producido por las células (activo + latente), es necesario activar en forma artificial la porción de citoquina latente. Para ello, se realizaron dos tratamientos alternativos del MC, por acidificación con 5N HCl y luego neutralización con NaOH/Hepes (Danielpour y col., 1989), o por calentamiento, 5 min a 80°C (Brown y col., 1990). Además, en cada ensayo se construyó una curva estándar de TGF-β1 purificado.

Las células Mv1Lu se trataron 20 hs con los distintos MC (tratados y sin tratar) y luego se incubaron durante 4-8 hs en presencia de 1 µCi/well de timidina tritiada (TdH³, Dupont NEN Research Products, Boston, MA, USA). Las células se lisaron con 6 M cloruro de guanidinio, se recolectaron en tubos de vidrio (Nunc, Roskilde, Denmark) y la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

Con el fin de confirmar que la proliferación de las células reporter fue afectada específicamente por la actividad de TGF-β, se realizó el mismo experimento con MC pre-incubados (2 h) con 10 µg/ml de un pan-anticuerpo neutralizante de TGF-β (Anti-TGF-β1,2,3; Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA), utilizando como control 10 µg/ml de IgG normal de ratón.

Expresión de TGF-β a nivel de proteína:

El nivel de expresión de las diferentes isoformas de TGF-β se analizó mediante Western blot de lisados de células sin tratar. Para ello, los LC se diluyeron con sample buffer (0,5 M Tris (pH 6,8), 10% SDS, 1 mg/ml azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) y se calentaron 5 min a 100°C. Las muestras se resolvieron en geles 4-15% SDS-PAA, según se describió anteriormente (Laemmli, 1970). Luego, los geles fueron transferidos (25 V; 60 min) a membranas PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) utilizando el método Semidry-transfer (BioRad, Hercules, CA, USA). Las membranas obtenidas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con buffer de bloqueo (5%

leche descremada, en PBS/0,1% Tween 20) y se incubaron con una dilución 1:200 de los anticuerpos policlonales de conejo anti-TGF- β 1, anti-TGF- β 2 ó anti-TGF- β 3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), overnight a 4°C. Estos anticuerpos están dirigidos contra una región interna de la proteína TGF- β madura.

Luego, las membranas se lavaron con buffer de lavado (PBS/0,1% Tween 20) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de horseradish (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech). Para el revelado de las membranas, se utilizó el método ECL (Enhanced Chemiluminescence reagent, Amersham Pharmacia Biotech). Las bandas obtenidas se analizaron y semicuantificaron mediante densitometría (Molecular Analyst TM GS-700, BioRad).

Como control de expresión, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina (AC-40, Sigma). Este anticuerpo nos permitió detectar la β -actina de las células epiteliales. Para ello, las mismas membranas fueron tratadas con buffer de stripping (62,5 mM Tris, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol, pH 6,7), 40 min a temperatura ambiente. Luego, las membranas se bloquearon e incubaron con 1:500 anti-actina y como segundo anticuerpo se usó un anti-ratón acoplado a HRP (1:2000, Vector, Burlingame, CA, USA). El revelado se realizó como se describió más arriba.

Expresión de TGF- β a nivel de mRNA:

Mediante el ensayo de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*), estudiamos la expresión de TGF- β a nivel de mRNA.

La obtención de RNA total se realizó a partir de células cultivadas hasta subconfluencia en placas 150 mm (Corning) en medio completo. Luego, las células se lisaron con 4 M isotiocianato de guanidinio, 0,5% sarcosil, 25 mM citrato de sodio y 1% β -mercaptoetanol, y se procedió como se describió anteriormente (Chomczynski y Sacchi, 1987). Brevemente, las células se trataron con fenol-cloroformo y 2% SDS y se centrifugaron a 2000 rpm, 10 min a 10°C. Este procedimiento se realizó dos veces, luego de lo cual el RNA se precipitó con isopropanol y luego con etanol 70%, y se centrifugó cada vez a 3000 rpm durante 15 min; finalmente se resuspendió en agua tratada con DEPC overnight.

Posteriormente se agregó DNAasa libre de RNAasas (Qiagen) y se repitieron los pasos anteriores.

A fin de evaluar la calidad del RNA obtenido, se determinó la densidad óptica a 260, 280 y 230 nm y se calculó la relación entre A260 y A280, siendo el valor ~2,1-2,2 indicativo de pureza de RNA, mientras que un valor ~1 indica presencia de DNA en la muestra. Se calculó también la relación A260/A230, con un valor de 1,4-1,5. Además, la integridad del RNA obtenido se evaluó mediante corridas electroforéticas en geles 1% agarosa-formaldehído. El RNA obtenido se conservó a -80°C hasta su utilización.

La selección de primers para la amplificación de TGF- β 1 de ratón se realizó utilizando la información brindada en el sitio de internet NCBI-Nucleotide y *Primer3 Output* (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>). Los primers se diseñaron siempre dentro de las secuencias conservadas (conserved domain sequence ó CDS) del gen, utilizando el formato FASTA y de acuerdo a los siguientes requisitos: 18-24 ntdos de longitud; contenido GC entre 40 y 60%; un extremo 5' rico en GC y un extremo 3' rico en AT; similar temperatura de annealing; tamaño del producto entre 200 y 700 pb. Posteriormente, se utilizó el sitio BLAST para comparar cada secuencia elegida con las secuencias conocidas del mismo gen en distintas especies, a fin de escoger cada primer con mayor exactitud.

Una vez obtenidas las muestras de los primers seleccionados (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), se resuspendieron en TE y se calculó la concentración de cada muestra, mediante análisis de densidad óptica. Los primers se conservaron a -80°C hasta su uso.

Las secuencias de los primers utilizados para TGF- β 1 de ratón son las siguientes:

Primer Forward: CCA ACT ATT GCT TCA GCT CCA; Primer Reverso: TTG TGT TGG TTG TAG AGG GC. El tamaño del producto obtenido es ~210 bp.

Las muestras de RNA obtenidas previamente, se analizaron mediante el kit "SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq*" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que a partir de una muestra de RNA total permite realizar en un solo paso la síntesis de cDNA y la reacción de PCR. "Platinum *Taq*" es una mezcla de la polimerasa de DNA *Taq* recombinante y una transcriptasa reversa ("Superscript II H").

El primer análisis de las muestras se realizó empleando un ciclador iCycler (BioRad), mediante un protocolo de 28 ciclos de RT-PCR, consistentes en:

1 ciclo:	50°C, 30 min.
	94°C, 2 min.
28 ciclos:	94°C, 15 seg.
	52°C, 30 seg.
	72°C, 1 min.
1 ciclo:	72°C, 8 min.
	4°C.

En todos los ensayos, la expresión de β -actina a nivel de mRNA (352 pb) se empleó como control positivo. Las secuencias de los primers empleados para la actina celular son:

Primer Forward: GCT GGT CGT CGA CAA CGG CTC; Primer Reverso: CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TTTC.

Las muestras obtenidas se analizaron en geles 1,2% agarosa-formaldehído, en presencia de Bromuro de Etidio en el gel, empleando un marcador de DNA tipo *ladder* (Invitrogen).

Expresión de T β Rs:

Para detectar la expresión a nivel de proteína de los receptores de señalización de TGF- β , T β RI y T β RII, se analizaron LC mediante Western blot, empleando 4-7,5% SDS-PAGE. Se utilizaron los anticuerpos policlonales de conejo (1:250) anti-T β RI y anti-T β RII (Santa Cruz Biotechnology) y como segundo anticuerpo, un anti-conejo acoplado a HRP (1:2000, Vector).

Debido a que el elevado peso molecular de T β RIII dificulta su análisis mediante Western blot, su expresión se estudió por Dot blot sobre membranas de PVDF, usando el anticuerpo policlonal de cabra anti-T β RIII (1:500, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) y como segundo anticuerpo, un anti-cabra/HRP (1:2000, R&D Systems).

Las membranas se revelaron como se describió anteriormente.

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Los estudios de las vías moleculares de señalización de TGF- β fueron realizados empleando la línea celular LM3 como modelo experimental.

Mediante 12,5% SDS-PAGE y Western blot se estudió la activación por TGF- β de distintas vías de transducción de señales. Para ello se utilizaron LC de células LM3 tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1 durante diferentes períodos de tiempo (30 y 60 min, 2 hs, 4 hs y 24 hs) a fin de determinar la cinética de activación de las distintas vías. El uso de anticuerpos específicos anti-proteínas fosforiladas permitió detectar los niveles de activación de las distintas moléculas señal, y con anticuerpos anti-proteínas totales se estudió la expresión total de cada molécula señal en respuesta a TGF- β .

Las cascadas de señalización estudiadas fueron:

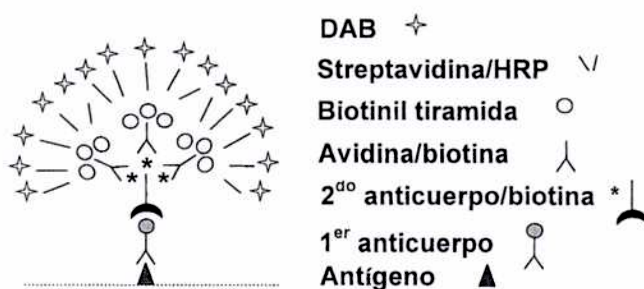
Familia Smad:

Se evaluó si TGF- β es capaz de inducir la fosforilación de Smad2 y Smad3 (R-Smads) en el dominio de activación C-terminal, así como de modular la expresión de la Co-Smad Smad4, en las células LM3. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: un anticuerpo de conejo anti-fosfo-Smad2 Ser465/467 (1:500, Cell Signaling, USA) capaz de reconocer también fosfo-Smad3; un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Smad2 (1:2000, 34G6, Cell Signaling); y un anticuerpo de ratón anti-Smad4/DPC4 (1:500, BD Biosciences, Mansfield, MA, USA). Como segundos anticuerpos se utilizaron un anti-conejo acoplado a HRP (1:2000, Vector) y un anti-ratón/HRP (1:2000, Vector).

Además, mediante inmunofluorescencia se analizó la localización subcelular de las proteínas Smad4, un indicador de activación génica vía Smads. Para ello, se sembraron células sobre cubreobjetos y se trataron con 4 ng/ml TGF- β 1 durante 15, 30, 60, 90 min, 4 hs y 24 hs en medio sin suero. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron con PBS/0,05% Tritón X-100 (Sigma), durante 30 min. Los cubreobjetos se incubaron con buffer de bloqueo 1 h a temperatura ambiente y luego con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Smad4 (1:100, B-8, Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó como segundo anticuerpo un anti-ratón acoplado a TRITC (1:200, Sigma) durante 1 h a

temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos se montaron utilizando una solución de glicerina/PBS (1:1). Se tomaron fotografías con microscopio de fluorescencia (400X) (Eclipse E400, Nikon).

Por otra parte, evaluamos la presencia y localización subcelular de Smad4 en cortes histológicos del tumor primario M3, mediante inmunohistoquímica. Para ello, los cortes se deshidrataron y permeabilizaron con 0,5% Tritón/PBS. Luego, se los sometió a microondas para incrementar la exposición antigénica (~750 W, 3 min), en buffer 0,1 M citrato de sodio pH 6. Luego, se incubaron los vidrios con 10% H₂O₂ en metanol, durante 7 min. Más tarde, se bloquearon con 5% leche descremada/PBS (40 min) y se los incubó con un anticuerpo anti-Smad4 (el mismo utilizado para Inmunofluorescencia), 1:50 durante overnight a 4°C. Como segundo anticuerpo se empleó un anticuerpo anti-mouse biotinilado (1:500, Vector), durante 1 h a temperatura ambiente, y luego se incubaron los vidrios con avidina-biotina durante 30 min en oscuridad. A continuación se utilizó como método de amplificación el kit "TSA Biotin System" (Tyramide Signal Amplification; PerkinElmer, Canadá), basado en la deposición de tiramidas acopladas a biotina (como reactivo de amplificación). Este kit se empleó de acuerdo a las indicaciones de su fabricante, incubando los vidrios con 1:50 biotinil tiramida, 7 min, seguido de otra incubación con streptavidina/HRP 1:100 en buffer bloqueo, durante 30 min. Por último, la visualización cromógena se produjo mediante DAB (diaminobenzidina; "kit ABC", Vector), durante 3 min de acuerdo a las especificaciones de fábrica. En el siguiente esquema se muestran los distintos pasos de esta técnica.



Vías Mitogen-activated protein kinase (MAPK):

Se evaluó la cinética de regulación de las vías MAPK p38Mapk y MEK/ERK, en respuesta a TGF- β 1. Para estos ensayos se emplearon los siguientes anticuerpos: un anticuerpo de conejo anti-fosfo-p38Mapk Thr180/Tyr182 (1:500, Cell Signaling); y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfo-p44/42 Mapk Thr202/Tyr204 (1:1000, Cell Signaling). Los segundos anticuerpos utilizados se describieron más arriba.

Por otra parte, con el fin determinar qué vías participan en distintas respuestas biológicas inducidas por TGF- β , las células se trataron *in vitro* con distintos inhibidores de quinasas para bloquear farmacológicamente las diferentes vías. Los compuestos utilizados son: el inhibidor de la vía p38Mapk, SB202190 (10 μ M, Calbiochem); el inhibidor de MEK1/2, U0126 (5 μ M, Calbiochem) y el inhibidor de cRaf1, 5-Iodo-3-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methylene]-2-indolinone (5 μ M, Calbiochem). Todos los ensayos biológicos se realizaron según lo explicado antes, con el agregado de cada inhibidor de quinasas una hora antes del inicio del tratamiento con TGF- β .

EXPRESIÓN GÉNICA

Con el objeto de estudiar la acción de TGF- β a nivel de expresión génica, se realizaron los siguientes ensayos en las células altamente invasivas y metastásicas LM3, así como en las células no-transformadas NMuMG.

Análisis transcripcional:

Mediante el uso del kit "Dual Luciferase Reporter Assay System" (Promega, Madison, WI, USA), se evaluó el efecto de TGF- β sobre la actividad transcripcional de diversos promotores en las células LM3 y NMuMG.

Para ello, se sembraron 6×10^4 células/ml en placas 24-wells, en medio completo. Al día siguiente, las células fueron transfectadas de forma transitoria con 0,1 μ g/ml de los siguientes plásmidos reporteros de actividad luciferasa de *Firefly luciferase* (*Lux*):

- ❖ p(CAGA)₁₂-lux (ó SBE-lux). Esta construcción contiene doce repeticiones de la secuencia CAGAC, a la cual se unen en forma específica las proteínas Smad3/4 como parte del complejo de factores de transcripción (Dennler y col., 1998). Las cajas CAGA se clonaron upstream de un promotor mínimo constituido por TATA box y por la secuencia iniciadora del "Major Late Promoter ó MLP" de adenovirus.
- ❖ p3TP-lux (3xTPA + PAI). Contiene tres sitios AP1 y un fragmento del promotor humano PAI-1. Es regulado por Smads, SP1 y AP1 (Dennler y col., 1998).
- ❖ pFN-lux (Fibronectina). Es una construcción basada en el promotor de FN humano, en la región +520, -87. Es Smad- y SP1-dependiente (Moses, datos no publicados).
- ❖ pGCLC-lux (g-glutamyl cystein synthase ó gamma-GCS). Constituye el dominio catalítico de la enzima glutatión-cisteín ligasa. Deriva del promotor proximal humano GCLC y consiste en un fragmento de 3924 pb (-3678 a + 246). Es regulado por NRF2 (Bakin, comunicación personal).

Para controlar la eficiencia de transfección, las células se co-transfectaron con 0,002 µg/ml del plásmido reportero de actividad luciferasa de *Renilla reniformis*, pCMV-Renilla (*RI-Lux*) (Promega), utilizando 4 µl FuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA)/µg DNA. Ambos tipos de plásmidos manifiestan actividad luciferasa al ser expresados, aunque son de distinto origen. A las 24 hs de transfectadas, las células se lavaron y cultivaron 6 hs en medio completo fresco. Luego, se trataron o no con 1 ng/ml TGF-β1 durante 16 hs y posteriormente se lisaron siguiendo el protocolo establecido en el kit. La actividad de cada promotor se analizó mediante luminómetro (Monolight 2010 luminometer, Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA, USA). La actividad de *Lux* se normalizó por la actividad de *RI-Lux* y se expresó como Unidades Relativas de actividad Luciferasa (URL).

EFFECTOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* DE TGF-β

Ensayos de proliferación celular

Ensayo de incorporación de timidina tritiada:

Se sembraron células provenientes de cultivos primarios (6×10^4 células/ml) o líneas celulares (3×10^4 células/ml) en medio completo, en placas 96-wells. Las células Mv1Lu se utilizaron como control del experimento. A las 24 hs, las células se lavaron con PBS y se trataron con distintas concentraciones de TGF-β, en MEM 2% SFB (para minimizar los efectos de TGF-β y otros factores de crecimiento presentes en el suero). Luego de 20 hs de tratamiento, las células se incubaron con 1 mCi/ml TdH³. Al cabo de 4-8 hs, las células se lisaron, recolectaron y analizaron como se describió para el "Bioensayo".

Para corroborar que las células LM3 y LMM3 son resistentes a los efectos antiproliferativos de TGF-β, se realizaron los siguientes estudios adicionales:

Recuento celular:

Se sembraron 2×10^4 células/ml en placas multiwell 24-wells, en medio completo. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS, se agregó MEM 2% SFB y se iniciaron los tratamientos con 0,4-4 ng/ml TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 durante 48, 72 y 96 hs. A cada tiempo de tratamiento, las células se tripsinizaron, se tiñeron con Azul Tripán y se contaron bajo microscopio óptico. Se registró el número de células vivas y muertas después de cada tratamiento.

Análisis del ciclo celular:

Con el fin de determinar si TGF- β es capaz de modular alguna de las fases del ciclo en las células LM3 y LMM3, se empleó el método de análisis de imágenes microscópicas Cell Analysis System (CAS). Brevemente, $1,2 \times 10^4$ células/ml se sembraron en cámaras Lab-Tek de 12 wells ("tissue culture chamber-slides", Nunc) en medio completo y se incubaron hasta subconfluencia. Luego, las células se trataron con 4 ng/ml TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 durante 24 y 48 hs, se fijaron y tiñeron con Feulgen para la evaluación del contenido de DNA. Se analizaron bajo microscopía 200 células de cada tratamiento. Por otro lado, se calculó el índice mitótico en base al recuento celular en fase M, analizando mil células de cada tratamiento.

Ensayo de clonogenicidad:

El crecimiento clonal de las células LM3 y LMM3 se estudió como se describió previamente (Urtreger y col., 1997). Brevemente, se obtuvieron suspensiones monocelulares y se sembraron $1,3 \times 10^3$ células/ml en placas 6-wells en medio completo, para detectar la capacidad de células aisladas de formar colonias. A las 24 hs, las células se trataron con 0,4-4 ng/ml TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 en medio completo. Cada 72 hs, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, adicionado de SFB y suplementado o no con TGF- β . A los 6 días de tratamiento, las células se lavaron, se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Las placas fueron analizadas mediante densitometría cuantitativa.

Estudio de enzimas proteolíticas y sus inhibidores

Se analizó el efecto de TGF- β sobre la producción de enzimas proteolíticas involucradas en el proceso metastásico, como las metaloproteinasas (MMPs) y el sistema plasminógeno/plasmina. Para ello, se utilizaron MC de células tratadas o no con TGF- β .

Actividad de MMPs:

La actividad biológica de MMPs se estudió mediante zimografía en geles 4-9% SDS-PAA copolimerizados con 0,1% gelatina (Sigma) como sustrato *in situ* de la enzima (Pittman, 1985). Los geles obtenidos se lavaron con 2% Tritón X-100 para desplazar al SDS y se incubaron a 37°C en buffer colagenasa (0,25 M Tris, 1 M NaCl, 0,025 M CaCl₂ (pH 7,4)). Al cabo de 24 ó 48 horas, los geles se tiñeron con 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250. Las bandas de gelatinólisis se observan como bandas claras sobre el fondo azul y se analizaron por densitometría cuantitativa. Los valores de DO obtenidos se refirieron al contenido proteico celular, como Unidades Arbitrarias (UA)/mg proteína celular. Además, para confirmar que la actividad observada era MMPs, los geles se incubaron en buffer colagenasa conteniendo 25 mM EDTA, que bloquea la actividad de las MMPs, o con 5 mM aprotinina ó PMSF, inhibidores de serino-proteasas.

Actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) secretado:

La actividad proteolítica de uPA se determinó por caseinólisis radial (Alonso y col., 1993). Para ello, se sembraron 10 μ l MC en hoyos de 3 mm diámetro en un gel compuesto por 2,5% agarosa (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina) adicionado de 33 mg/ml leche descremada (fuente de caseína), 2 μ g/ml plasminógeno (Chromogenix, Mölndal, Sweden) y 0,2 M Tris-HCl (pH 8). Además, se sembró en cada gel una curva estándar de 0,1-25 UI/ml uroquinasa purificada (Serono, Buenos Aires, Argentina). Los geles se incubaron overnight a 37°C en cámara húmeda. Se midió el diámetro de las áreas de caseinólisis y los valores obtenidos se refirieron a la curva estándar, se normalizaron por el

contenido proteico celular y se expresaron como Unidades Internacionales (UI) de uPA/mg proteína celular.

Actividad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) secretado:

La actividad proteolítica de uPA se determinó por caseinólisis radial (Alonso y col., 1993). Para ello, se sembraron 10 μ l MC en hoyos de 3 mm diámetro en un gel compuesto por 2,5% agarosa (Biodynamics SRL, Buenos Aires, Argentina) adicionado de 33 mg/ml leche descremada (fuente de caseína), 2 μ g/ml plasminógeno (Chromogenix, Mölndal, Sweden) y 0,2 M Tris-HCl (pH 8). Además, se sembró en cada gel una curva estándar de 0,1-25 UI/ml uroquinasa purificada (Serono, Buenos Aires, Argentina). Los geles se incubaron overnight a 37°C en cámara húmeda. Se midió el diámetro de las áreas de caseinólisis y los valores obtenidos se refirieron a la curva estándar, se normalizaron por el contenido proteico celular y se expresaron como Unidades Internacionales (UI) de uPA/mg proteína celular.

Actividad del uPa asociado a membrana (mb-uPA):

Debido a que se conoce que el uPA asociado a membrana es ~40 veces más efectivo en su actividad proteolítica que el uPA secretado (Ossowski, 1988), analizamos si TGF- β es capaz de modular el mb-uPA, mediante el ensayo descrito por Jänkun y col. (1991). Brevemente, células en subconfluencia se trataron con 0,04-4 ng/ml TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3. Luego, las células se incubaron 5 min con 0,1 M NaCl en 50 mM glicina-HCl (pH 3) (Tratamiento Ácido ó TA) y luego se neutralizaron con 0,5 M Tris-HCl (pH 7,8) (Tratamiento Neutro ó TN). El tratamiento ácido induce la separación del uPA unido a su receptor uPAR en la superficie celular; por lo tanto, todo el uPA detectado luego de este tratamiento corresponde a uPA citoplasmático. Por otra parte, las células fueron tratadas solamente con TN; el uPA medido en estas condiciones corresponde al uPA total.

Las células se lisaron con 1% Tritón X-100 y los LC obtenidos se ensayaron para actividad de uPA por caseinólisis radial, como se describió más arriba. La actividad del mb-

uPA se calculó como la diferencia entre las actividades del uPA total (TN) y el uPA intracelular (TA).

Actividad del Plasminogen Activator Inhibitor (PAI):

Mediante zimografía reversa se analizó la actividad del inhibidor de uPA, PAI. Brevemente, se ensayaron MC en geles 4-10% SDS/PAA copolimerizados con 33 mg/ml leche descremada y 2 µg/ml plasminógeno, sustratos de uPA. Los geles obtenidos se lavaron con 1% Tritón X-100 y se incubaron entre 30 min y 4 hs (dependiendo del tipo celular) en un buffer 20 mM Tris, 15 mM EDTA (pH 8,3) suplementado con 1 UI/ml uroquinasa purificada. Los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Blue. La actividad de PAI se observó como bandas azules sobre un fondo claro, en las zonas donde la actividad caseinolítica de uPA fue inhibida por acción de PAI. Los valores obtenidos de la densitometría cuantitativa se normalizaron por el contenido proteico celular y se expresaron como UA/mg proteína celular.

Expresión de uPAR:

Por medio de Western blot, se determinó la expresión a nivel de proteína del receptor de uPA. Se realizó 4-10% SDS-PAGE de lisados celulares. Para la detección de uPAR se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-uPAR (1:1000) (Ab-2, Oncogene Research Products) y el resto del ensayo se procedió como se describió más arriba.

Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR):

Estudiamos la expresión a nivel de mRNA de distintas moléculas involucradas en el establecimiento del fenotipo metastásico, como MMP-9, uPA y PAI-1, así como su regulación por TGF-β.

Para ello, se empleó RNA total de células tratadas o no con 2 ng/ml TGF-β1 durante 8 y 24 hs. Tanto la obtención del RNA como el ensayo de RT-PCR se realizaron como se describió más arriba. Todas las muestras se analizaron en primer lugar mediante RT-PCR de 28 ciclos. Luego, aquellas muestras cuya expresión fue muy elevada se sometieron a RT-PCR de 24 ciclos y aquellas de baja expresión, a RT-PCR de 32 ciclos.

Las secuencias de los primers utilizados en este ensayo son las siguientes:

Para MMP-9: Primer Forward: CGT CGT GAT CCC CAC TTA CT; Primer Reverso: AGG AAG ACG AAG GGG AAG AC.

Para uPA: Primer Forward: GCC TGC TGT CCT TCA GAA AC; Primer Reverso: TAG AGC CTT CTG GCC ACA CT.

Para PAI-1: Primer Forward: CTT TAC CCC TCC GAG AAT CC; Primer Reverso: GGC ATC CGC AGT ACT GAT CT.

Los productos obtenidos presentan el siguiente tamaño: MMP-9: 417 pb; uPA: 232 pb; PAI-1: 290 pb.

Estudio del citoesqueleto de actina

Mediante distintos ensayos se analizó si TGF- β es capaz de modular diversos componentes involucrados en la reorganización del citoesqueleto celular, en las células LM3.

Mediante microscopía de fluorescencia, se estudió el citoesqueleto de actina. Brevemente, las células se sembraron sobre cubreobjetos, en medio completo y se cultivaron hasta ~60% confluencia celular. Luego, se trataron con 2 ng/ml TGF- β 1 durante 15, 30 y 60 min, 4 y 24 hs, en ausencia de suero. Las células se fijaron con paraformaldehído (15 min) y se tiñeron con faloidina acoplada al compuesto fluorescente Alexa-Fluor 488 (ó alternativamente, faloidina-Alexa-Fluor 568, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) durante 30 min en PBS 0,5% leche descremada. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando la solución de montaje McIlvaine. Como colorante de contraste se utilizó Hoescht 33258. Las células se fotografiaron bajo microscopio de fluorescencia (600X ó 400X).

Por otra parte, se estudió si TGF- β regula la expresión y/o actividad de moléculas relacionadas con actina, como el complejo Arp2/3, la proteína heat shock protein 27 ó HSP27, la proteína myosin light chain 2 ó MCL2, y las tropomiosinas TM 1, 2, 3 y 6 (Ayscough, 1998).

En las células LM3, estudiamos si TGF- β era capaz de inducir la activación del complejo Arp2/3, empleando el kit "Arp2/3 Affinity kit" (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). Para ello, se sembraron 2×10^6 células en placas 100 mm, en medio completo y se cultivaron hasta

subconfluencia. A fin de reducir el nivel basal de actividad del complejo Arp2/3, las células se lavaron y se cultivaron en medio sin suero, 4 hs antes de iniciar el tratamiento con 2 ng/ml TGF- β 1, durante 10, 20, 30 y 40 min. Luego, las células se lisaron con el buffer de lisis del kit (50 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 0,15 M NaCl; 1% Tritón X-100; inhibidores de proteasas), se scrappearon y centrifugaron a 12000 rpm, 5 min a 4°C. El sobrenadante se recolectó y se separó una parte para ser utilizada como control del contenido total de proteínas. El resto se dividió en dos: a una parte se le agregó partículas de VCA-GST, a fin de precipitar el complejo Arp2/3; y a la otra parte del sobrenadante se le agregó partículas de GST, como control. Las muestras se incubaron con rotación durante 30 min a 4°C, en presencia de un buffer de dilución (50 mM PIPES pH 7; 1 mM MgCl₂; inhibidores de proteasas). Luego, se centrifugaron a 4000 rpm, 30 seg a 4°C, a fin de precipitar las partículas. Como control de esta etapa, se conservaron los sobrenadantes de esta centrifugación. Los pellets se lavaron con el buffer de dilución y se centrifugaron nuevamente. Finalmente, los pellets obtenidos se resuspendieron en sample buffer y se analizaron por Western blot de geles 12,5% SDS-PAA, utilizando un anticuerpo policlonal de oveja anti-Arp3 (1:200, "Arp2/3 Affinity kit", Cytoskeleton), capaz de detectar todo el complejo Arp2/3. Como segundo anticuerpo se usó un anti-oveja/HRP (1:500, Sigma). Los mismos ensayos se realizaron en las células no transformadas NMuMG.

Se analizó también si distintos inhibidores de quinasas modulan el efecto de TGF- β sobre el complejo Arp2/3. Para ello, se realizó el mismo protocolo descripto anteriormente, incubando las células durante 1 h con los distintos inhibidores de quinasas, 10 μ M SB202190, 5 μ M U0126, 20 μ M LY294002 (inhibidor de la vía PI3K-Akt; Calbiochem) previo al tratamiento con TGF- β 1 (2 ng/ml, 30 min).

Además, evaluamos la expresión a nivel de proteína de las tropomiosinas de alto peso molecular, mediante Western blot de LC de células tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1 durante 24 hs. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón TM311 (Sigma), que reconoce un epítipo N-terminal de las isoformas TM 1, 2, 3 y 6 (1:2000).

También analizamos la expresión de los genes α y β de TM a nivel de mRNA, mediante RT-PCR de 28 ciclos, tal como se describió más arriba. Para ello, utilizamos los siguientes primers:

Para TM- α : Primer Forward: GCT GGT GTC ACT GCA AAA GA; Primer Reverso: CCT GAG CCT CCA GTG ACT TC. El tamaño del producto obtenido es de ~506 pb.

Para TM- β : Primer Forward: AAG GAT GCC CAG GAG AAA CT; Primer Reverso: CTT CCT TCA GCT GCA TCT CC. El tamaño del producto obtenido es de ~259 pb. La expresión de actina celular a nivel de mRNA se empleó como control del ensayo.

La heat shock protein HSP27 participa en la polimerización y remodelación de la actina celular. Por medio de Western blot estudiamos si TGF- β es capaz de activar a HSP27 por fosforilación, en las células LM3. Para ello, utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-HSP27 Ser82 (1:200, Cell Signaling). Además, se analizó también la expresión a nivel de proteína de HSP27, empleando un anticuerpo policlonal de conejo anti-HSP27 (1:500, Santa Cruz Biotechnology).

Además, estudiamos la activación de la proteína MLC2, cuya función es similar a la de TM, induciendo la estabilización de la actina. Para ello, se analizaron LC de LM3 mediante Western blot, con un anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-MLC2 Thr18/Ser19 (1:500, Cell Signaling).

Por otra parte, mediante inmunofluorescencia analizamos el efecto de TGF- β en la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina, empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-E-cadherina (1:300, Santa Cruz Biotechnology). El resto del ensayo se realizó como se describió más arriba.

Ensayo de migración celular

El efecto de TGF- β sobre la motilidad celular se evaluó mediante el ensayo de cicatrización de heridas o "wound-healing". Para ello se sembraron $1,5 \times 10^5$ células/ml en placas de 35 mm, en medio completo. Al llegar a 100% confluencia celular, se realizaron heridas de ~ 400 μ m sobre las monocapas con la punta de un tip y se iniciaron los tratamientos con y sin TGF- β 1 (2 ng/ml), en MEM +2% SFB. A distintos tiempos de tratamiento y para determinar si las células en estudio eran capaces de cubrir esa herida, se tomaron fotografías de diferentes zonas de la herida. Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría cuantitativa.

Ensayo de invasión *in vitro*

La capacidad invasiva celular en respuesta a TGF- β se estudió utilizando cámaras Transwell (Corning) de 8 μ m/poro, en placas 24-wells. Los filtros de las cámaras fueron pre-cubiertos con 0,1% gelatina en su cara basal, y en su cara superior, con 250 μ g/ml de la membrana basal reconstituída Matrigel (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA). Luego, se sembraron 2×10^5 células en 0,15 ml MEM 2% SFB sobre el filtro, en contacto con el Matrigel, en presencia o no de 2 ng/ml TGF- β 1. Como quimioattractante, se utilizó 16 μ g/ml fibronectina (Sigma) en 0,5 ml MEM, el cual se colocó en cada well de la placa. Luego de 20 hs de tratamiento, los filtros se fijaron con Carnoy (15 min) y utilizando cottonettes se removieron suavemente las células en la cara superior del filtro. Los filtros se tiñeron con 10 μ g/ml Hoechst 33258 y el número de células que atravesaron el Matrigel se determinó mediante recuento bajo microscopio de fluorescencia (400X).

Por otra parte, el mismo ensayo se realizó en presencia de un inhibidor de MMPs, el compuesto BB-94 (British Biotech, Oxford, UK; generosamente otorgado por Dr. L. Matrisian), para determinar si la actividad de las MMPs está involucrada en este proceso biológico en las células tumorales en estudio.

EFFECTOS *IN VIVO* DE TGF- β

Los siguientes estudios *in vivo* se realizaron en las células LM3 parentales y/o en las líneas establecidas LM3/BMN, LM3/5KR y LM3/K277R. Las células transfectadas son capaces de expresar la proteína fluorescente EGFP, tanto *in vitro* como al ser inoculadas *in vivo* en ratones singéneos BALB/c.

Angiogénesis:

Con el fin de detectar la capacidad de las células tumorales de inducir la formación de neovasos, se inocularon intradérmicamente (*id*) en el dorso de los animales 2×10^5 células en 0,1 ml MEM en presencia de 50 μ l/ml azul tripán, para facilitar *a posteriori* la detección del sitio de inoculación. Al cabo de 5 días, los animales se sacrificaron utilizando éter, se expuso la cara interna de la piel y se tomaron fotografías de la zona de inoculación bajo lupa. Mediante el análisis de las imágenes obtenidas se determinó tanto el número de los vasos principales como de neovasos generados, expresándose como número de vasos por mm² de piel.

Además, se analizó si TGF- β es capaz de modular la capacidad angiogénica en células previamente tratadas *in vitro* con TGF- β 1 durante 24 hs.

En todos los ensayos, se utilizaron 5 animales por grupo experimental.

Tumorigenicidad y metástasis espontáneas:

Estudiamos si la sobreexpresión de formas funcionalmente inactivas de los receptores de TGF- β afecta la capacidad de formar tumores en las células LM3.

Brevemente, se inocularon 2×10^5 células en 0,2 ml MEM subcutáneamente (*sc*) en el flanco de ratones singéneos BALB/c. Previamente, las células fueron cultivadas hasta subconfluencia, se cosecharon en fase exponencial de crecimiento con Tripsina/EDTA, como habitualmente, se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo sin suero.

En cada ensayo se emplearon 10 animales por grupo experimental. Se evaluaron los siguientes parámetros: la latencia, definida como el tiempo que tarda el tumor en hacerse

palpable; la tumorigenicidad (% de toma tumoral); y la tasa de crecimiento (mm/día) a partir de la fase logarítmica de la curva de crecimiento, para lo cual se midieron el diámetro mayor y menor del tumor, dos veces por semana.

Los animales moribundos fueron sacrificados y se sometieron a autopsia, con especial interés en la búsqueda de focos metastásicos en ganglios linfáticos y en pulmones. Además, se aisló material de tumor y pulmones y se fijó para ser analizado posteriormente mediante estudios histopatológicos. Los pulmones se fijaron con solución de Bouin y fueron examinados bajo lupa, para determinar el tamaño y número de las metástasis superficiales.

Por otra parte, los tumores y algunos pulmones se evaluaron *ex vivo* bajo microscopio de fluorescencia para determinar la presencia de células EGFP positivas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) de los valores obtenidos, utilizando el test t-Student para comparaciones entre dos grupos de datos y el Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test Scheffe, a fin de evaluar conjuntamente más de dos grupos.

Para el bioensayo, se usaron ANOVA y el test Tukey-Kramer para comparaciones múltiples (Sokal y Rohlf, 1995); y para el análisis de curvas de dosis-respuesta se empleó el programa ALLFIT basado en una ecuación logística de cuatro-parámetros y F-test (DeLean y col., 1978).

Para el análisis del número de metástasis, se emplearon los tests no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos se consideraron de significancia biológica a un nivel de $p < 0,05$.

TERCERA PARTE

**RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO**

CAPITULO V

**CARACTERIZACIÓN DEL
SISTEMA ENDÓGENO TGF- β /T β RS**

V.1. SECRECIÓN DE TGF- β y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Mediante un bioensayo se determinó la producción *in vitro* de las formas activa y total de TGF- β por las células de cultivos primarios M3 y MM3, así como de las líneas LM3 y LMM3. Este ensayo se basa en la medición indirecta de TGF- β a través de su efecto inhibitorio del crecimiento de las células reporter epiteliales de pulmón de visón Mv1Lu.

Determinamos que las células M3 y MM3 producen TGF- β , en estado latente en su mayor proporción, y lo secretan al medio condicionado (MC) (**Fig. V.1A**). Mediante el análisis de la dosis inhibitoria 50 (DI50) de las curvas de MC y de TGF- β purificado ensayados sobre las células Mv1Lu, determinamos que sólo ~5-10% del total del TGF- β secretado se encuentra en la forma biológicamente activa, tanto en las células M3 como en las MM3 (**Tabla V.I**). Es importante destacar que si bien los niveles de secreción de TGF- β biológicamente inactivo son similares en ambos tipos celulares, las células altamente metastásicas MM3 secretan aproximadamente el doble de TGF- β total que las células poco metastásicas M3.

Por otra parte, detectamos que ambas líneas celulares, LM3 y LMM3, producen TGF- β predominantemente en su estado latente, al igual que las células parentales. Además, ambas líneas producen una cantidad de TGF- β total similar a lo secretado por las células altamente metastásicas MM3 (datos no mostrados).

En todos los casos, tanto el tratamiento ácido del MC como el tratamiento por calor fueron eficaces en la activación del TGF- β latente (datos no mostrados).

A fin de confirmar que la actividad inhibitoria del crecimiento observada en las células reporter era debida específicamente a la acción de TGF- β , se realizó el mismo ensayo con MC pre-incubados con un pan-anticuerpo neutralizante (Anti-TGF- β 1,2,3). El efecto antiproliferativo de TGF- β sobre las células Mv1Lu fue completamente abolido por la presencia del anticuerpo anti-TGF- β (**Fig. V.1B**); mientras que ninguno de los controles utilizados, tanto el anticuerpo anti-TGF- β como la IgG normal de ratón, tuvo efecto sobre la acción de la citoquina (**Fig. V.1B**).

Todos estos datos confirman que todas las células analizadas de carcinoma de mama murino son capaces de secretar TGF- β , tanto activo como activable.

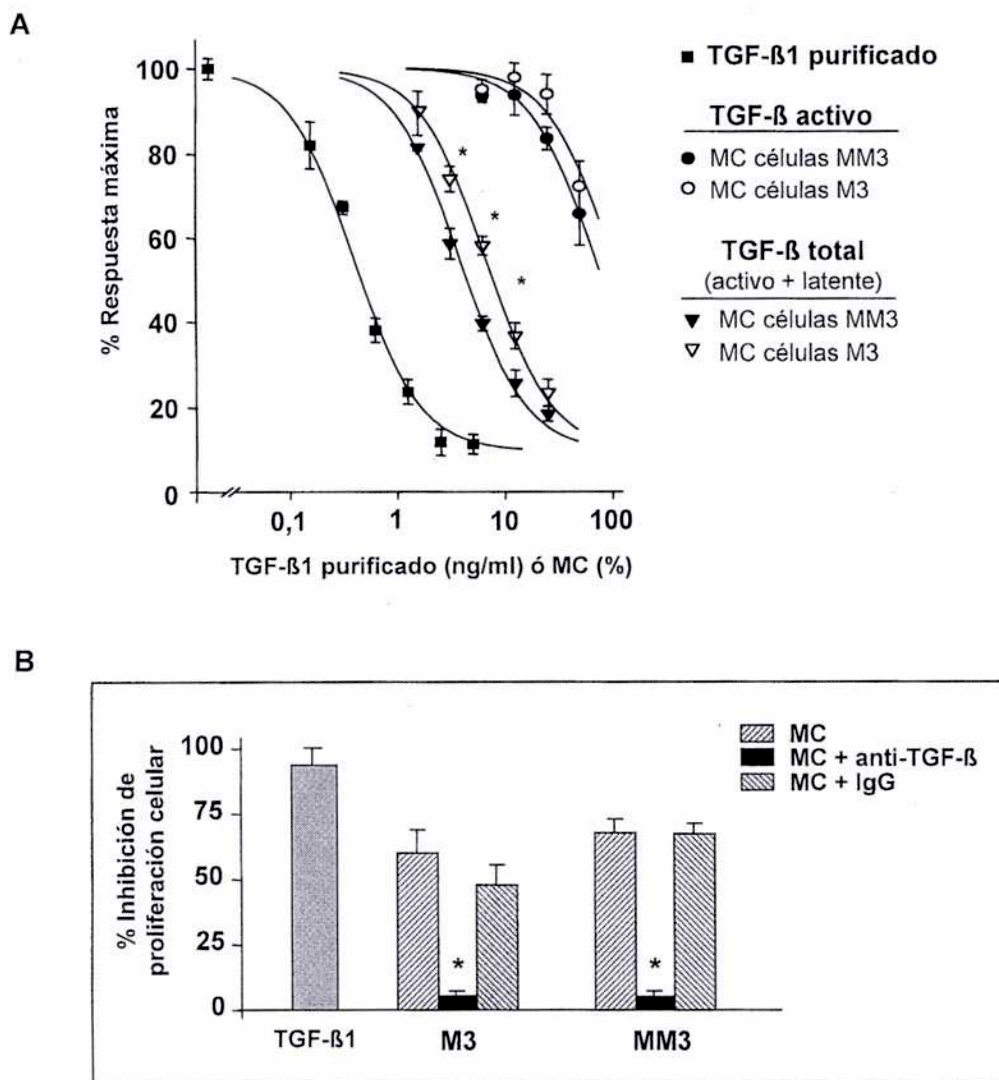


Figura V.1

(A) Bioensayo para evaluar la producción de TGF- β en medios condicionados (MC) activados previamente o sin activar, provenientes de células M3 y MM3. Los MC se ensayaron sobre células reporter Mv1Lu y se evaluó la proliferación celular. Los datos representan el porcentaje de incorporación máxima de TdH³ respecto a las células sin tratar. Los valores se expresan como la media $\pm$ desvío estándar (SD) de triplicados y son representativos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) M3 vs MM3.

(B) Las células Mv1Lu se trataron con los mismos MC en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β (10 μ g/ml) o de IgG normal de ratón (10 μ g/ml). Los valores representan la media $\pm$ SD de triplicados. * $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) vs controles respectivos (MC ó MC + IgG).

Tabla V.I

Producción de TGF- β

	TGF-β total (activo + latente) (ng/ml)#	TGF-β activo (ng/ml)#
M3 cells	5,90 $\pm$ 0,4	0,42 $\pm$ 0,02
MM3 cells	10,60 $\pm$ 0,8*	0,58 $\pm$ 0,05

Cuantificación de la producción de TGF- β en el MC de M3 y MM3, determinado por comparación entre las *DI*50 (dosis inhibitorias 50) de las curvas dosis-respuesta para TGF- β purificado y para los MC (ver fig. V.1A).

Los valores se expresan como la media $\pm$ SD de triplicados; fueron normalizados por el contenido proteico celular y son representativos de tres ensayos independientes.

*p<0,05 vs células M3 (F-test).

V.2. EXPRESIÓN DE TGF- β

La expresión de TGF- β a nivel de proteína se analizó mediante Western blot de lisados celulares (LC) de cultivos primarios y de las líneas derivadas.

Utilizando anticuerpos específicos contra las distintas isoformas de TGF- β , detectamos que todas las células estudiadas expresan la forma dimérica madura de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, de ~24 kDa (**Fig. V.2A**). Cabe destacar que el mayor nivel de expresión de TGF- β se encontró siempre en las células altamente metastásicas MM3. Por otra parte, no se encontraron diferencias en la expresión de TGF- β entre las células LM3 y LMM3 (**Fig. V.2A**).

V.3. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES ESPECÍFICOS DE TGF- β , T β RS

La expresión de los receptores de señalización de TGF- β , T β R1 y T β R2, se estudió por Western blot de homogenatos tumorales ó LC de los diferentes tipos celulares. Se determinó que tanto las células parentales M3 y MM3 como las células LM3 y LMM3 expresan constitutivamente T β R1 y T β R2, de ~65 kDa y ~80 kDa, respectivamente (**Fig. V.2B**). Mediante análisis densitométrico de las bandas observadas, se encontró que las células altamente metastásicas MM3 presentan un mayor nivel de expresión de ambos receptores comparado con las demás células estudiadas. Por otra parte, debido al elevado peso molecular de T β R3, su expresión se estudió mediante Dot blot. Determinamos que tanto los tumores parentales como las líneas derivadas presentan niveles similares de expresión de T β R3 (no mostrado).

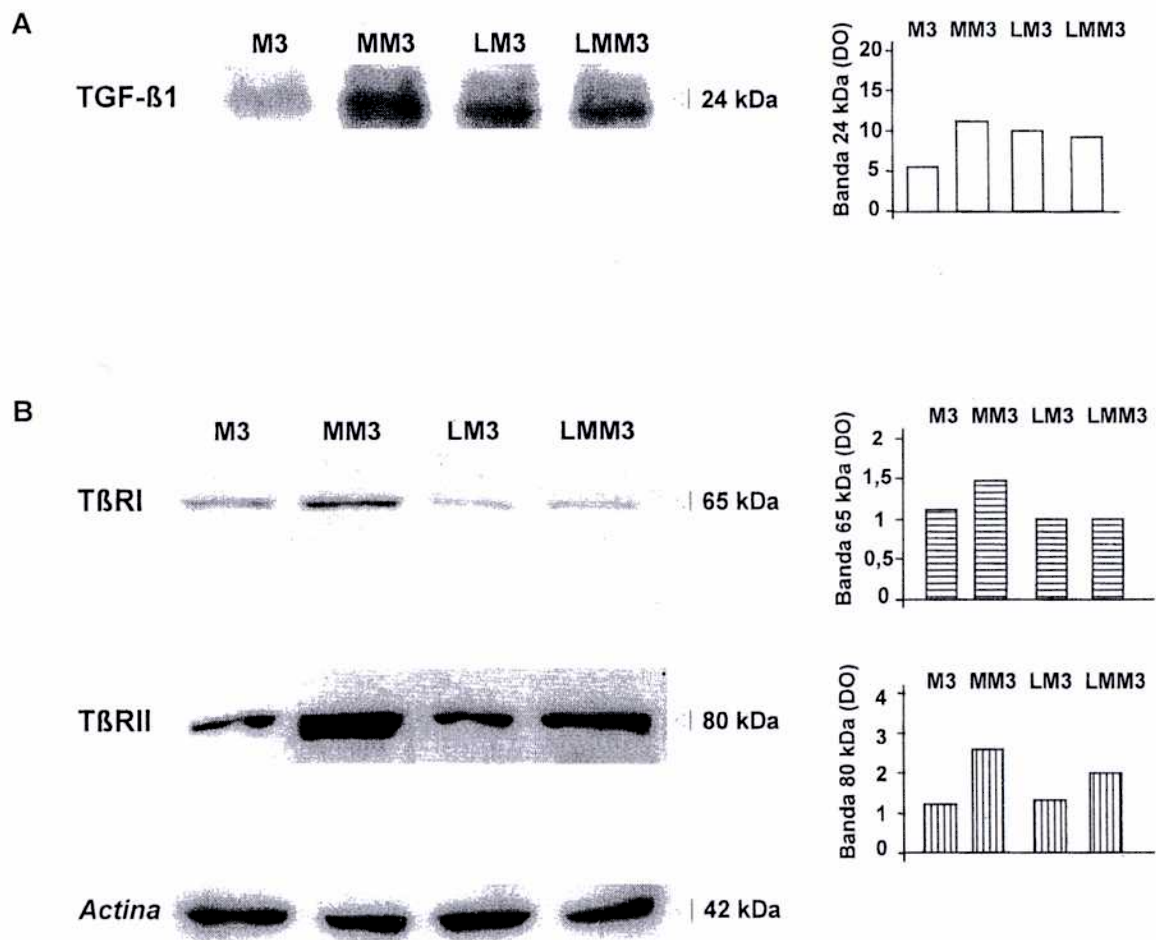


Figura V.2

(A) Expresión de TGF- β 1 a nivel de proteína, mediante Western blot de lisados celulares (LC) de células de adenocarcinoma mamario murino. Los valores representan la densidad óptica (DO) de las bandas mostradas y son representativos de dos experimentos independientes. Resultados similares se obtuvieron para la expresión de TGF- β 2 y TGF- β 3 (datos no mostrados).

(B) Expresión de los receptores de señalización de TGF- β (T β Rs) por Western blot. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. La expresión de actina se utilizó como control del ensayo.

CAPITULO VI

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDAS POR TGF- β

VI.1. FAMILIA SMADS

Mediante Western blot de LC de células LM3 tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1 durante distintos períodos de tiempo, determinamos que TGF- β induce la activación por fosforilación de Smad2 a los 30 min de tratamiento, efecto que persiste hasta las 4 hs de tratamiento, sin afectar el nivel de expresión de la proteína (**Fig. VI.1A**). Además, por el mismo ensayo observamos que las células LM3 expresan la Co-Smad Smad4 y que dicha expresión no es modulada por TGF- β 1 (**Fig. VI.1A**). Sin embargo, por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal encontramos que TGF- β 1 induce la activación de la proteína Smad4 en las células LM3. La activación de Smad4 induce la translocación al núcleo celular a partir de los 30 min de tratamiento con la citoquina y hasta los 90 min (**Fig. VI.1B**). Estos resultados confirman que el sistema TGF- β es funcional a nivel de proteínas Smad, en las células tumorales de mama LM3.

Por otra parte, mediante inmunohistoquímica de cortes del tumor parental M3, determinamos la presencia de la proteína Smad4 en núcleos de las células M3 (**Fig. VI.1C**). Estos datos constituyen una primer evidencia de que las células de nuestro modelo son capaces de responder *in vivo* a TGF- β .

VI.2. OTRAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

El análisis bioquímico mediante Western blot demostró que TGF- β 1 (2 ng/ml) induce la activación por fosforilación de la proteína p38Mapk a los 60 min y 2 hs de tratamiento con la citoquina (**Fig. VI.2**). Además, TGF- β es capaz de activar las moléculas señal ERK1 y ERK2, a partir de las 2 hs de tratamiento y hasta las 24 hs (**Fig. VI.2**). Por otra parte, el nivel de expresión total de las proteínas analizadas no fue modulado por TGF- β , incluso después de 24 hs de tratamiento (datos no mostrados).

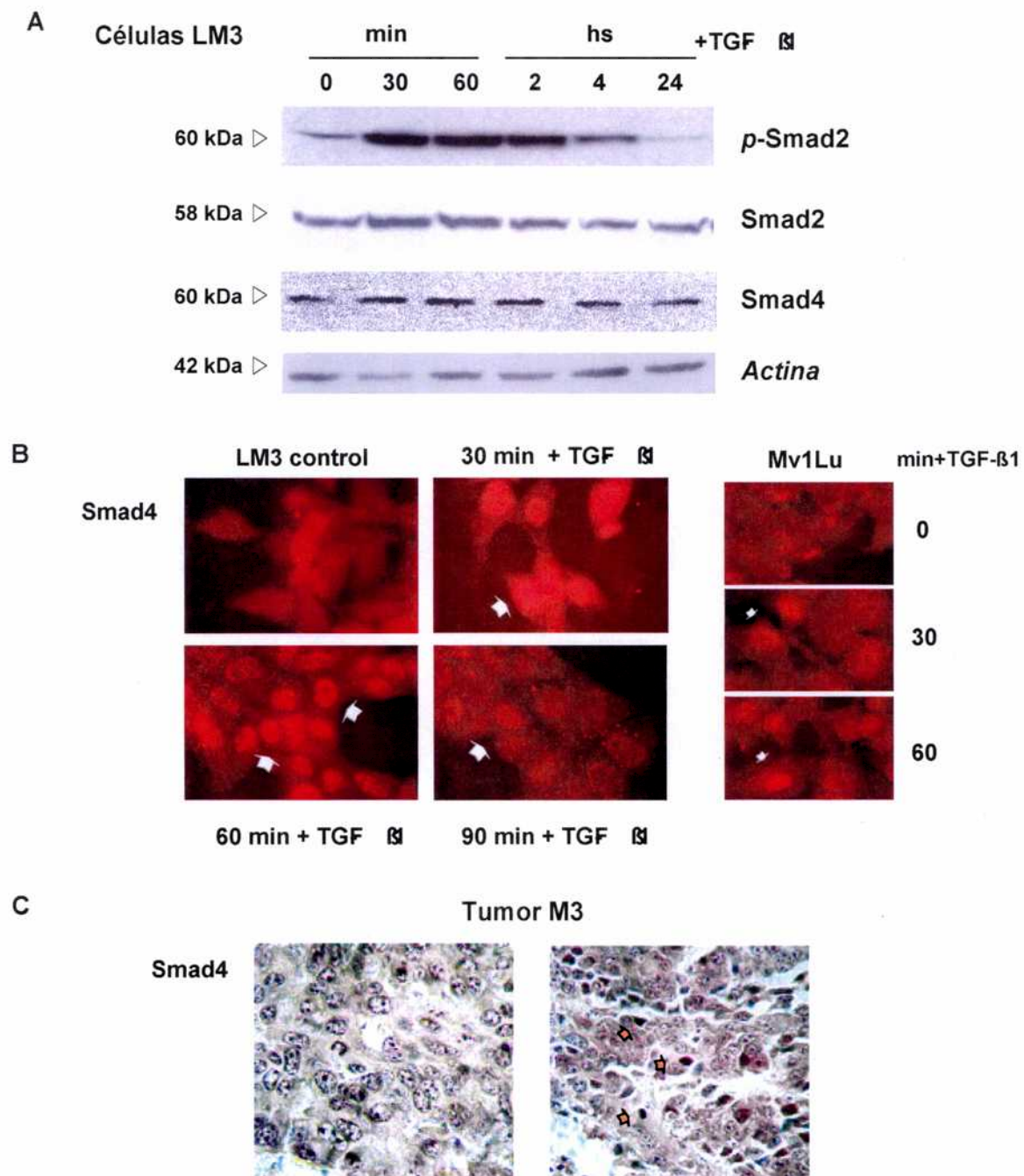


Figura VI.1

(A) Western blot de las moléculas de señalización Smad en las células LM3. Las bandas corresponden a la cinética de activación por fosforilación de Smad2 y a la expresión total de Smad2 y Smad4, en respuesta a 2 ng/ml TGF β . Como control se muestra la expresión de actina.

(B) Translocación nuclear de Smad4 en las células LM3 en respuesta a TGF β (flechas, 1000X), por microscopía de fluorescencia. Las células Mv1Lu se utilizaron como control del ensayo.

(C) Translocación nuclear de Smad4 en cortes histológicos del tumor primario M3, mediante inmunohistoquímica, a la derecha (flechas, 400X). A la izquierda se muestra el control de la técnica, por omisión del 1^{er} anticuerpo.

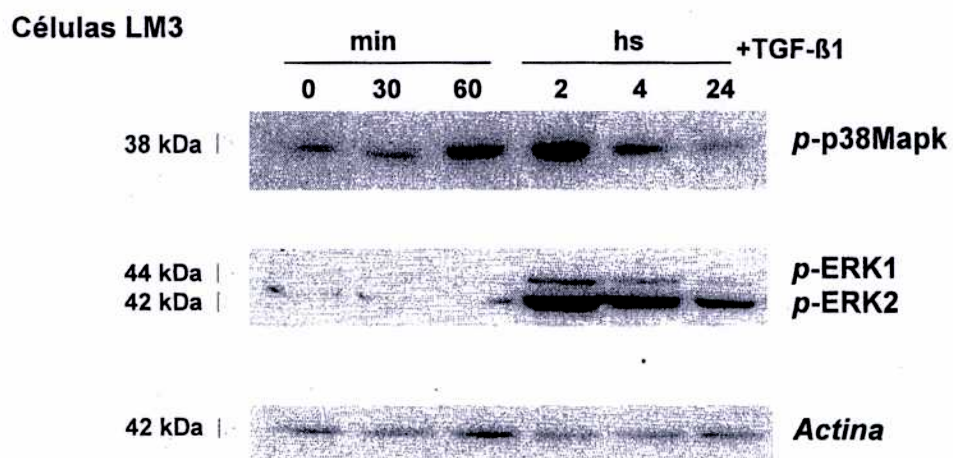


Figura VI.2

Cinética de activación de las proteínas MAPKs p38Mapk y ERK1/2, medida por Western blot de LC de células LM3 tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1. La expresión de actina se empleó como control del experimento.

CAPITULO VII

EFFECTO DE TGF- β SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO

VII. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

Como se mencionó en la Introducción, una de las principales vías de transducción de señales de TGF- β es la familia de proteínas Smad. Con el objeto de conocer si la activación de las proteínas Smad por TGF- β regula la transcripción de genes target en las células LM3, evaluamos la actividad de diversos promotores en respuesta a TGF- β , mediante el uso de un kit que permite la cuantificación del nivel de activación de un promotor génico.

Las células LM3 fueron transfectadas con distintos plásmidos reporteros de actividad luciferasa, como p(CAGA)₁₂-lux, secuencia a la cual se unen las proteínas Smad como factores de transcripción; p3TP-lux para detectar SP1, Smads y AP1; pGCLC-lux, para NRF2, y pFN-lux para detectar SP1 y Smads. En respuesta al tratamiento con 1 ng/ml TGF- β 1 exógeno, se detectó un marcado incremento en la actividad de los promotores CAGA-lux y 3TP-lux (6 y 3 veces, respectivamente) en las células LM3; mientras que los promotores génicos de FN-lux y GCLC-lux no fueron modulados por la citoquina (**Fig. VII**). En las células NMuMG, en cambio, se conoce que TGF- β induce la actividad de los promotores CAGA (50 veces), 3TP (10 veces) y FN (3 veces), mientras que inhibe la del promotor GCLC (50%), como se muestra a modo de inserto en la Fig. 5B (Bakin y col., 2000).

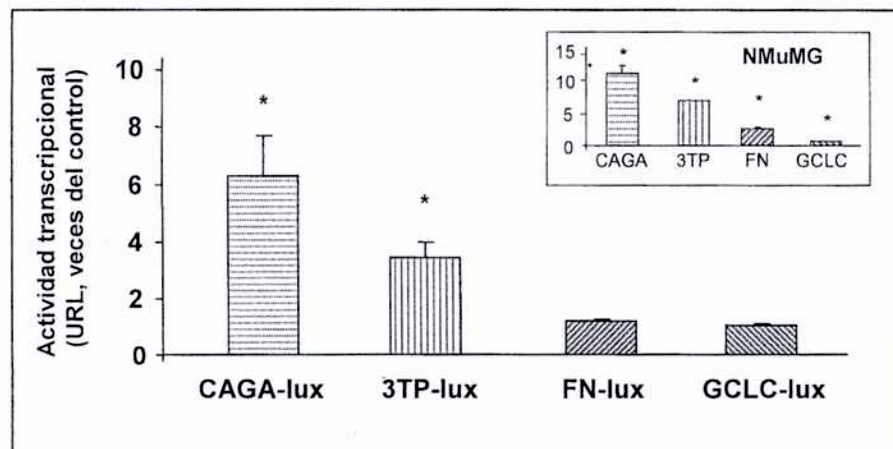


Figura VII

Efecto de TGF- β 1 (1 ng/ml) sobre la transcripción génica en las células LM3. Las células se transfectaron en forma transitoria con distintos plásmidos reporteros con actividad luciferasa. El nivel de transcripción de los distintos promotores génicos se midió con luminómetro. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de triplicados de unidades relativas de actividad luciferasa (URL) y son representativos de dos experimentos independientes. En el inserto se muestran los datos obtenidos en las células no-tumorigénicas NMuMG transfectadas con los mismos reporteros.

* $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) vs células sin tratar.

CAPITULO VIII

EFFECTOS *IN VITRO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA

VIII.1. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

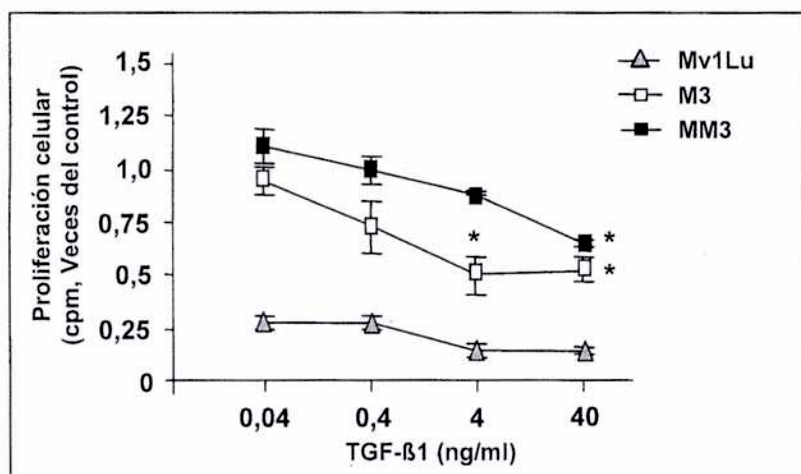
Como se mencionó anteriormente, TGF- β es un potente inhibidor de la proliferación de células de estirpe epitelial. Mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada (TdH³), se analizó la respuesta de las células de cultivo primario M3 y MM3 al efecto antiproliferativo de TGF- β . Las células Mv1Lu fueron utilizadas como control del ensayo, debido a su gran sensibilidad al efecto antiproliferativo de TGF- β . Determinamos que el tratamiento con 0,04-40 ng/ml TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 exógenos purificados indujo una inhibición dosis-dependiente en la proliferación de ambos tipos celulares (**Fig. VIII.1A**). Sin embargo, como puede observarse por las pendientes de las curvas de crecimiento, las células altamente metastásicas MM3 fueron menos sensibles a los efectos antimitogénicos de TGF- β que las células poco metastásicas M3. Pej: mientras que las células M3 pudieron ser inhibidas ~50% con 4 ng/ml TGF- β 1, el crecimiento de las células MM3 sólo se redujo un ~30% con la dosis más elevada de citoquina.

Además, se evaluó el mismo efecto biológico de TGF- β sobre las líneas celulares LM3 y LMM3. Encontramos que ninguna isoforma de TGF- β fue capaz de modular la proliferación de estas células, incluso a altas concentraciones (**Fig. VIII.1B**).

A fin de confirmar que TGF- β no tiene efecto sobre el crecimiento de LM3 y LMM3, se realizaron ensayos adicionales, como recuento celular, análisis del ciclo celular y ensayo de clonogenicidad. Se determinó que en ambos tipos celulares, el tratamiento con TGF- β no es capaz de modular la distribución de las células en las distintas etapas del ciclo celular; no afecta el Índice mitótico (**Tabla VIII.I**) ni la capacidad de crecer en baja densidad (datos no mostrados).

Cabe destacar que, si bien no se realizaron ensayos específicos para el estudio de la apoptosis, mediante recuento de células apoptóticas determinamos que las células tratadas con TGF- β e inhibidas por la citoquina presentaron una tasa similar de apoptosis que las células control sin tratar (datos no mostrados), por lo que TGF- β no estará induciendo apoptosis en nuestro modelo.

A



B

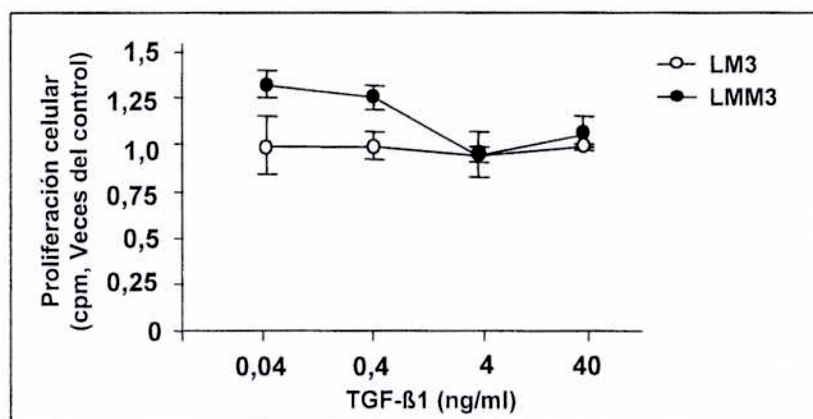


Figura VIII.1

Efecto de TGF-β1 sobre la proliferación de cultivos primarios (A) y líneas celulares de adenocarcinoma de mama (B), medido por incorporación de TdH³. Las células Mv1Lu se utilizaron como control del efecto antiproliferativo de TGF-β. Los valores se expresan en *cpm* como la media ± SD de triplicados y son representativos de tres experimentos distintos. Resultados similares se obtuvieron con las demás isoformas de TGF-β en todas las células estudiadas (datos no mostrados).

* $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) vs células sin tratar.

Tabla VIII.1

Acción de TGF- β sobre el ciclo celular

Fase del ciclo	G0/G1	S	G2/M	<i>Indice Mitótico</i>
control	36,3 $\pm$ 0,2	35,7 $\pm$ 4,3	27 $\pm$ 6,1	10%
TGF-β1	35,6 $\pm$ 9,7	25,6 $\pm$ 2,7	34,8 $\pm$ 3,8	11,7%

Efecto de TGF- β 1 (4 ng/ml) sobre el ciclo celular en las células LM3, medido por CAS y por recuento de imágenes mitóticas. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de duplicados y representan el porcentaje de células en cada una de las etapas del ciclo. Los mismos experimentos se realizaron con TGF- β 2 y TGF- β 3, con resultados similares.

Bajo las mismas condiciones, se obtuvieron resultados similares en las células LMM3 (datos no mostrados).

VIII.2. ACCIÓN DE TGF- β SOBRE LA SECRECIÓN DE PROTEASAS

Previamente, en el Instituto Roffo, se determinó que los factores de crecimiento IGF-I y -II y EGF aumentan la secreción de uPA de todas las células de nuestro modelo de tumor de mama (Guerra y col., 1996). En este trabajo, estudiamos el rol de TGF- β en la regulación de enzimas proteolíticas claves en la progresión tumoral.

VIII.2.1. Secreción de metaloproteinasas (MMPs)

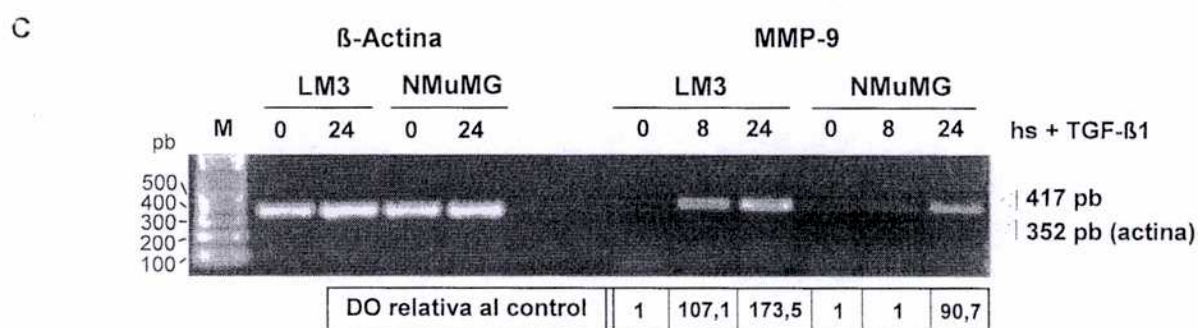
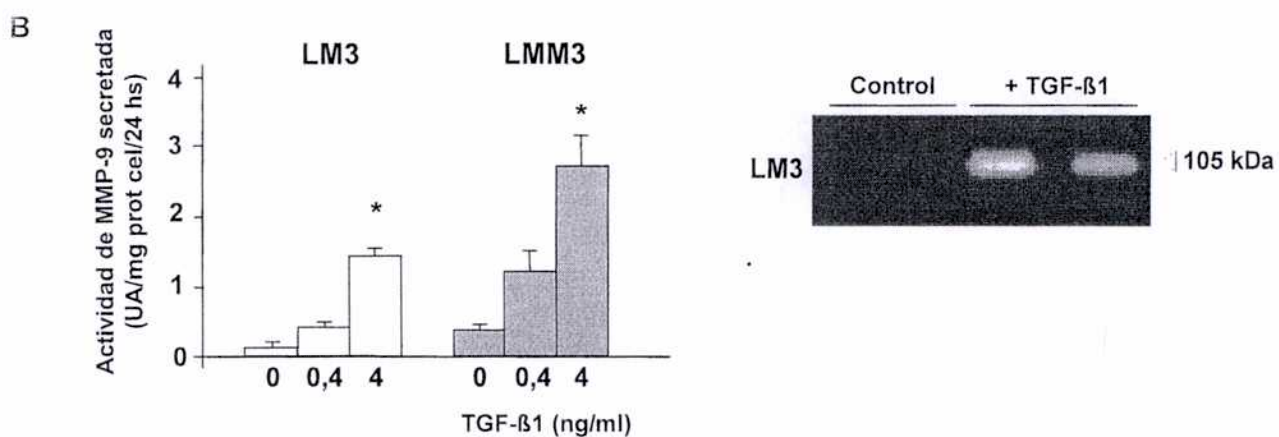
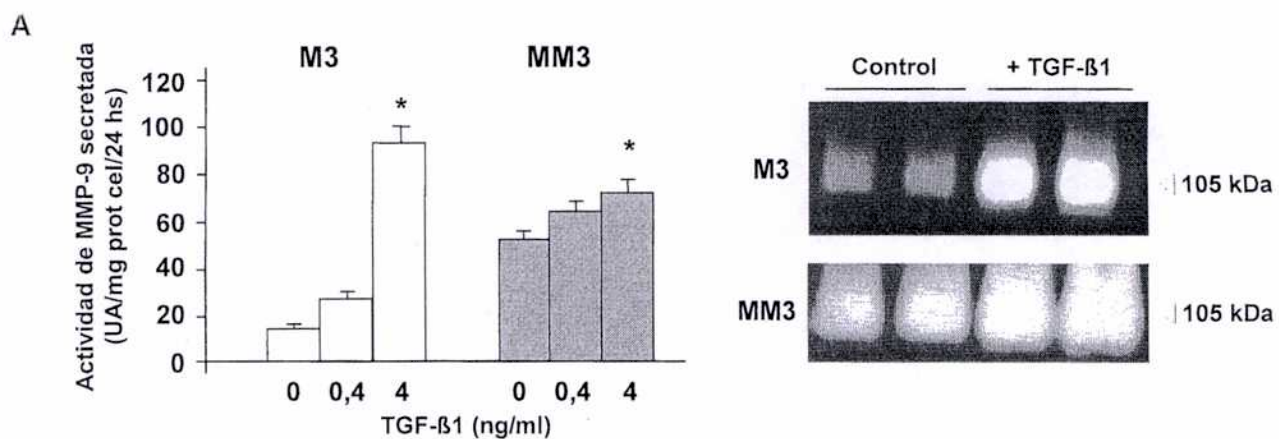
Para detectar si TGF- β es capaz de modular la producción de MMPs, MC de cultivos primarios o de líneas celulares tratados o no 24 h con distintas dosis de TGF- β 1, TGF- β 2 ó TGF- β 3 se analizaron mediante zimografía cuantitativa. Encontramos que todas las células estudiadas secretan constitutivamente MMP-9, una colagenasa tipo IV muy relacionada con la invasión tumoral, de 105 kDa en ratón (Fig. VIII.2.1). Cualquier isoforma de TGF- β indujo un aumento dosis-dependiente en la actividad de MMP-9 en todas las células estudiadas (Fig. VIII.2.1A y VIII.2.1B). Es de destacar que la actividad basal de MMP-9 es apenas detectable en las células M3; mientras que es marcadamente mayor en las células más metastásicas MM3 (Fig. 7A). Además, con el fin de confirmar que la actividad proteolítica se debía exclusivamente a la acción de MMPs, realizamos el mismo ensayo en presencia de distintos inhibidores de proteasas. Mientras que la presencia de PMSF o aprotinina no alteró el patrón de bandas en la zimografía, 25 mM de EDTA fueron suficientes para bloquear totalmente la actividad proteolítica observada (datos no mostrados). Estos resultados indican que las bandas observadas en los MC analizados corresponden a metaloproteinasas calcio-dependientes.

Además, mediante RT-PCR de 32 ciclos estudiamos si TGF- β es capaz de regular la expresión de MMP-9 a nivel de mRNA en las células LM3. Encontramos que TGF- β 1 (2 ng/ml) induce la expresión del mRNA de MMP-9 en estas células, a partir de las 8 hs de tratamiento e incluso luego de 24 hs de tratamiento (~100 y ~170 veces con respecto al control, respectivamente) (Fig. VIII.2.1C). Se compararon estos resultados con los obtenidos en células no-tumorigénicas de la misma estirpe NMuMG. Se encontró que TGF- β también

induce la expresión del mensajero de MMP-9 en las células NMuMG, si bien sólo después de 24 hs de tratamiento (~90 veces del control). En ambos casos, por RT-PCR de 28 ciclos se evaluó la expresión del mRNA de actina celular, como control del ensayo.

También mediante zimografía cuantitativa se analizó el efecto de TGF- β sobre la actividad de MMP-9 en las células LM3 que expresan las formas dominante negativas (dn) de T β RI y T β RII, denominadas LM3/5KR y LM3/K277R, respectivamente. Como control del ensayo se emplearon las células transfectadas con el vector control, LM3/BMN, y las células parentales LM3. Se encontró que en las células LM3/BMN, al igual que las células LM3, TGF- β 1 (2 ng/ml) aumenta significativamente la producción de MMP-9. Sin embargo, la sobreexpresión de las formas quinasa-inactivas de cualquiera de los receptores de señalización bloquea casi totalmente esta respuesta a TGF- β (**Fig. VIII.2.1D**).

Por otra parte, con el fin de determinar qué vías de señalización están involucradas en el efecto de TGF- β sobre la actividad de MMP-9, se realizó el mismo ensayo en presencia de los inhibidores de quinasas SB202190, PD98059 y LY294002. Se detectó que el aumento de la actividad de MMP-9 por TGF- β es aún más marcado en presencia de los compuestos SB202190 y PD98059, lo que indicaría que las vías p38Mapk y MEK/ERK participan de este efecto de la citoquina (**Fig. VIII.2.1E**).



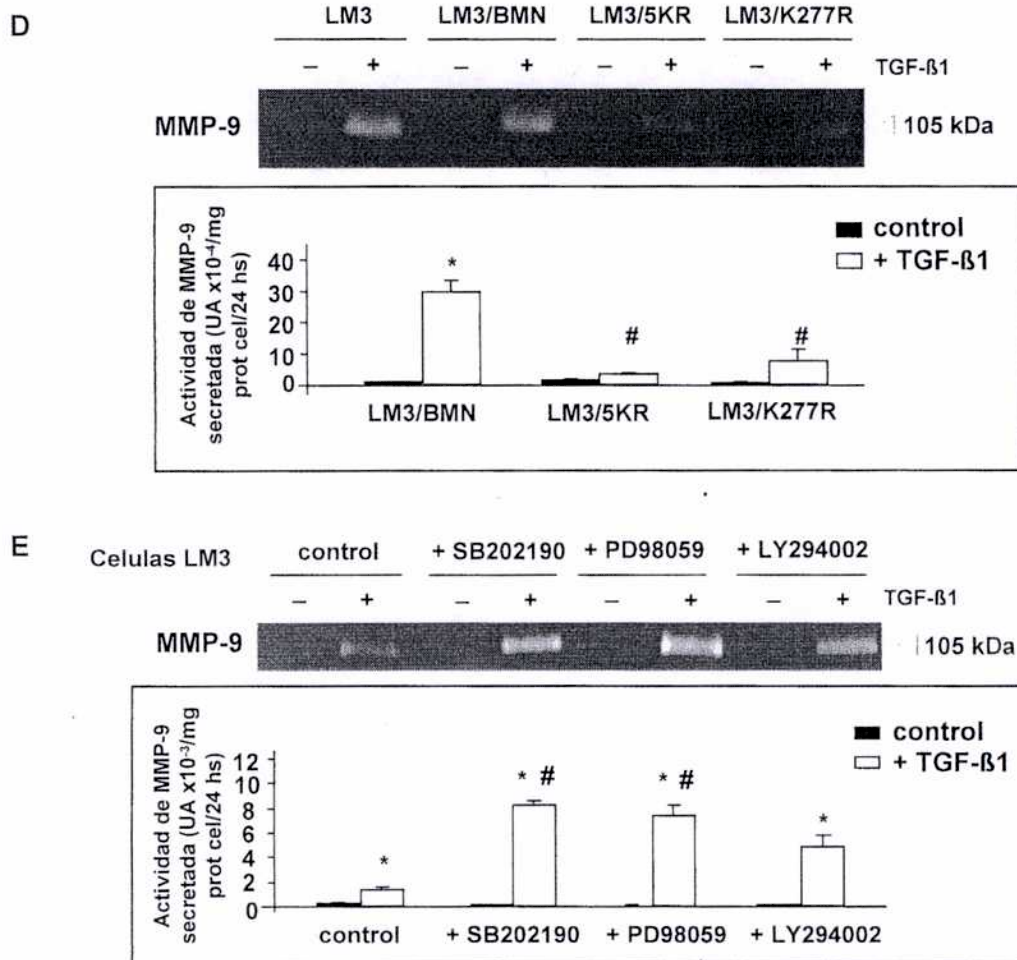


Figura VIII.2.1

(A-B) Cuantificación de la actividad de MMP-9 murina en respuesta a TGF- β 1 (4 ng/ml), en cultivos primarios (A, **panel izquierda**) o líneas celulares (B, **panel izquierda**) por zimografía. Se muestran zimografías representativas de las células M3 y MM3 (A, **panel derecha**), y de las células LM3 (B, **panel derecha**). Los valores se expresan en Unidades Arbitrarias (UA) normalizadas por el contenido proteico celular, como la media $\pm$ SD de duplicados, y son representativos de tres experimentos independientes. Resultados similares se obtuvieron en respuesta a TGF- β 2 y TGF- β 3. * $p < 0,05$ (t-test) comparado con células control.

(C) RT-PCR (32 ciclos) de MMP-9 en células tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1 durante 8 y 24 hs. Los datos son representativos de dos experimentos independientes y se expresan en veces del control sin tratar. La expresión del mRNA de actina celular se empleó como control del ensayo.

(D) Actividad de MMP-9 en las células que expresan dnT β RI (LM3/5KR) ó dnT β RII (LM3/K277R) tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1, mediante zimografía. Las células LM3 y LM3/BMN se usaron como control del ensayo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de duplicados y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ (t-test) vs el control respectivo; #: $p < 0,05$ (t-test) vs LM3/BMN tratadas con TGF- β 1.

(E) El mismo ensayo que en (D), en presencia de los inhibidores de p38Mapk (SB202190), MEK/ERK (PD98059) y PI3K (LY294002). * $p < 0,05$ (t-test) vs control; # $p < 0,05$ (t-test) vs LM3 tratadas con TGF- β 1.

VIII.2.2. Sistema de activación del plasminógeno

En el modelo de adenocarcinoma de mama murino, evaluamos si TGF- β es capaz de regular los distintos componentes del sistema de activación del plasminógeno, sabiendo que su interacción juega un rol importante en la invasión tumoral y la metástasis.

VIII.2.2.a) Actividad del uPA secretado.

Mediante caseinólisis radial se analizó el efecto de TGF- β sobre la actividad del uPA secretado por las células al MC 24 hs. Determinamos que mientras que en las células M3 TGF- β 1 y TGF- β 2, pero no TGF- β 3, inhibieron en forma dosis-dependiente la actividad del uPA secretado, ninguna isoforma de TGF- β fue capaz de regular la actividad de uPA en las células MM3 ni en la línea celular LM3 (**Fig. VIII.2.2.1A**). Por otra parte, en las células altamente invasivas y metastásicas LMM3, se observó un aumento dosis-dependiente (hasta 2 veces) en la actividad proteolítica de uPA en respuesta a cualquier isoforma de TGF- β . En las células no-tumorigénicas NMuMG, la actividad de uPA basal fue indetectable por caseinólisis radial. Además, no se encontró modulación de uPA por TGF- β en estas células (datos no mostrados).

Además, mediante RT-PCR de 28 ciclos se estudió la expresión de uPA a nivel de mRNA, en las células LM3 tratadas o no durante 24 hs con 2 ng/ml TGF- β 1. Se encontró que TGF- β no es capaz de modular significativamente el mRNA de uPA ni en las células no-tumorigénicas NMuMG ni en las células LM3 (**Fig. VIII.2.2.1B**). Es de destacar que en las células tumorales LM3 el nivel basal de expresión del mensajero de uPA es elevado, siendo indetectable en las células NMuMG, en las cuales también es indetectable su actividad (**Fig. VIII.2.2.1B**). La expresión del mRNA de actina se utilizó como control del experimento.

VIII.2.2.b) Actividad del uPA asociado a membrana, mb-uPA.

uPA ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor específico de membrana, uPAR. Así, el uPA asociado a membrana, mb-uPA, focaliza y aumenta marcadamente la invasividad de las células tumorales (Aguirre-Guiso y col., 1999). Evaluamos el efecto de distintas dosis de TGF- β 1 sobre la actividad de mb-uPA en LC de cultivos primarios y líneas

celulares. A pesar de que todas las células estudiadas presentan actividad mb-uPA constitutiva, TGF- β sólo fue capaz de modular dicha actividad en las células altamente metastásicas MM3. P.ej.: la actividad de mb-uPA aumentó ~10 veces en respuesta a 4 ng/ml TGF- β 1 (**Fig. VIII.2.2.1C**). Además, TGF- β también indujo un aumento en el uPA total asociado a células (intracelular y de membrana) en las células MM3, del cual ~30-50% corresponde a mb-uPA (**Fig. VIII.2.2.1C**).

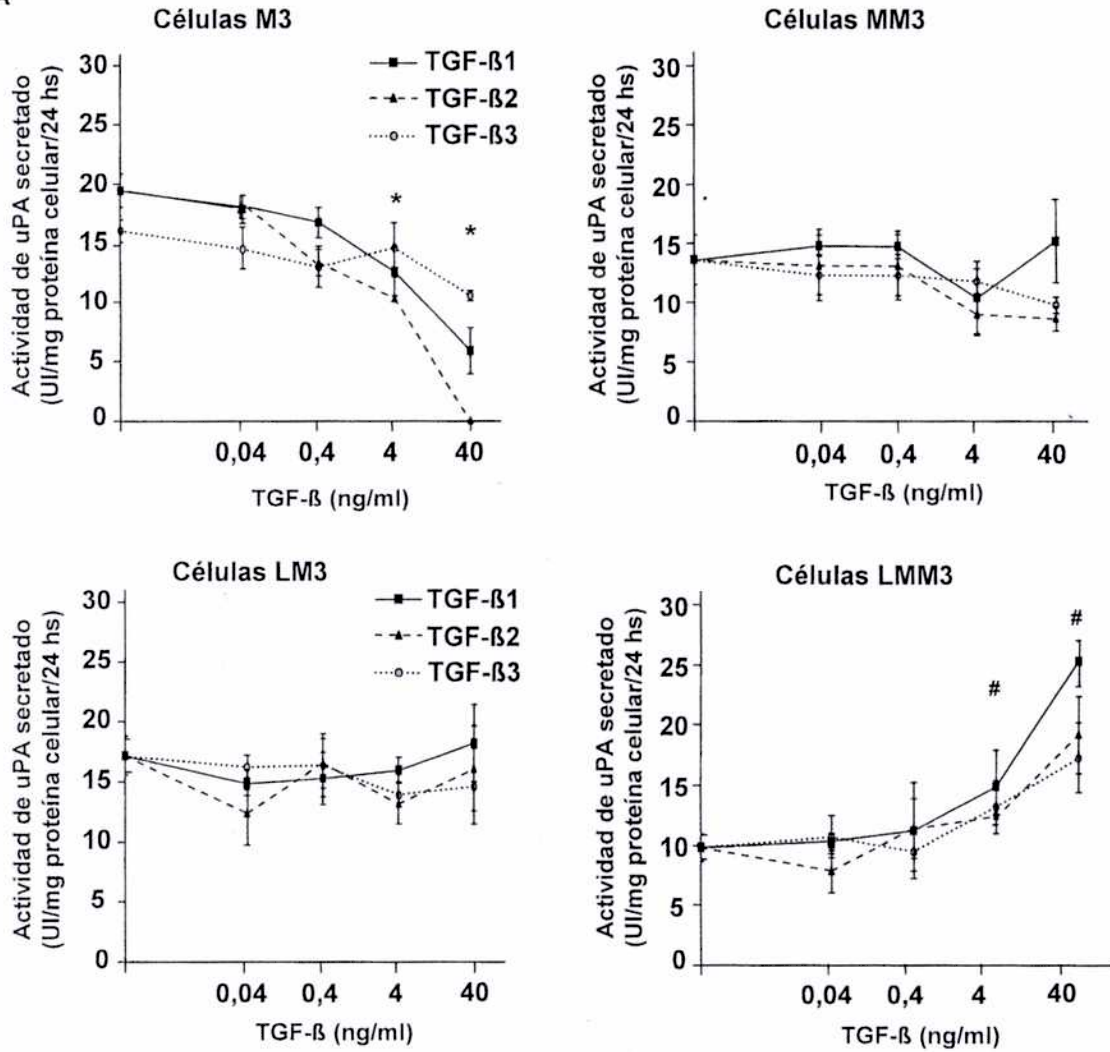
VIII.2.2.c) Actividad del inhibidor de uPA, PAI (Plasminogen Activator Inhibitor).

Con el objeto de dilucidar los diversos efectos producidos por TGF- β sobre el uPA en las distintas células estudiadas, analizamos mediante zimografía reversa la presencia en MC del inhibidor de uPA, PAI. Encontramos que TGF- β indujo un marcado aumento dosis-dependiente en la actividad de PAI en las células de cultivo primario M3, así como en las líneas LM3 y LMM3 (**Fig. VIII.2.2.2A**). Ninguna isoforma de TGF- β en ninguna de las concentraciones ensayadas fue capaz de afectar la secreción de PAI en las células altamente metastásicas MM3 (no mostrado). Cabe destacar que en las células poco metastásicas M3, la actividad de PAI en respuesta a TGF- β fue considerablemente mayor que en las células altamente invasivas y metastásicas LM3 y LMM3 (**Fig. VIII.2.2.2A e inserto**).

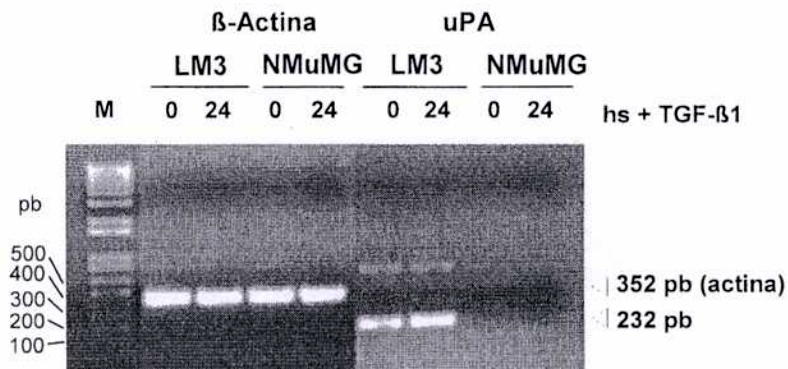
Por otra parte, se conoce que TGF- β 1 es un potente inductor del gen de PAI-1 (Hua y col., 1999). Mediante RT-PCR de 28 ciclos estudiamos si TGF- β regula la expresión de PAI-1 a nivel de mRNA. Observamos que TGF- β 1 (1 ng/ml) induce la expresión del mRNA de PAI-1 en las células LM3 (~2 veces del control) a las 8 y 24 hs de tratamiento (**Fig. VIII.2.2.2B**). El mismo ensayo se realizó en paralelo en las células NMuMG, en las cuales TGF- β produjo un incremento de ~6 veces en el mRNA de PAI-1 luego de 24 hs de tratamiento (**Fig. VIII.2.2.2B**).

En la **Tabla VIII.2** se sintetizan los resultados obtenidos en relación al rol de TGF- β en la regulación de proteasas, en el modelo de adenocarcinoma de mama murino.

A



B



C

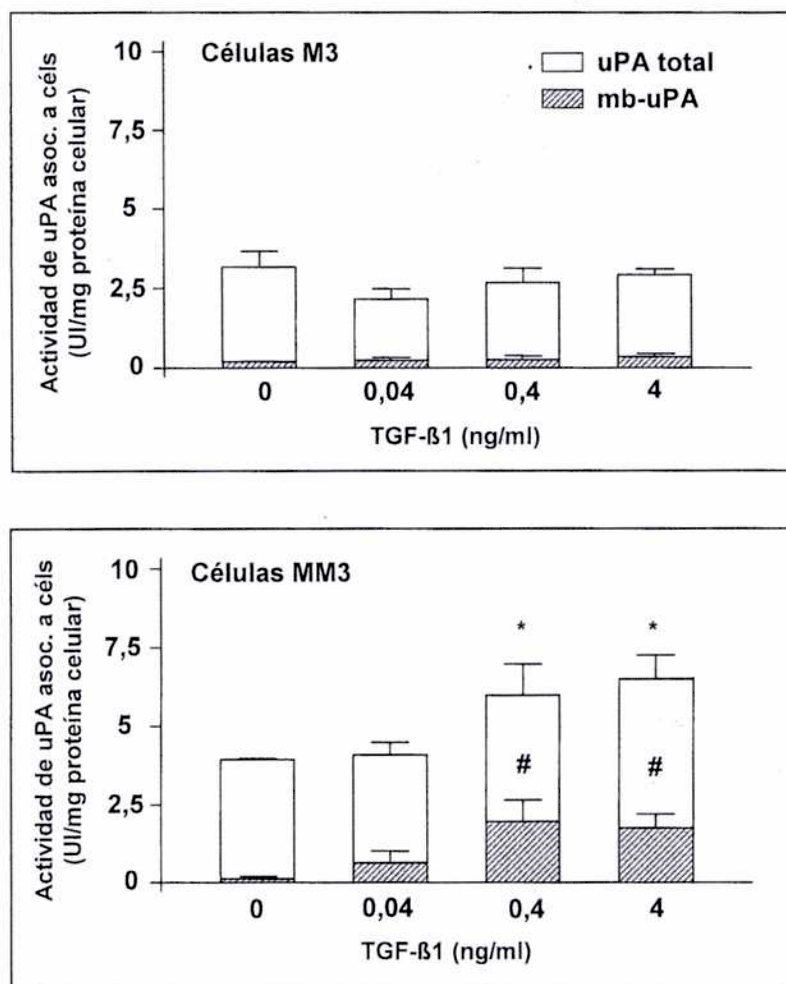


Figura VIII.2.2.1

(A) Efecto de TGF-β sobre la actividad del uPA secretado al MC, medido por caseinólisis radial. Los datos se expresan en Unidades Internacionales (UI) normalizadas por proteína celular, como la media $\pm$ SD de triplicados, y son representativos de cuatro experimentos distintos. * $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) vs células sin tratar, para TGF-β1 y TGF-β2; # $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) vs control, para las tres isoformas de TGF-β.

(B) RT-PCR (28 ciclos) para la expresión del mRNA de uPA, en células LM3 y NMuMG tratadas o no 24 hs con TGF-β1 (2 ng/ml). La expresión del mRNA de actina celular se empleó como control del ensayo.

(C) Actividad del uPA total y del uPA asociado a membrana celular (*mb-uPA*) en respuesta a TGF-β1. Los valores expresados como la media $\pm$ SD de triplicados son representativos de tres experimentos distintos. Se obtuvieron resultados similares con TGF-β2 y TGF-β3. En las líneas celulares se obtuvieron resultados similares a M3. * $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) para el uPA total vs control; # $p < 0,05$ (ANOVA, Scheffe) para *mb-uPA* vs células sin tratar.

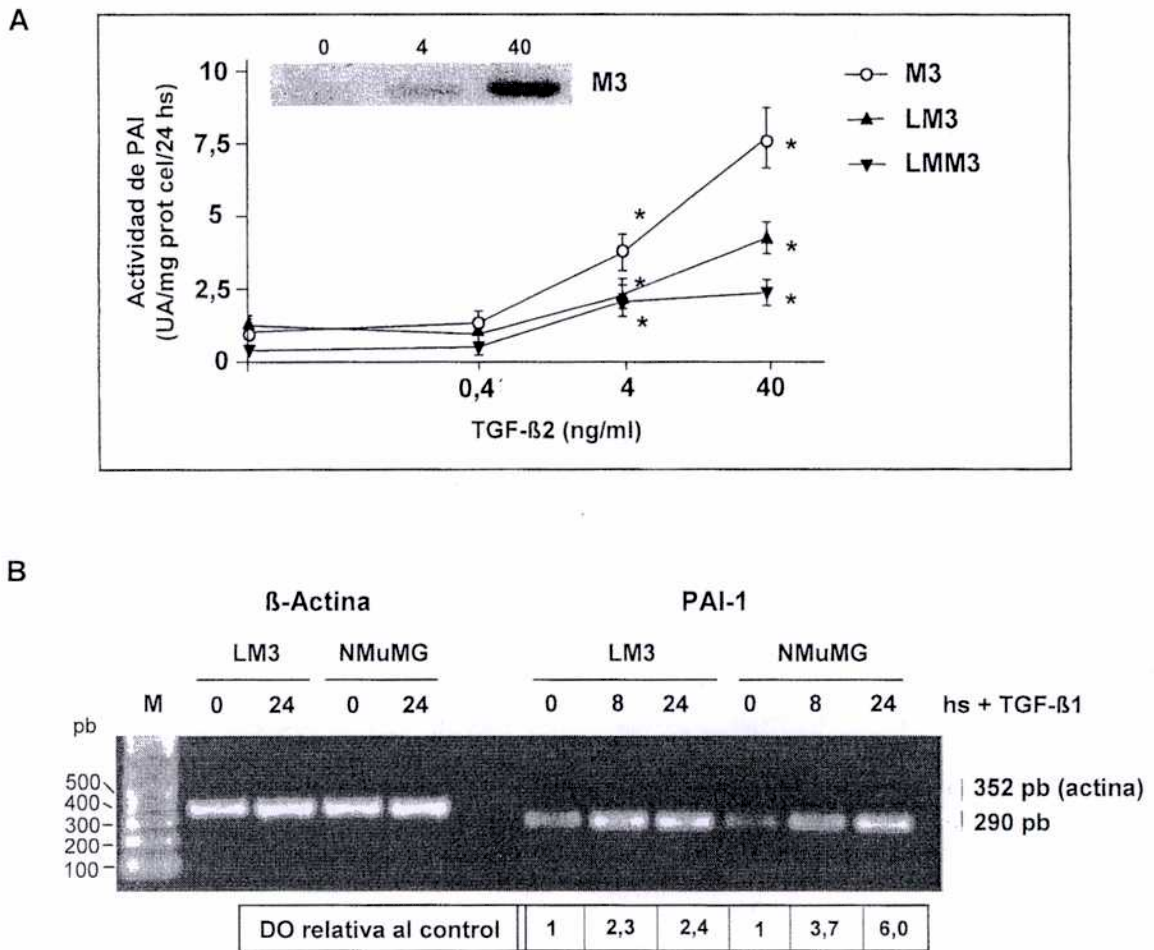


Figura VIII.2.2.2

(A) Efecto de TGF- β 2 sobre la actividad de PAI, medido por zimografía reversa de MC de células de adenocarcinoma mamario. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de duplicados y son representativos de tres experimentos independientes. Resultados similares se obtuvieron con las demás isoformas de TGF- β . Se muestra como inserto la imagen correspondiente a la actividad de PAI en células M3. * $p < 0,05$ (t-test) vs control.

(B) RT-PCR (28 ciclos) para PAI-1 en células LM3 tratadas o no con TGF- β 1 durante 8 y 24 hs. Se muestran los datos obtenidos para las células NMuMG. Los valores son representativos de dos experimentos distintos y se expresan en veces del control sin tratar. Como control del experimento se utilizó la expresión de actina a nivel de mRNA.

Tabla VIII.2

Efecto de TGF- β sobre enzimas proteolíticas

	M3	MM3	LM3	LMM3
Actividad del uPA secretado	↓↓↓	—	—	↑↑
Actividad de mb-uPA	—	↑↑	—	—
Actividad de PAI	↑↑	—	↑	↑
Actividad de MMP-9	↑↑↑	↑	↑↑	↑↑

Esquema que resume los datos obtenidos en relación al efecto de TGF- β 1 sobre distintas enzimas proteolíticas y sus inhibidores, en nuestro modelo de tumor de mama murino.

↑ : aumento — : sin efecto ↓ : inhibición

VIII.3. EFECTO DE TGF- β SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Se conoce que TGF- β induce la remodelación del citoesqueleto de actina en las células no-tumorigénicas NMuMG, con formación de fibras de stress (SF), y estimula la transición epitelio-mesenquimática (TEM) (Bakin y col., 2002; Miettinen y col., 1994) (**Fig. VIII.3.1A**). Con el fin de detectar si TGF- β es capaz de modular el citoesqueleto celular, se analizó la reorganización de F-actina en las células tumorales LM3.

Mediante microscopía de fluorescencia se analizaron células LM3 tratadas o no durante distintos periodos de tiempo con 2 ng/ml TGF- β 1 y teñidas con AlexaFluor-faloidina 488. Se encontró que, a diferencia de las células NMuMG, las células LM3 no forman SF ni sufren TEM en respuesta a TGF- β . Sin embargo, TGF- β induce una leve remodelación de la actina cortical en las células LM3, que se visualiza sólo a las 24 hs de tratamiento (**Fig. VIII.3.1B**).

Con el fin de determinar qué vías de señalización participan de esta respuesta a TGF- β , se realizó el mismo ensayo en presencia de los inhibidores de quinasas SB202190 (inhibidor de p38Mapk), U0126 (inhibidor de MEK/ERK) y un inhibidor específico de c-Raf1. Se determinó que el compuesto SB202190 inhibe el efecto de TGF- β sobre la remodelación de la actina cortical; mientras que al bloquear la vía MEK/ERK mediante U0126, se produce un marcado aumento en la formación de fibras de stress en presencia de TGF- β , que también se observa al utilizar el inhibidor de cRaf1, upstream en la misma cascada de señalización (**Fig. VIII.3.1B**). Estos resultados indican que las vías de transducción de señales p38Mapk y Ras/Raf/MEK/ERK estarían involucradas en la formación de SF en respuesta a TGF- β .

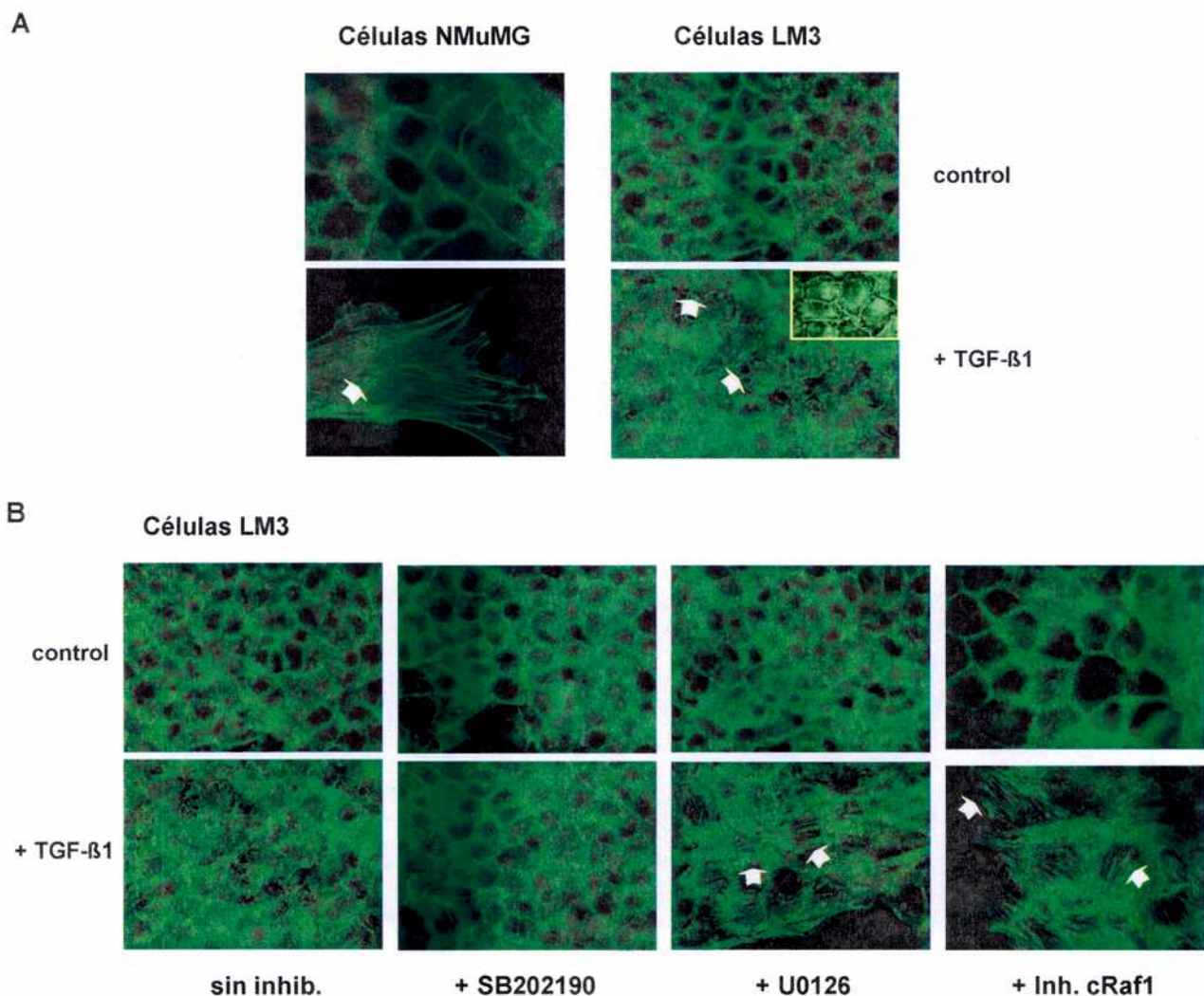


Figura VIII.3.1

Efecto de TGF β 1 (2 ng/ml) sobre el citoesqueleto de actina, por microscopía de fluorescencia (600X).

(A) En las células NMuMG, las flechas son indicativas de fibras de stress (SF) en respuesta a 24 hs de tratamiento con TGF β 1. En las células LM3, las flechas indican remodelación de la actina cortical bajo las mismas condiciones (en detalle como inserto).

(B) El mismo ensayo se realizó en presencia de inhibidores de quinasas. Las flechas indican formación de SF en presencia de los inhibidores de MEK/ERK (U0126) y de cRaf β 1.

Por otra parte, estudiamos si TGF- β es capaz de regular la actividad y/o expresión de otras moléculas relacionadas con la actina. Estudiamos el complejo Arp2/3, muy importante en la remodelación del citoesqueleto de actina. Encontramos que en las células LM3, TGF- β 1 induce la actividad del complejo Arp2/3 a los 10 min de tratamiento, siendo más marcado el efecto a los 20 y 30 min (**Fig. VIII.3.2A**). En las células NMuMG, TGF- β 1 también incrementa la actividad de Arp2/3 (**Fig. VIII.3.2A**).

Además, se realizó el mismo ensayo en presencia o no de inhibidores de quinasas SB202190, U0126 y LY294002, en células LM3 tratadas o no durante 30 min con 2 ng/ml TGF- β 1. El tiempo de tratamiento (30 min) se eligió en base a los resultados obtenidos previamente, ya que en este tiempo se observó la mayor actividad del complejo Arp2/3 en estas células. Se determinó que los distintos inhibidores de quinasas no afectan la respuesta inducida por TGF- β sobre la actividad de Arp2/3, por lo que las vías de señalización de p38Mapk, ERK1/2 y PI3K-Akt, respectivamente, no estarían involucradas en esta respuesta en las células tumorales LM3 (**Fig. VIII.3.2B**).

Por Western blot se analizó la expresión a nivel de proteína de las tropomiosinas TM 1, 2, 3 y 6. Se determinó que las células LM3 presentan una expresión basal elevada de TM2/3, que no es regulada por el tratamiento con 2 ng/ml TGF- β 1 a ningún tiempo de tratamiento (0, 30, 60 min, 2 hs, 4 hs, 24 hs) (**Fig. VIII.3.3A**).

Además, por RT-PCR de 28 ciclos se estudió la expresión de TM a nivel de mRNA en las células LM3. Encontramos que TGF- β 1 (2 ng/ml) no es capaz de modular la expresión de los genes TM- α y TM- β incluso luego de 24 hs de tratamiento (**Fig. VIII.3.3B**).

También mediante Western blot se analizó si TGF- β es capaz de activar a las moléculas relacionadas con el citoesqueleto de actina, HSP27 y MLC2, en las células LM3. Encontramos que TGF- β 1 (2 ng/ml) induce la fosforilación de MLC2 a los 30 min de tratamiento, siendo más evidente el efecto a los 60 min y 2 hs (**Fig. VIII.3.4A**). En cambio, la actividad de HSP27 no fue modulada en respuesta a la citoquina (**Fig. VIII.3.4B**).

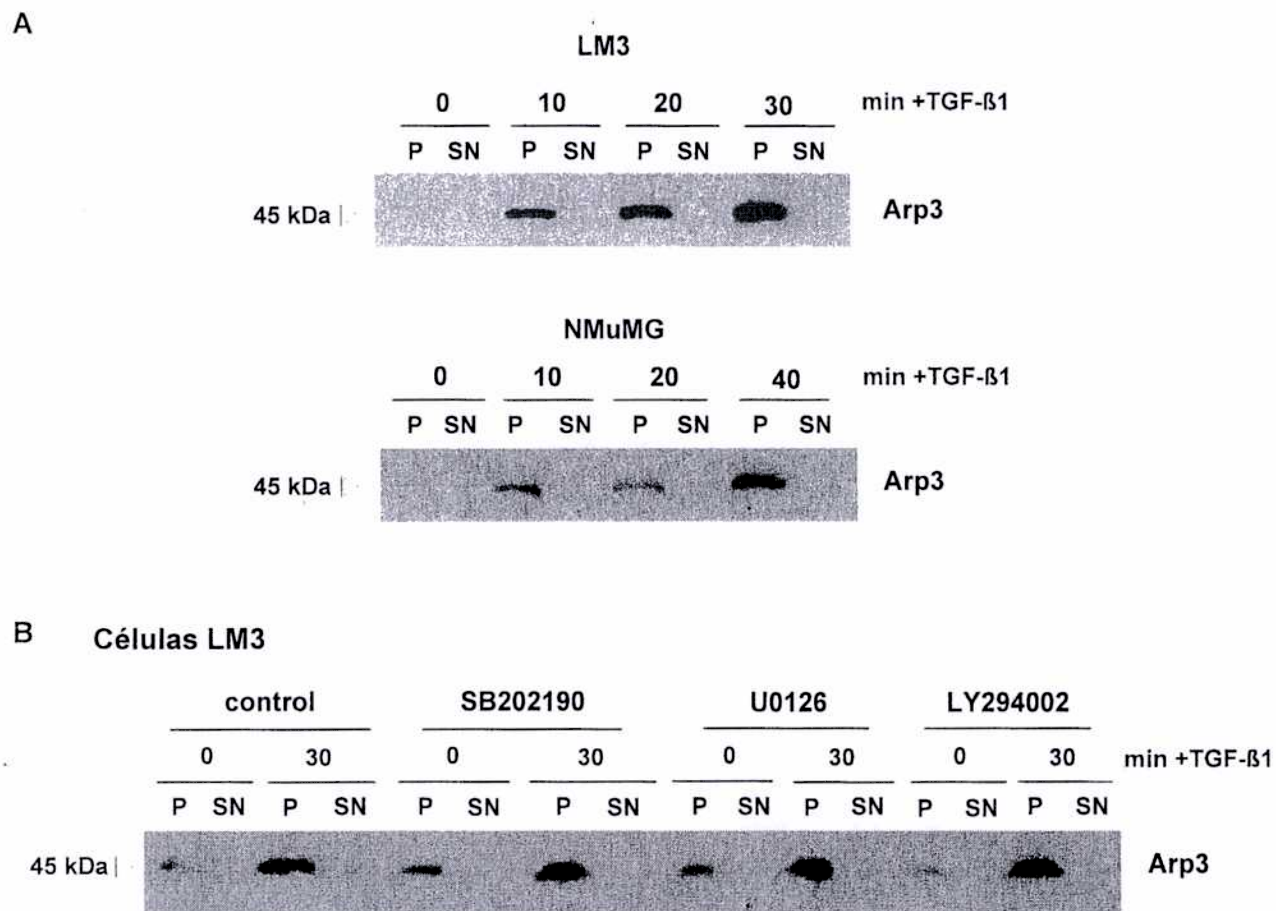


Figura VIII.3.2

(A) Cinética de activación del complejo Arp2/3 en respuesta a TGF- β 1 (2 ng/ml) en las células tumorales LM3 y no-tumorigénicas NMuMG, medido por Western blot. La detección de la actividad del complejo Arp2/3 se determinó mediante un kit, como se describió en Materiales y Métodos.

(B) El mismo ensayo se realizó en las células LM3 tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1 durante 30 min, en presencia de distintos inhibidores de quinasas (SB202190, LY294002 y U0126).

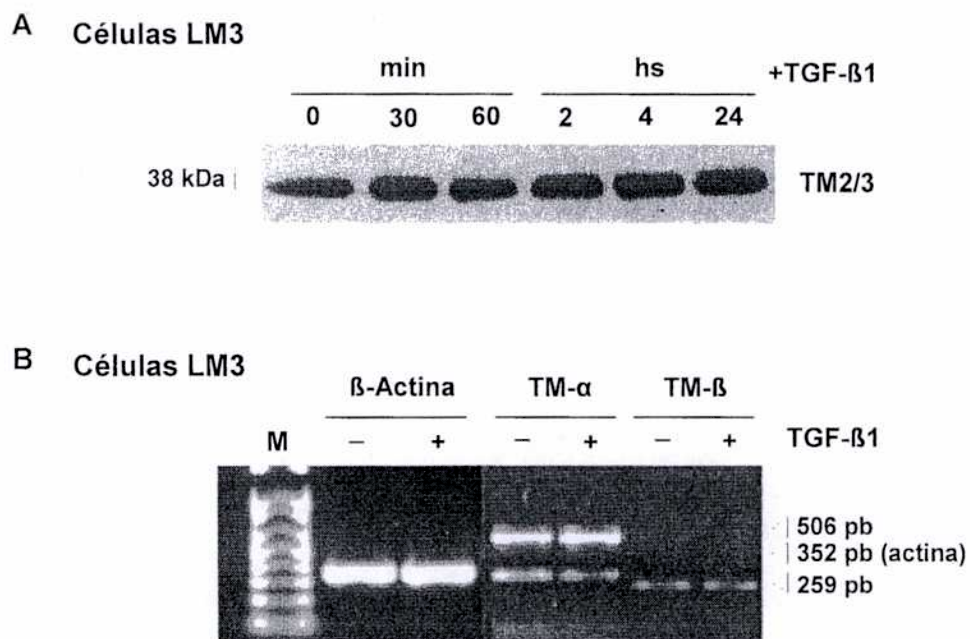
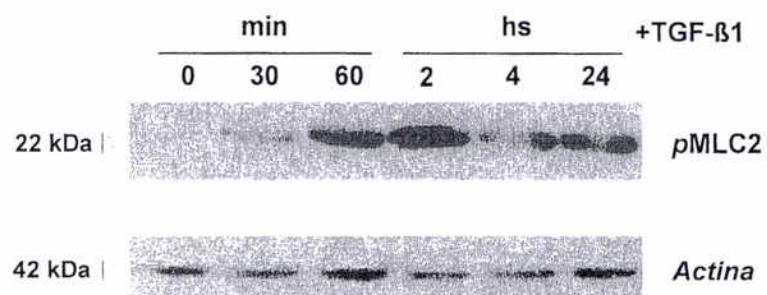


Figura VIII.3.3

(A) Cinética de activación de tropomiosinas (*TM*) por TGF- β 1 (2 ng/ml) en las células LM3, medido por Western blot.

(B) RT-PCR (28 ciclos) de las formas alfa y beta de *TM* en las células LM3 tratadas o no con 2 ng/ml TGF- β 1. La expresión de actina celular se utilizó como control del ensayo.

A Células LM3



B Células LM3

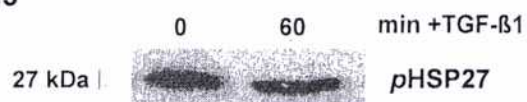


Figura VIII.3.4

Efecto de TGF- β 1 (2 ng/ml) sobre la activación de las moléculas relacionadas con actina MLC2 (**A**) y HSP27 (**B**), medido por Western blot en LC de LM3. La expresión de actina se utilizó como control del ensayo y se muestra en (**A**).

VIII.4. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Habiendo determinado que TGF- β modula algunos componentes del citoesqueleto de actina en las células tumorales en estudio, analizamos si TGF- β es capaz de regular también la motilidad de dichas células. Mediante el ensayo de cicatrización de heridas o "wound healing", se determinó que 2 ng/ml TGF- β 1 induce significativamente la migración de las células LM3, medido por la cobertura total de la herida luego de 16 hs de tratamiento (Fig. VIII.4).

Por otra parte, evaluamos qué vías de transducción de señales están involucradas en este efecto de TGF- β , mediante inhibición farmacológica de las distintas vías. Detectamos que los inhibidores de quinasas SB202190 y U0126 bloquean la inducción de la motilidad de las células LM3 por TGF- β (Fig. VIII.4), lo que indicaría que las vías p38Mapk y MEK/ERK participan en la este efecto de TGF- β .

VIII.5. ACCIÓN DE TGF- β SOBRE LA INVASIÓN *IN VITRO*

Por otra parte, con el uso de cámaras Transwell con filtros cubiertos con la membrana basal reconstituída Matrigel, se analizó si TGF- β es capaz de regular la capacidad invasiva *in vitro* de las células tumorales en estudio. Determinamos que TGF- β 1 (2 ng/ml) aumenta significativamente la capacidad de invadir el Mátrigel, tanto en las células de cultivo primario M3 y MM3 como en las líneas derivadas (Fig. VIII.5A).

También estudiamos la participación de los receptores de TGF- β en estos procesos, utilizando células LM3 que sobreexpresan una forma dominante negativa de T β RI ó T β RII, denominadas LM3/5KR y LM3/K277R, respectivamente. Encontramos que ninguna de estas células es capaz de responder a la inducción de la invasión por TGF- β (Fig. VIII.5B). Estos datos indican que la presencia de receptores funcionales sería esencial para la regulación del proceso invasivo por TGF- β .

Además, para determinar qué vías de señalización participan de esta respuesta, realizamos el mismo ensayo en presencia de los inhibidores de quinasas SB202190 y U0126, en las células LM3. Encontramos que dichos compuestos inhibieron la capacidad invasiva de las células LM3 inducida por TGF- β (**Fig. VIII.5C**), involucrando a las vías de señalización p38Mapk y MEK/ERK. Además, determinamos que este proceso requiere de la actividad de MMPs en nuestro modelo, ya que el inhibidor de metaloproteinasas BB-94 redujo los niveles de invasión de las células LM3 en presencia de TGF- β (**Fig. VIII.5C**).

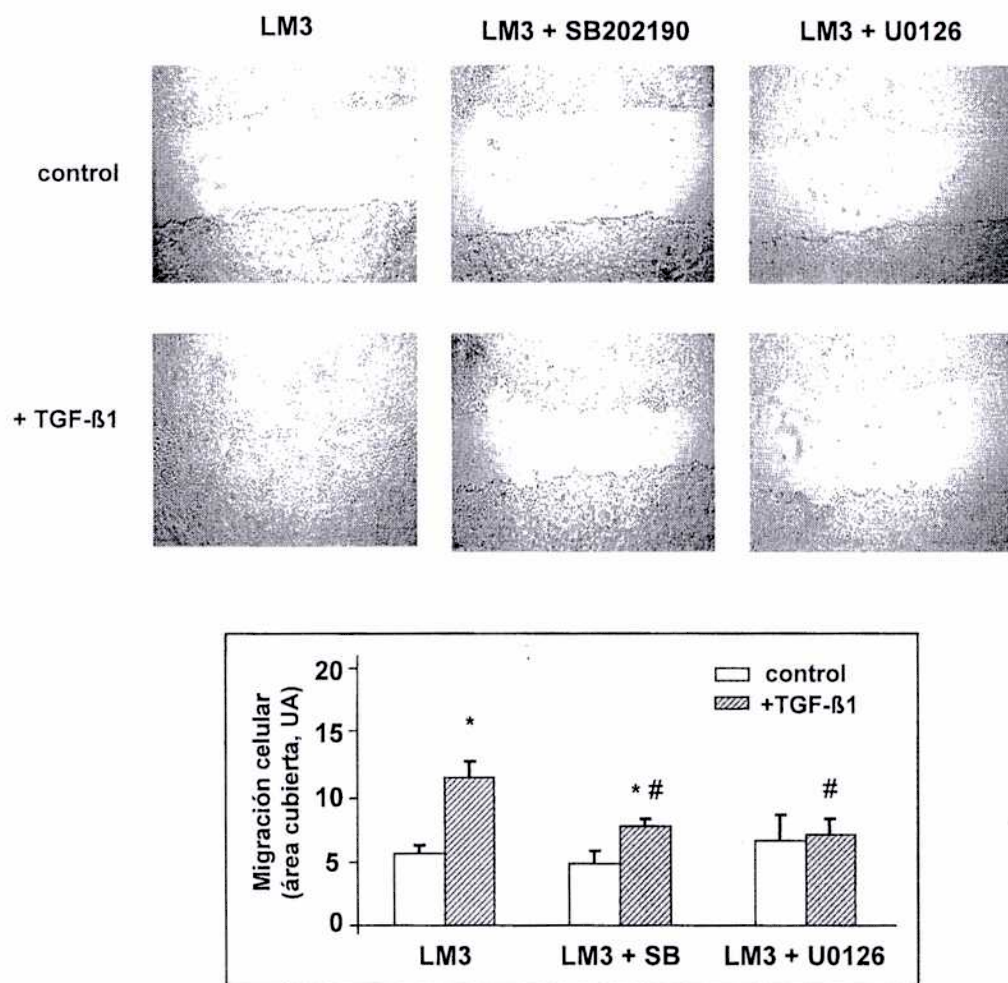


Figura VIII.4

Migración de células LM3 en respuesta a 16 hs de tratamiento con TGF- β 1 (2 ng/ml), medida por el ensayo de wound. El mismo experimento se realizó en presencia de los inhibidores de quinasas SB202190 y U0126. Las imágenes (400X) son representativas de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de cuadruplicados.

* $p < 0,05$ (t-test) vs control sin tratar; # $p < 0,05$ (t-test) vs células LM3 tratadas con TGF- β 1.

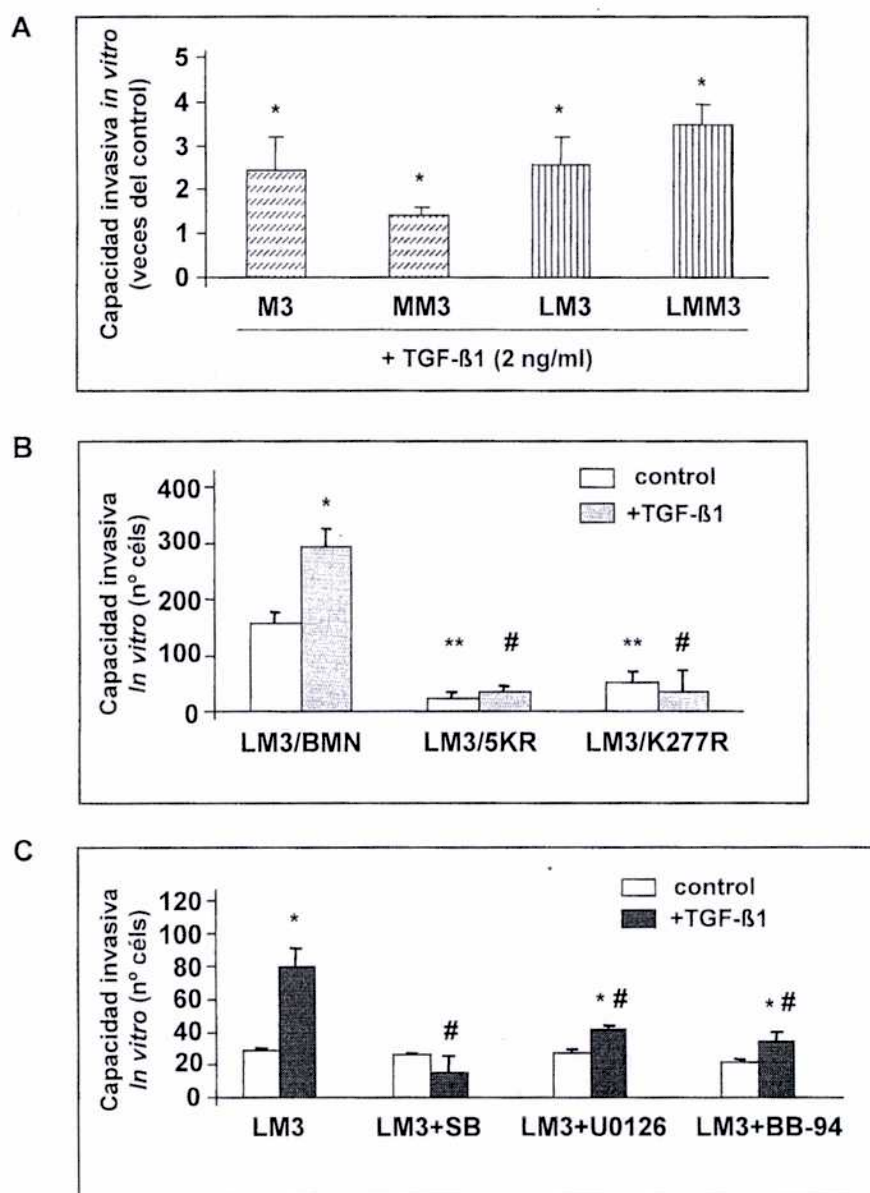


Figura VIII.5

(A) Capacidad invasiva en cámaras Transwell de cultivos primarios y líneas celulares de tumor de mama en respuesta a TGF-β1 (2 ng/ml). Los datos representan el número de células que invadieron el Matrigel por campo óptico bajo microscopio de fluorescencia. * $p < 0,05$ (t-test) vs células sin tratar.

(B) Efecto de la expresión de dnTβRs sobre la invasión *in vitro* de las células LM3. * $p < 0,05$ (t-test) vs control; ** $p < 0,05$ (t-test) vs LM3/BMN sin tratar; # $p < 0,05$ (t-test) vs LM3/BMN tratadas con 2 ng/ml TGF-β1.

(C) Efecto de los inhibidores de quinasas SB202190 y U0126 y del inhibidor de MMPs (BB-94) sobre la invasión de LM3 inducida por TGF-β1 (2 ng/ml). * $p < 0,05$ (t-test) vs control; # $p < 0,05$ (t-test) vs LM3 tratadas con TGF-β. En todos los casos, los valores se expresan como la media $\pm$ SD de triplicados y son representativos de dos experimentos independientes.

CAPITULO IX

EFFECTOS *IN VIVO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA

IX.1. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA

Por último, estudiamos si TGF- β regula el proceso de formación de neovasos en nuestro modelo tumoral. Para ello, se inocularon células LM3 dorsalmente en ratones singeneicos, en presencia o no de 4 ng/ml TGF- β 1. Las células fueron previamente tratadas *in vitro* con TGF- β durante 24 hs.

Determinamos que TGF- β no es capaz de modular significativamente la angiogénesis de las células LM3, siendo los valores encontrados igual a $2,7 \pm 0,5$ en el control sin tratar y $2,23 \pm 0,6$ n° vasos/mm² piel, en las células tratadas con TGF- β 1 (media $\pm$ SD de nueve datos).

IX.2. ACCIÓN DE TGF- β SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Debido a que los ensayos *in vitro* indican que TGF- β tendría un rol promotor de la progresión tumoral en nuestro modelo de adenocarcinoma de mama, evaluamos la capacidad de las células LM3 de formar tumores al expresar las formas dominante negativas de T β RI ó T β RII.

Con respecto a la formación de tumor, todas las líneas celulares estudiadas presentaron un 90-100% tumorigenicidad. Además, determinamos que todas las células inoculadas en los animales presentaron una latencia de 6 días. Pero aquellas células que expresan los receptores de TGF- β mutados, funcionalmente inactivos, mostraron una tasa de crecimiento significativamente menor que las células control LM3/BMN, ya que entre el día 14 y el día 22 de portación se observó una diferencia significativa en el tamaño tumoral (**Fig. IX.1A**). Esta diferencia es más marcada en las células que expresan dnT β RI que en aquellas que expresan T β RII mutado (**Fig. IX.1A**).

Por otra parte, la evolución global de los tumores formados por los distintos tipos celulares inoculados fue similar, alcanzando casi el mismo tamaño de masa tumoral a los 40 días de portación (**Fig. IX.1B**), y es comparable también al observado al inocular células LM3 parentales (**Fig. IX.1B, inserto**).

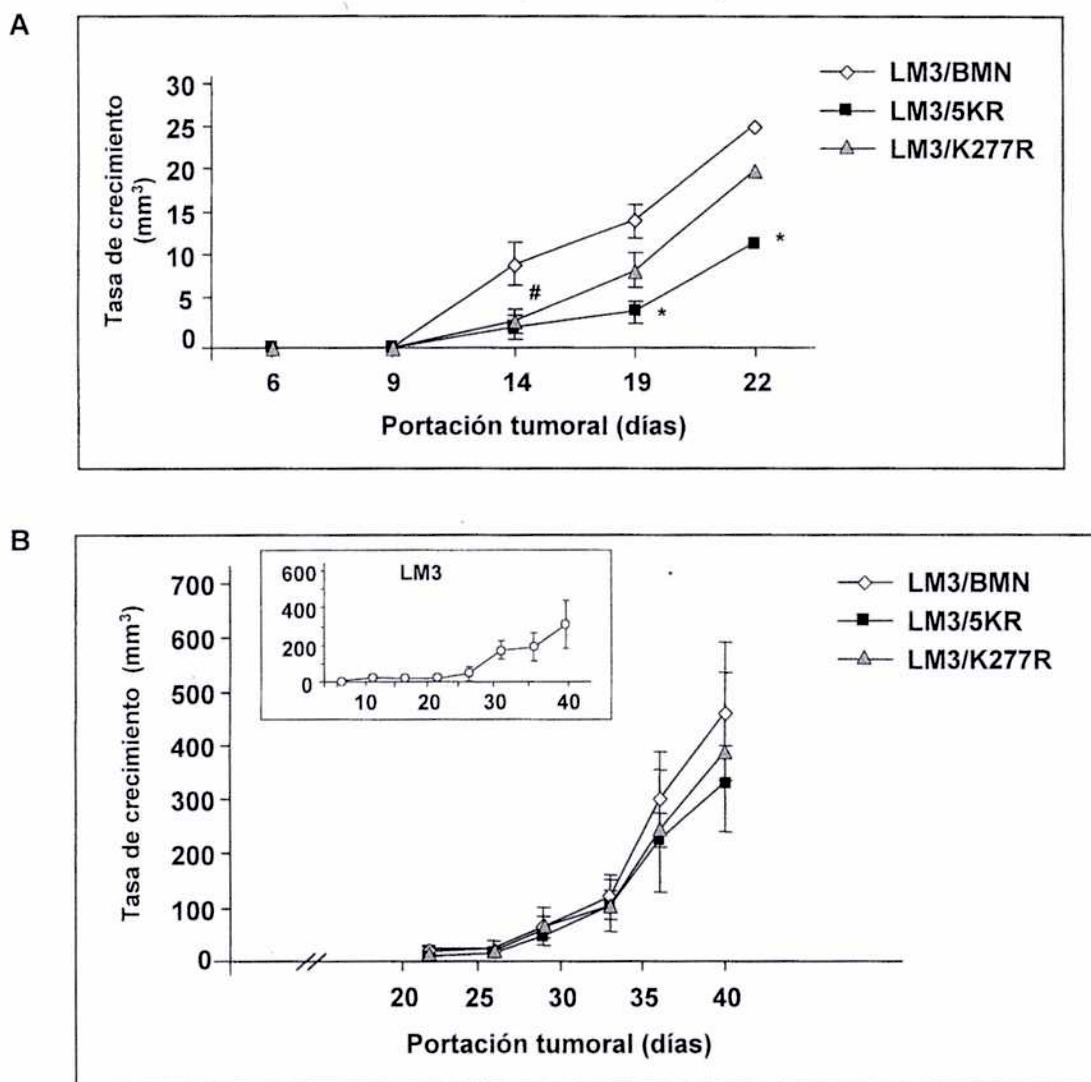


Figura IX.1

Tasa de crecimiento de las células LM3/5KR y LM3/K277R *in vivo*. Como control del ensayo se utilizaron las células LM3/BMN.

(A) Tasa de crecimiento tumoral en los primeros días de portación del tumor.

(B) Evolución tumoral a partir del día 20 de portación tumoral. El inserto indica el crecimiento tumoral de células LM3 parentales. En (A) y en (B), los datos se expresan como la media $\pm$ SD de diez muestras y son representativos de dos experimentos independientes.

* $p < 0,05$ (t-test) vs LM3/BMN, sólo para la línea LM3/5KR; # $p < 0,05$ (t-test) vs LM3/BMN, para LM3/5KR y LM3/K277R.

IX.3. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA FORMACIÓN DE METÁSTASIS

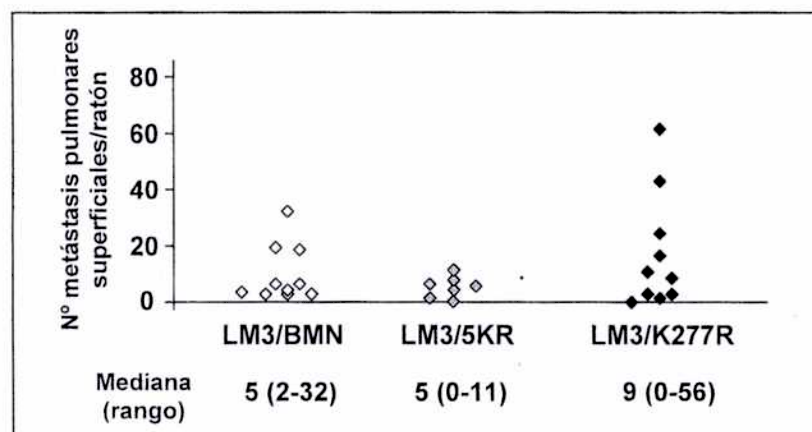
La capacidad metastásica se analizó en el mismo experimento descrito anteriormente. Al cabo de 40 días de portación de tumor, los animales moribundos se sacrificaron, se cuantificó el número de las metástasis pulmonares y se clasificaron por tamaño.

Todas las líneas celulares analizadas, LM3/BMN como control, LM3/5KR y LM3/K277R, fueron capaces de formar focos metastásicos en pulmón. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la mediana de los distintos grupos (**Fig. IX.2.1A**).

Por otro lado, tampoco observamos diferencias significativas en el diámetro de los nódulos metastásicos superficiales de pulmón entre las distintas líneas inoculadas, ya que ~50% de las metástasis desarrolladas por cualquiera de estas células presenta un diámetro menor a 0,5 mm (**Fig. IX.2.1B**).

Además, con el objeto de visualizar células que expresen la proteína verde EGFP en los tumores y las metástasis de los distintos grupos experimentales, se tomaron fotografías de material *ex vivo* bajo microscopía de fluorescencia. Encontramos que todas las células transfectadas inoculadas expresan EGFP en las masas tumorales, si bien el porcentaje de células verdes no alcanzó el 100% (**Fig. IX.2.2A**). Sin embargo, en las metástasis solamente se detectaron células verdes en el grupo control LM3/BMN (**Fig. IX.2.2A**). A modo ilustrativo, en la **Fig. IX.2.2B** se muestra una metástasis *ex vivo* de las células LM3/5KR, donde se puede detectar que las células tumorales que forman el foco metastásico no son células transfectadas con EGFP, ya que se observan tanto con el filtro de fluorescencia correspondiente (450-490 nm) como con el de emisión roja (528-553 nm), por lo que la fluorescencia emitida en color verde sería inespecífica y correspondería a autofluorescencia de las células.

A



B

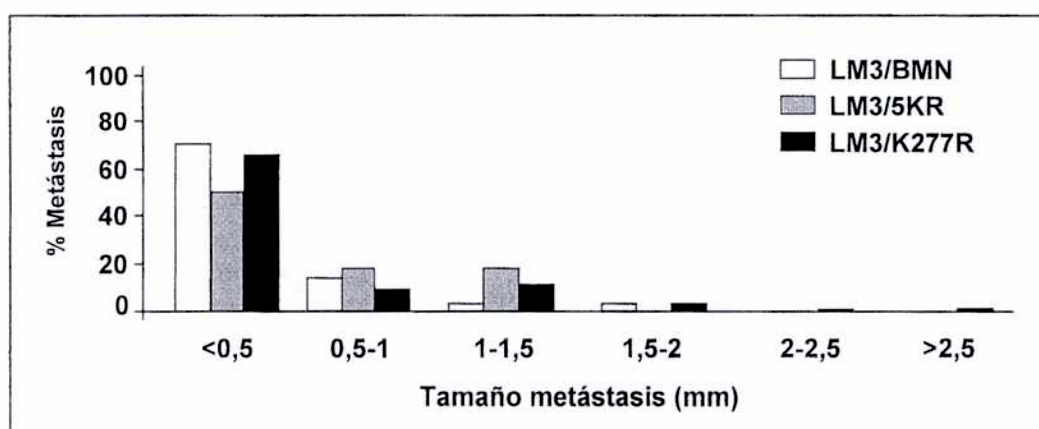


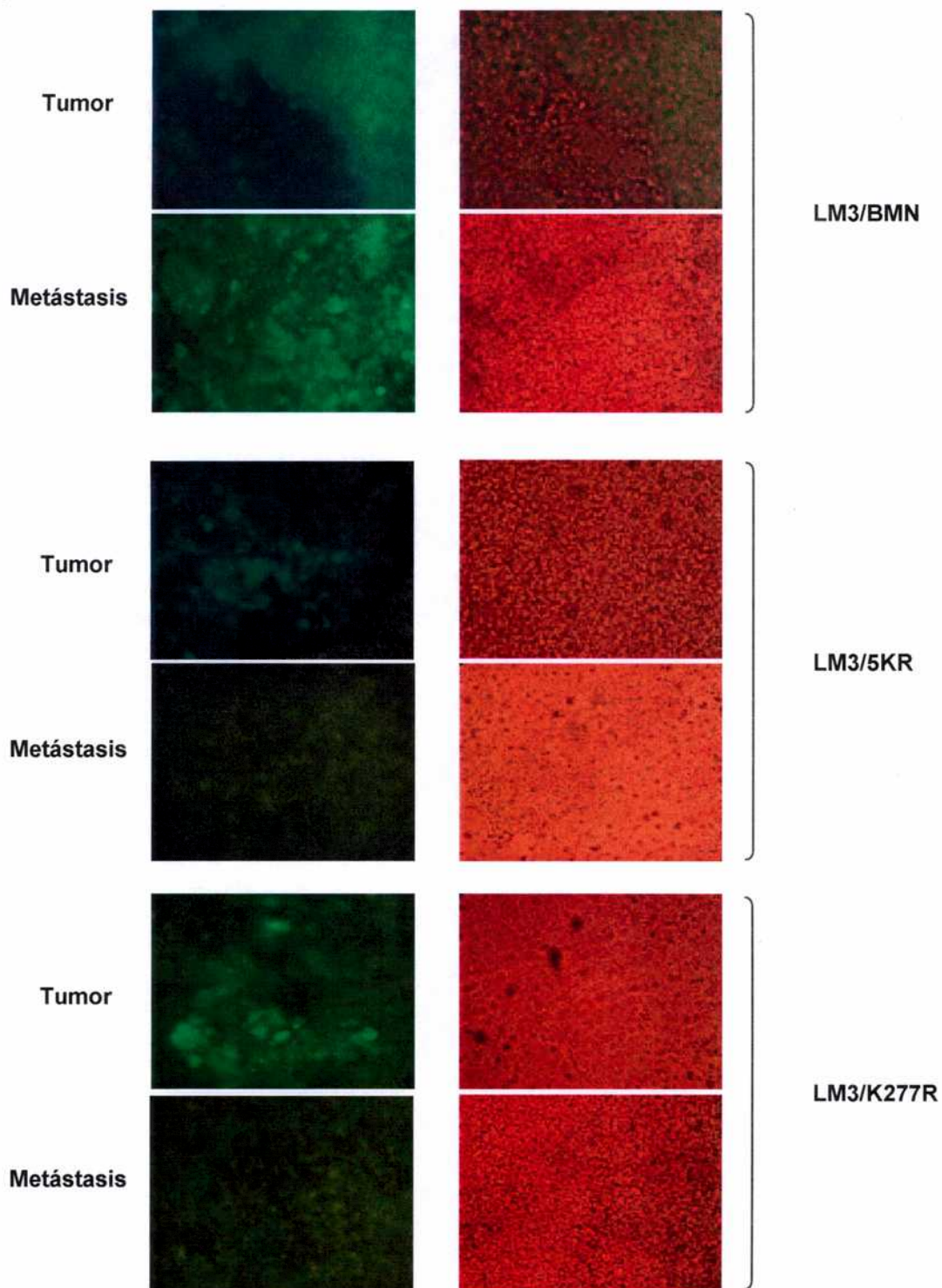
Figura IX.2.1

Formación de metástasis superficiales por las células LM3 transfectadas, a los 40 días de portación de tumor.

(A) Distribución del número de metástasis por línea celular por animal inoculado. Se indica además la mediana y el rango obtenidos por grupo experimental.

(B) Clasificación de las metástasis por tamaño, en cada uno de los grupos estudiados.

A



B Células LM3/5KR

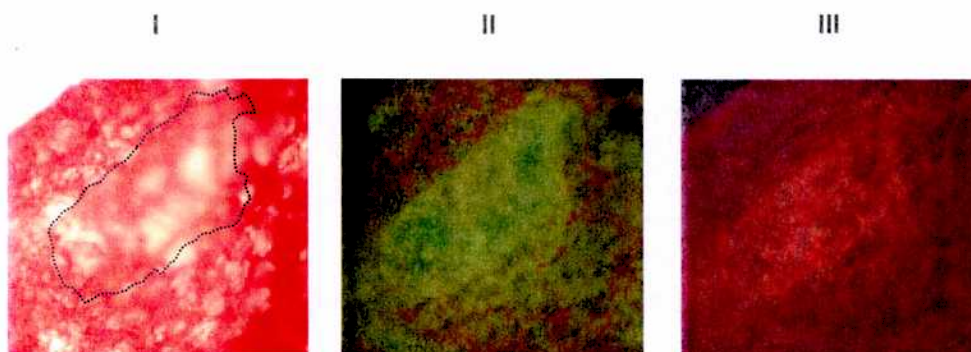


Figura IX.2.2

(A) Formación de tumor y metástasis por las células LM3 que expresan dnT β Rs, y línea control, bajo microscopía de fluorescencia (200X), a la izquierda. Todas las células transfectadas expresan la proteína verde EGFP. Las imágenes de la derecha corresponden a microscopía con luz blanca.

(B) Imágenes de una metástasis de LM3/5KR *ex vivo*, bajo microscopía óptica (I) y bajo microscopía de fluorescencia con filtro 450-480 nm (II) y 528-553 nm (III), a 200X. La línea de puntos marca el borde del foco metastásico pulmonar. Resultados similares se obtuvieron con las células LM3/K277R (datos no mostrados).

CAPITULO X

TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE MAMA MURINO

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Expresión del sistema TGF- β /T β Rs. Actividad biológica a nivel molecular.

La progresión tumoral es un proceso determinado no solamente por eventos intrínsecos de las células tumorales, sino también altamente influido por factores del microambiente tumoral, que incluyen factores de crecimiento y citoquinas, así como interacciones entre las células tumorales, las células normales circundantes y moléculas de la matriz extracelular (MEC). Estas múltiples interacciones explicarían en parte la patogenia de las enfermedades malignas (Shain y col., 2000).

Los factores de crecimiento transformante tipo beta, TGF- β , son considerados componentes fundamentales dentro de la red compleja del microambiente tumoral. Debido a que tanto las células estromales como las tumorales son capaces de producir TGF- β y que además esta citoquina es abundante en la circulación, ésta podría ejercer efectos tanto autocrinos como paracrinos sobre las células en las distintas etapas de la cascada metastásica (Park y col., 2000a).

Para determinar si las células de nuestro modelo de adenocarcinomas de mama murino metastásicos en pulmón producen TGF- β en forma autocrina, analizamos la secreción y expresión de TGF- β y la expresión de sus receptores específicos. Todas las células de nuestro modelo experimental, tanto aquellas de los cultivos primarios de los tumores M3 y MM3, poco y altamente metastásicos, respectivamente, como de las líneas de ellos derivadas, de alta capacidad metastásica, LM3 y LMM3, producen las tres isoformas de TGF- β descritas en Mamíferos, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Además, todas estas células presentan los tres receptores de membrana específicos de TGF- β , T β RI, T β RII y T β RIII. Por lo tanto, las células de nuestro modelo expresan el sistema completo TGF- β /T β Rs.

Se conoce que las células tumorales mamarias *in vitro* secretan TGF- β generalmente en su forma biológicamente inactiva o latente. Existen múltiples mecanismos que regulan la activación de TGF- β en distintos contextos fisiológicos y las células tumorales están bien equipadas para activarlos localmente (Derynck y col., 2001). Mediante un bioensayo se determinó que todas las células estudiadas secretan TGF- β predominantemente en su estado inactivo, encontrándose sólo un pequeño porcentaje (~5-10%) de la citoquina activa en los medios condicionados (MC). Sin embargo, se observó un patrón distinto de producción de

TGF- β endógeno en las distintas células de nuestro modelo, ya que las células altamente metastásicas MM3 producen aproximadamente el doble de TGF- β total que las células poco metastásicas M3. Por otro lado, el nivel de secreción de TGF- β en las células altamente invasivas y metastásicas LM3 y LMM3 es tan alto como en las células de cultivo primario MM3.

Se ha determinado que un elevado porcentaje de tumores humanos de distinto tipo sobreexpresan TGF- β 1 y que esta producción excesiva de TGF- β está asociada a peor pronóstico (Tsushima y col., 1996; Adler y col., 1999). Así, en el modelo estudiado, la mayor expresión de TGF- β y de sus receptores de señalización observada en las células MM3 se asocia con su elevada capacidad metastásica. Por esto, nuestros datos sugieren que la producción autocrina de TGF- β estaría relacionada con el fenotipo más agresivo en nuestro modelo experimental. Además, como el TGF- β latente producido por las células tumorales en estudio pudo ser activado artificialmente mediante distintos agentes (calor o pH extremo), podemos suponer que la citoquina podría ser igualmente activada *in vivo* por factores liberados al microambiente tumoral, no sólo por las propias células tumorales sino también por las células del huésped, como fibroblastos del estroma tumoral, células endoteliales y células del sistema inmune (Oft y col., 1998; Park y col., 2000a). Por lo tanto, es posible que TGF- β pueda actuar como un factor de crecimiento tanto autocrino como paracrino en nuestro modelo tumoral.

Clásicamente, se conoce que TGF- β inicia la vía de señalización de las proteínas Smad. Como se mencionó anteriormente, una vez que los T β Rs son activados, las R-Smad Smad2 y Smad3 forman complejos con la Co-Smad Smad4 y así se translocan al núcleo celular, donde regulan la expresión de distintos genes (Heldin y col., 1997). Mediante Western blot, se determinó que TGF- β 1 induce la activación de Smad2, entre 30 min y 2 hs después del tratamiento de las células altamente invasivas y metastásicas LM3 con la citoquina. La cinética de activación de Smad2 por fosforilación se corresponde con lo descrito para TGF- β en otros modelos tumorales. Así, por ejemplo, en las células epiteliales de mama murinas no-tumorigénicas NMuMG, TGF- β induce la fosforilación de Smad2 entre 15 y 60 min luego del tratamiento *in vitro* con TGF- β 1 (Bakin y col., 2002); mientras que en la línea de queratinocitos humanos transformados HaCaT, Smad2 presenta un máximo de actividad a los 60 min del tratamiento con TGF- β 1 (Lo y Massagué, 1999).

Por otra parte, mediante Western blot determinamos que las células LM3 expresan también Smad4 y que ésta no es modulada por TGF- β 1 exógeno. Sin embargo, mediante inmunofluorescencia detectamos que Smad4 es activada y se transloca al núcleo celular a los 30 min de tratamiento con TGF- β 1, por lo que confirmamos que Smad4 participa de la señalización de TGF- β en este modelo. Se ha detectado que en distintos tipos de tumores, la proteína Smad4 está alterada, ya sea por mutaciones o deleciones. Dichas alteraciones suelen ser inactivantes y resultan en la pérdida de expresión o en la expresión alterada de la proteína (Riggins, 1997). Debido a que en nuestro modelo TGF- β es capaz de activar tanto R-Smads como Co-Smads, inferimos que el sistema de señalización de TGF- β por Smads sería funcional.

La activación de las proteínas Smad por TGF- β culmina en la activación de promotores determinados en genes específicos, donde las Smads funcionan como factores de transcripción, junto a coactivadores y correpresores (Derynck y col., 1998; Akiyoshi y col., 1999; Gosh y col., 2000). Se ha encontrado una secuencia de unión a Smads (*Smad-Binding Element* ó SBE) denominada "caja CAGA" en los promotores de numerosos genes de respuesta a TGF- β (Kim y col., 1989a y b; Lin y Stavnezer, 1992). Se cree que la caja CAGA podría representar un motivo ampliamente utilizado por TGF- β para inducir determinados promotores y enhancers (Dennler y col., 1998). Otro grupo de activadores transcripcionales con los que las Smads interactúan físicamente son los miembros de la familia AP-1, c-Jun y c-Fos (Brodin y col., 2000). El incremento de la actividad transcripcional se ha observado en una variedad de genes reportero de respuesta a TGF- β en cultivo, como p3TP-lux, SBE-Luc, PAI-1-Luc (Zimmerman y Padgett, 2000). En las células LM3, mediante un ensayo de medición de actividad luciferasa como reporter de actividad transcripcional determinamos que TGF- β 1 induce la transcripción de los promotores CAGA-lux y 3TP-lux. Como ambas secuencias son Smad-dependientes, nuestros datos permiten corroborar que el sistema de señalización Smad es funcional en respuesta a TGF- β en estas células.

Sin embargo, en las células LM3, el nivel de la transcripción génica inducido por Smad en los promotores con secuencias CAGA y 3TP en respuesta a TGF- β es aproximadamente el 50% de lo observado en las células no-tumorigénicas NMuMG. Por ello, podría considerarse que la activación de los genes regulados por Smad es menor en las células LM3 con respecto a

las células mamarias no-tumorigénicas, lo que podría representar una menor capacidad de respuesta a los efectos de TGF- β mediados por Smads.

Por otra parte, mediante inmunohistoquímica determinamos Smad4 nuclear en cortes histológicos del tumor M3, lo que indica que estas células son respondedoras a TGF- β *in vivo*.

En conclusión, debido a que las células de adenocarcinoma mamario de nuestro modelo expresan los receptores de señalización de TGF- β , secretan la citoquina, la activan y son capaces de responder a TGF- β , consideramos que el sistema TGF- β /T β Rs es funcional, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha demostrado que TGF- β es también capaz de inducir la activación de otras vías de señalización además de Smad, como las vías p38Mapk, ERK, JNK, PI3K, difiriendo la cinética de activación entre distintos tipos celulares (Hartsough y Mulder, 1995; Engel y col., 1999; Bakin y col., 2000; Mulder, 1992 y 2000). En las células LM3, encontramos que TGF- β 1 produce la activación de p38Mapk por fosforilación a partir de los 60 min de tratamiento, similar a lo observado en las células NMuMG (Bakin y col., 2002). Por otra parte, ERK1/2 también es fosforilado en respuesta a TGF- β 1 luego de 2 hs de tratamiento de las células LM3. La cinética de activación típica de ERK asociada con la estimulación por suero, se produce por fosforilación rápida de ERK a los 15 min de tratamiento. En las células LM3, la activación tardía de ERK1/2 podría deberse a una acción indirecta de TGF- β sobre esta vía de señalización. Recientemente, Lee y col. (2004) determinaron en otro modelo que la activación de ERK1/2 puede estar mediada por Smads.

En resumen, nuestros resultados indican que, además de la vía tradicional de las proteínas Smad, TGF- β es capaz de producir la activación de las vías p38Mapk y MEK/ERK en las células LM3. Esto podría implicar que distintas vías de señalización intracelular inducidas por TGF- β están involucradas en diferentes respuestas biológicas, abriendo un camino para discernir los mecanismos de acción de TGF- β .

Actividad biológica de TGF- β sobre la proliferación celular in vitro.

Se conoce que TGF- β es un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, tanto normales como tumorales (Moses y col., 1990). La respuesta antiproliferativa inducida por TGF- β se denomina actualmente "programa citostático" (Siegel y Massagué, 2003). Estudiamos el efecto de TGF- β exógeno sobre la proliferación de las células de nuestro modelo y determinamos que cualquier isoforma de TGF- β inhibe la proliferación de los cultivos primarios de los tumores M3 y MM3. Además, las células más metastásicas MM3 son menos sensibles a este efecto, ya que solamente las dosis más altas de TGF- β utilizadas fueron capaces de bloquear su crecimiento y en un nivel menor al observado en las células M3.

Existen evidencias que indican que otras respuestas a TGF- β no relacionadas con la proliferación celular, como por ejemplo la remodelación de la MEC, pueden prevalecer y favorecer el proceso de la progresión tumoral. Además, se propuso que una vez liberadas de las restricciones del crecimiento de TGF- β , las células tumorales pueden utilizar esta citoquina como un factor promotor de la progresión tumoral (Siegel y Massagué, 2003). Un ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Wakefield y Roberts (2002), quienes demostraron que cuando un tumor progresa secreta cantidades crecientes de TGF- β 1, contribuyendo a un fenotipo más maligno. Esto podría estar ocurriendo en las células MM3, las cuales son poco sensibles a la inhibición del crecimiento por TGF- β pero son altamente productoras de la citoquina, lo cual podría favorecer a su fenotipo altamente metastásico.

Por otra parte, las líneas celulares altamente invasivas y metastásicas LM3 y LMM3, a diferencia de los tumores parentales, son totalmente resistentes a la modulación del crecimiento celular por TGF- β . El hecho de que estas células sean refractarias al efecto antiproliferativo de TGF- β podría ser el resultado de los pasajes sucesivos *in vitro* durante el establecimiento de las líneas celulares. Otros autores observaron que diversos tipos de tumores, incluyendo tumores de mama, exhiben distinto grado de resistencia al efecto antiproliferativo de TGF- β , lo cual se correlaciona con la capacidad tumorigénica (Moses y col., 1990; Fynan y Reiss, 1993; Miettinen y col., 1994). Además, es interesante la observación de Sehgal y col. (1996), quienes demostraron que las líneas celulares derivadas de tumor primario

retienen la inhibición del crecimiento dependiente de TGF- β , mientras que las líneas derivadas de tumores metastásicos han perdido esta propiedad.

Las células tumorales pueden adquirir resistencia al efecto antiproliferativo de TGF- β mediante distintos mecanismos, que incluyen alteraciones en la expresión y/o activación del complejo TGF- β latente; pérdida de expresión o función de los T β Rs y alteraciones en las vías de transducción de señales intracelulares (Dumont y Arteaga, 2000). Ciertas observaciones sugieren que la expresión de T β Rs está frecuentemente downregulada en las células tumorales y que estos defectos permitirían a las células escapar de las actividades inhibitorias del crecimiento de TGF- β (Kim y col., 2000).

Al igual que las líneas LM3 y LMM3, distintos tipos de líneas celulares y tumores de estadio tardío, desdiferenciados, son resistentes a la inhibición del crecimiento por TGF- β , pero aún secretan la citoquina (Sargent y col., 1989; Dalal y col., 1993; Steiner y col., 1994). Nuestras líneas celulares producen TGF- β , lo activan, expresan los receptores de señalización de TGF- β y responden a otros efectos biológicos de TGF- β (ver más adelante). La resistencia de estas células al efecto antiproliferativo de TGF- β podría ser el resultado de una alteración en alguna de las vías intracelulares activadas por TGF- β . Se conoce que la vía de señalización Smad está involucrada en la respuesta antiproliferativa de TGF- β (Liu y col., 1997; Chiao y col., 1999; Ferguson y col., 2000; Derynck y Zhang, 2003). En las células tumorales LM3, detectamos que la señalización de la vía Smad por TGF- β está disminuida con respecto a lo encontrado en las células no-tumorigénicas NMuMG, en las cuales TGF- β actúa como un factor inhibitorio del crecimiento. Podríamos suponer que una menor respuesta a un regulador negativo como TGF- β resulta en una ventaja para las células tumorales LM3, como es en este caso un crecimiento celular sin restricciones.

Acción de TGF- β sobre la producción de enzimas proteolíticas.

Un paso importante en la progresión de tumores epiteliales es la disolución de las membranas basales (MB) que separan a las células epiteliales de otros compartimentos, por acción de serino-proteasas como el uPA y de metaloproteinasas (MMPs), enzimas fuertemente asociadas a la invasión y la metástasis (Blasi, 1997; Nelson y col., 2000). Es aceptado que las

alteraciones en la regulación de la remodelación de la MEC son determinantes esenciales de las distintas etapas de la cascada metastásica (Mazar y col., 1999; Egeblad y Werb, 2002).

TGF- β es un fuerte regulador tanto de los componentes de la MEC como de las enzimas involucradas en su remodelación (Hanahan y Weinberg, 2000; Hagedorn y col., 2001). En nuestro modelo experimental, TGF- β induce un importante aumento en la actividad de MMP-9, en todas las células estudiadas, independientemente del fenotipo metastásico. Podríamos hipotetizar que como todas las células del modelo tienen capacidad metastásica *in vivo*, todas ellas requieren de MMPs para alcanzar exitosamente el órgano blanco. Aún así, cabe destacar que el efecto inductor de TGF- β sobre la actividad de MMP-9 no es tan marcado en las células altamente metastásicas MM3, posiblemente debido a que presentan una elevada producción constitutiva de MMP-9. Sin embargo, las líneas celulares LM3 y LMM3, altamente invasivas además de metastásicas, no presentan altos niveles basales de MMP-9. Recientemente, Kim y col. (2003), determinaron que la expresión de MMP-9 no es suficiente para inducir el fenotipo invasivo en una línea de carcinoma de mama humano. Se conoce que este proceso depende en parte de otras enzimas, además de las MMPs.

Además de incrementar la actividad de la enzima, TGF- β 1 induce un marcado aumento en la expresión del mRNA de MMP-9 en las células LM3, a las 8 y 24 hs de tratamiento con la citoquina. Sin embargo, el nivel de inducción transcripcional no se ve directamente reflejado en la actividad proteolítica de MMP-9. Esto podría deberse a modulaciones en los distintos mecanismos de activación de las MMPs, así como a la presencia de inhibidores endógenos, como los TIMP, que controlan su actividad (Matrisian, 1990; Nagase, 1997).

Por otra parte, a fin de estudiar la importancia de la funcionalidad del sistema TGF- β /T β Rs en nuestro modelo de tumor de mama, transfectamos células LM3 con formas dominante negativas (dn) de los receptores de señalización de TGF- β , T β RI y T β RII. De este modo, obtuvimos tres líneas celulares, una que expresa dnT β RI, que denominamos LM3/5KR, otra que expresa dnT β RII, denominada LM3/K277R, y una línea control de la transfección, LM3/BMN, que se emplearon para estudiar distintos efectos biológicos de TGF- β , tanto *in vitro* como *in vivo*.

Así, determinamos que tanto T β RI como T β RII son esenciales para los efectos de TGF- β sobre la actividad de MMP-9. Entonces, podemos inferir que la inducción de MMP-9 por TGF- β es un efecto directo de la funcionalidad del sistema TGF- β /T β Rs sobre las células de adenocarcinoma de mama en estudio.

Por otra parte, en relación a las vías de señalización implicadas en la regulación de MMP-9, utilizamos un enfoque farmacológico empleando inhibidores específicos de quinasas y determinamos que las vías de señalización p38Mapk y MEK/ERK están involucradas en el efecto de TGF- β sobre MMP-9 en las células LM3. Ambas vías estarían bloqueando la inducción de MMP-9 por TGF- β ; pero esta inhibición sería parcial, ya que TGF- β es capaz aún de aumentar la actividad de MMP-9. Existe cierta evidencia de la participación de vías MAPK en la regulación de MMPs en distintos sistemas celulares. Por ejemplo, Johansson y col. (2000) describieron que la expresión de MMP-1 y MMP-13 depende de p38Mapk. Donnini y col. (2004) determinó que las vías MEK/ERK y p38Mapk pueden modular MMPs en respuesta a trombospondina-1. Asimismo, otros autores encontraron que la expresión de MMP-9 puede ser regulada por diversas vías MAPK, como JNK, p38Mapk y MEK/ERK, y también por Smads, en respuesta a diversos GF (Gum y col., 1997; Aguirre Guiso y col., 1999; Simon y col., 2001; Ravanti y col., 2001; Leivonen y col., 2002; Selvamurugen y col., 2002). Entonces, así como lo describieron Selvamurugen y col. (2002) para MMP-13, podemos suponer que otra vía de señalización, Smads y/o una vía alternativa, está mediando el efecto de TGF- β sobre MMP-9 en las células LM3.

Por otra parte, Davidson y col. (2003) encontraron que la expresión de la proteína MMP-9 en células de carcinoma seroso de ovario se correlaciona con la fosforilación de p38, pero su actividad enzimática (medida por zimografía) mostró una relación inversa tanto con fosfo-ERK como con fosfo-p38Mapk. Estos datos concuerdan con nuestros resultados. Como se conoce poco acerca de los mecanismos utilizados por TGF- β en la regulación de proteasas, especialmente en su actividad, consideramos que nuestros resultados aportarían datos interesantes.

La importancia del sistema de activación del plasminógeno en el fenotipo metastásico resulta del balance entre activadores (tanto el uPA secretado como el uPA asociado a células)

y sus inhibidores (PAI), lo cual determina en parte el grado de malignidad de las células tumorales (Sherbet y Lakshmi, 1997). En nuestro modelo, TGF- β indujo un amplio espectro de efectos sobre distintos componentes del sistema de activación del plasminógeno, como se observa en la **Tabla VIII.2** (Resultados). En las células poco metastásicas M3, TGF- β inhibe la actividad del uPA secretado sin modular la actividad del uPA asociado a membrana (mb-uPA), a la vez que incrementa marcadamente la actividad de su inhibidor específico PAI. Esto indicaría que en las células M3, TGF- β modula uPA y su inhibidor PAI en forma independiente y que la actividad de PAI inducido por TGF- β podría estar bloqueando la actividad constitutiva de uPA, ayudando a mantener una baja capacidad metastásica en estas células. En las células altamente metastásicas MM3, en cambio, TGF- β no es capaz de modular ni el uPA secretado ni PAI; sin embargo tanto la actividad de mb-uPA como del uPA total asociado a células es aumentada por TGF- β . Se ha descrito que mb-uPA es ~40 veces más efectivo en su actividad proteolítica que el uPA secretado (Ossowski, 1988; Koshelnick y col., 1999), por lo que TGF- β podría estar promoviendo el fenotipo altamente metastásico de las células MM3 en parte a través de mb-uPA.

En las líneas celulares de nuestro modelo, altamente invasivas y metastásicas, los efectos de TGF- β sobre el sistema de activación del plasminógeno parecen ser más complejos aún. En las células LM3, TGF- β no es capaz de modular la actividad del uPA secretado ni la de mb-uPA; tampoco modula la expresión de uPA a nivel de mRNA. En cambio, TGF- β 1 induce un marcado aumento en la expresión del mRNA de PAI-1, así como en la actividad del mismo, en estas células. En otros tipos celulares también se encontró que TGF- β 1 produce un incremento en la transcripción y/o síntesis de PAI-1 (Boehm y col., 1999; Hua y col., 1999; Ramont y col., 2003). A pesar de conocerse como inhibidor de una enzima proteolítica, el rol de PAI-1 en la invasión parece ser complejo y variado, ya que se ha descrito que PAI-1 inhibe, incrementa o no tiene impacto significativo en el fenotipo invasivo de distintas células tumorales (Grondahl-Hansen y col., 1993; Soff y col., 1995; Bajou y col., 1998). Por otro lado, en pacientes con cáncer de mama, altos niveles de PAI-1 se correlacionan con mal pronóstico (Grondahl-Hansen y col., 1993). Todos estos resultados no deben ser relacionados solamente con su actividad sobre uPA, sino también con su efecto modulador de otras respuestas biológicas, como la adhesión celular.

En las células LMM3, a diferencia de lo encontrado en la línea LM3, TGF- β induce la actividad tanto de uPA como de PAI. En este caso, el nivel de inducción de PAI parece no ser suficiente para modular la actividad del uPA secretado, ya que si lo comparamos con lo encontrado en los cultivos primarios de M3, donde suponemos que podría existir un balance entre proteasa e inhibidor, el nivel de actividad de PAI en las células LMM3 es marcadamente menor.

Más aún, si comparamos el efecto de TGF- β sobre el sistema de activación del plasminógeno entre células no-tumorigénicas y tumorales de la misma estirpe, encontramos que en las células NMuMG, el nivel del mRNA de uPA constitutivo es indetectable, y TGF- β 1 es incapaz de regularlo. Pero, mediante RT-PCR detectamos PAI-1 endógeno en estas células, que es notablemente inducido por TGF- β , incluso en una proporción mayor que en la línea LM3. Si analizamos estos datos en función del balance neto entre activadores e inhibidores, podemos suponer que, en las células NMuMG, un nivel mayor del inhibidor PAI-1 que de uPA contribuye al control de la actividad proteolítica.

Acción de TGF- β sobre el citoesqueleto celular.

Se conoce que TGF- β es capaz de provocar cambios en la morfología celular, una de cuyas manifestaciones es la transición epitelio-mesenquimática (TEM), que puede ser inducida por TGF- β tanto en células epiteliales normales como transformadas (Miettinen y col., 1994; Oft y col., 1996, Portella y col., 1998). Como fue descripto previamente, en las células no-tumorigénicas NMuMG, el tratamiento con TGF- β durante 24 hs produce TEM, que se evidencia, entre otros cambios, por la formación de fibras de stress (SF) estables. En cambio, en las células altamente invasivas y metastásicas LM3, TGF- β 1 produce una leve remodelación de la actina cortical a las 24 hs, aunque los cambios inducidos no son suficientes para describirlos como correspondientes a una TEM.

Además, mediante un enfoque farmacológico analizamos las vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina por TGF- β . De este modo, determinamos que este efecto de TGF- β es mediado por la vía p38Mapk. Además, la vía MEK/ERK estaría también participando de esta respuesta, inhibiendo la formación de SF en las

células LM3, ya que el bloqueo de Raf-1 y de MEK1 en la cascada Ras/Raf/MEK/ERK resulta en una marcada formación de SF.

Con el objeto de comprender los mecanismos involucrados en la respuesta diferencial de las células NMuMG y LM3 a TGF- β sobre el citoesqueleto de actina, estudiamos la expresión y/o activación de otras moléculas relacionadas con actina. Así, encontramos que TGF- β 1 induce la activación del complejo Arp2/3, esencial para la polimerización y formación de filamentos de actina, tanto en las células no-tumorigénicas NMuMG como en las células LM3, con una cinética similar.

Como es la primera vez que se demuestra la activación del complejo Arp2/3 en respuesta a TGF- β , nos resultó interesante tratar de determinar qué vías activa TGF- β para inducir este efecto. Utilizando inhibidores de quinasas, determinamos que las vías de señalización intracelular p38Mapk, MEK/ERK y PI3K/Akt parecen no estar directamente involucradas en este efecto.

Debido a que la remodelación del citoesqueleto de actina depende de la acción conjunta de varias moléculas relacionadas, estudiamos también la activación de HSP27, que asiste a la polimerización de actina, y determinamos que no es regulada por TGF- β 1 en LM3.

Por otra parte, estudiamos la expresión de tropomiosinas (TM) en respuesta a TGF- β . Las TM son fundamentales para la estabilización de los filamentos de actina, por lo que se asocian a la formación de SF. Encontramos que, si bien las células tumorales LM3 expresan un nivel basal elevado de TM, tanto de proteína como de mRNA, TGF- β 1 no es capaz de regular ni la proteína ni el mensajero de TM. En las células NMuMG, en cambio, se determinó recientemente que TGF- β induce la expresión de TM, a través de un aumento en la transcripción de los genes TM- α y TM- β (Bakin, comunicación personal). Además, se detectó un incremento inducido por TGF- β en las isoformas de alto peso molecular TM1 (producto del gen TM- β) y TM2 (producto del gen TM- α) en las células de carcinoma de pulmón humano metastásicas A549 (Tada y col., 2000). Podemos suponer que el nivel basal elevado de TM no es suficiente para formar SF estables en las células LM3. Se sabe que TM interactúa con fosfo-HSP27 en la contracción muscular (Somara y Bitar, 2004); pero no se determinó si se relacionan en células no musculares. Quizás, en las células LM3, el nivel de fosfo-HSP27 y la unión de TM a esta proteína no es suficiente para estabilizar la actina en forma de SF. O bien TM sea

afectada por fosforilación o por clivaje, como se describió en otros modelos (Tada y col., 2000). Además, como detectamos que la vía MEK/ERK inhibe la formación de SF en las células LM3 y como recientemente se comunicó que la vía MEK/ERK fosforila a TM (Houle y col., 2003), podríamos suponer que esta vía también altere la unión de TM a actina.

Otra proteína involucrada en la estabilización de la actina es MLC2. TGF- β 1 induce la activación de la proteína MLC2 en las células LM3, pero el incremento de fosfo-MLC2 no resulta suficiente para formar SF. Esto podría explicarse porque la actividad de MLC2 es secundaria a la de TM (Sellers y Pato, 1984). Entonces, si bien MLC2 está activa, al no haber inducción de la actividad de TM en respuesta a TGF- β en las células LM3, no puede completarse la formación de SF.

Efecto de TGF- β sobre la migración celular.

Determinamos que TGF- β 1 estimula la migración de LM3 y que las vías de transducción de señales p38Mapk y MEK/ERK están involucradas en este efecto. Evidencias recientes sugieren un rol de miembros de MAPK en el fenotipo invasivo y/o en la motilidad celular en diversos sistemas celulares y en respuesta a distintos factores de crecimiento. Así, p38Mapk participa de la reorganización de actina y es un importante mediador de la motilidad de células endoteliales y de músculo liso (Rousseau y col., 1997; Matsumoto y col., 1999). A su vez, p38Mapk puede regular la organización de la actina celular mediante la fosforilación de HSP27 (Huot y col., 1998; Hedges y col., 1999). Por otro lado, la vía MEK/ERK ha sido involucrada en la migración o invasión de células de glioblastoma humano y células de músculo liso vascular (Klemke y col., 1997; Hedges y col., 1999). A pesar de estos datos, es poco lo que se conoce en cuanto a los mecanismos de acción de TGF- β sobre la migración celular. Recientemente, Bakin y col. (2002) determinaron que la inducción de la migración en las células NMuMG es mediada por la vía p38Mapk. Todos estos datos coinciden con lo encontrado en las células LM3.

Además, como se conoce que el proceso de migración celular es regulado fuertemente por distintas enzimas y sus inhibidores, podemos suponer que, en respuesta a TGF- β , el aumento en la actividad de MMP-9 observado en las células LM3 podría contribuir a una mayor capacidad migratoria.

Efecto de TGF- β sobre la invasión.

El proceso invasivo requiere de motilidad celular y de la degradación de componentes de la MEC para ocurrir exitosamente. En nuestro modelo de adenocarcinoma de mama, TGF- β 1 induce un aumento en la capacidad invasiva *in vitro* en todos los tipos celulares, independientemente de su fenotipo metastásico. Estos resultados pueden ser entendidos en base a la necesidad de toda célula metastásica de invadir las membranas basales durante las distintas etapas de la cascada. En otros modelos tumorales, la producción de TGF- β estimula la capacidad invasiva *in vitro*, asociado a un aumento en la capacidad migratoria celular (Morton y Barrack, 1995).

Por otra parte, empleando las células LM3 que sobreexpresan las formas inactivas de los receptores T β RI y T β RII, LM3/5KR y LM3/K277R, detectamos que el bloqueo de cualquiera de los T β Rs reduce la capacidad invasiva basal de LM3. Las células LM3 secretan grandes cantidades de TGF- β , el cual podría actuar en forma autocrina estimulando la invasión; la inactivación de los receptores específicos rompería este circuito autocrino. Por otra parte, el tratamiento con TGF- β 1 exógeno de las células LM3 transfectadas no fue capaz de inducir su invasividad como en las células parentales LM3, lo que indica que un sistema de señalización funcional es esencial para este efecto de TGF- β . En una línea celular de carcinoma de colon, se observó también que el bloqueo de la función de T β RII suprime la invasión *in vitro* y el fenotipo altamente metastásico (Oft y col., 1998). Más recientemente, Dumont y col. (2003) determinaron en una línea de carcinoma de mama humano (MDA-MB-231) que la expresión de dnT β RII bloquea la motilidad celular, mientras que la co-expresión con Smads funcionales no es capaz de restaurar este efecto, por lo que los autores postularon que la capacidad mótil de estas células es independiente de la vía Smads.

Existe una íntima y complicada relación entre el sistema TGF- β y la vía Ras en la inducción de la tumorigénesis y la metástasis, ya que TGF- β puede activar tanto directamente vías MAPK como interactuar recíprocamente con estas vías cuando éstas ya están activadas por otros motivos. Datos recientes sugieren que TGF- β y Ras activado podrían cooperar para promover las capacidades invasiva y metastásica (Park y col., 2000b; Wakefield y Roberts, 2002).

En este sentido nosotros demostramos en nuestro modelo que el efecto de TGF- β sobre la invasión *in vitro* de las células LM3 es mediado por las vías de transducción de señales p38Mapk y MEK/ERK. Nuestros resultados son muy novedosos, debido a que no existen antecedentes en la literatura que asignen un mecanismo de acción de TGF- β en la invasión tumoral.

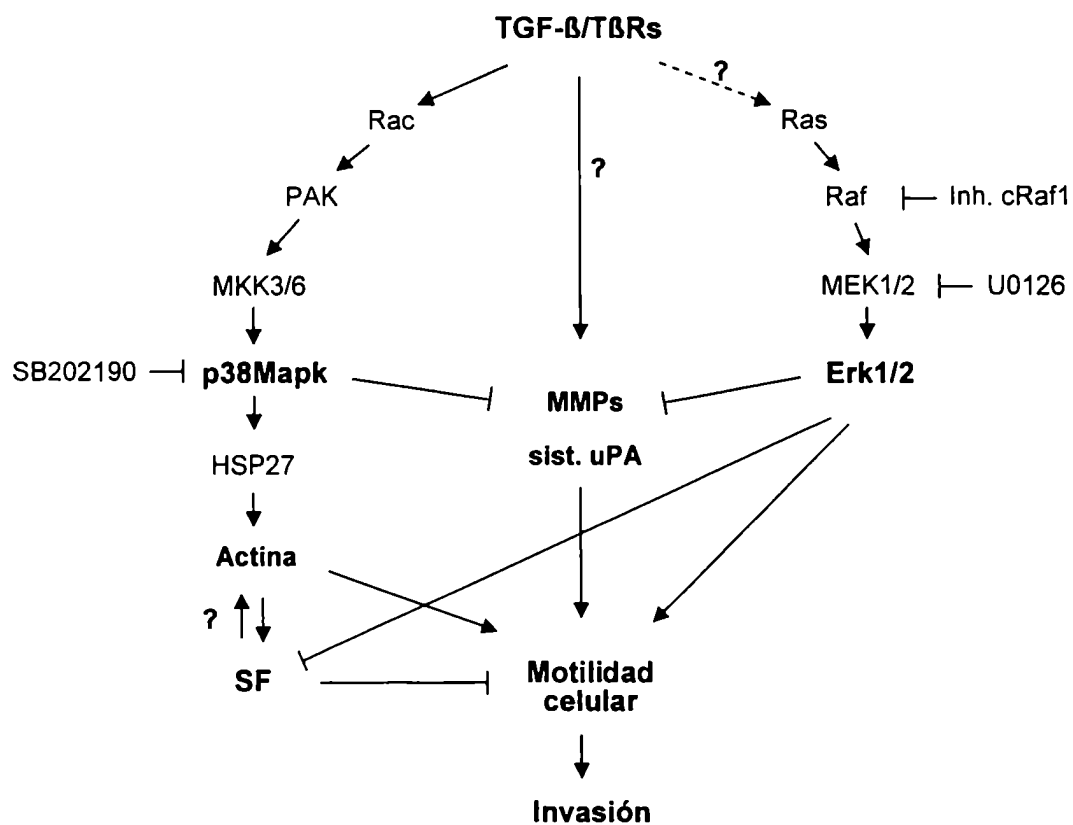
Se conoce que las MMPs incrementan la invasividad de células tumorales (Sato y col., 1994; Yu y Stamenkovic, 2000). Como se indicó previamente, todas las células de nuestro modelo experimental secretan MMPs, y con el empleo de un inhibidor farmacológico de estas proteasas determinamos su participación en la inducción de la invasividad *in vitro* por TGF- β . Además, la forma latente de TGF- β puede ser activada por MMP-9, frecuentemente expresada por las células tumorales, especialmente en los sitios de invasión tumoral, generando un feedback positivo (Yu y Stamenkovic, 2000). Por lo tanto, la actividad autocrina de TGF- β puede favorecer la progresión tumoral, estimulando la capacidad invasiva de las células tumorales (Oft y col., 1998).

Existe evidencia que indica que los efectos de TGF- β sobre el crecimiento celular podrían ser disociados de sus efectos sobre respuestas celulares especializadas, como la estimulación de los componentes de MEC y la motilidad celular (Stampfer y col., 1993). Recientemente, se sugirió la existencia de diferentes umbrales para las distintas respuestas celulares a TGF- β , donde se postuló que el umbral para la resistencia al efecto antiproliferativo de TGF- β sería menor que el requerido para la pérdida de respuestas asociadas con la adhesión celular, la invasión y la metástasis (Dumont y Arteaga, 2000). Así, en las células tumorales resistentes al efecto citostático de TGF- β , la citoquina puede estimular por ejemplo la migración celular, a la vez que podrí inhibir las respuestas inmunes del huésped (Park y col., 2000a). Nuestros resultados son coincidentes con estos datos, ya que las células altamente invasivas y metastásicas LM3 y LMM3 han perdido su respuesta al efecto antiproliferativo, pero la modulación proteolítica del microambiente así como su capacidad invasiva son regulados e inducidos por TGF- β .

En el siguiente esquema, se indican los mecanismos involucrados en los efectos de TGF- β sobre la migración celular y la invasión en las células LM3 de nuestro modelo. Así, la inducción por TGF- β de la remodelación del citoesqueleto de actina, de la migración celular y de la invasión son mediados por la vía p38Mapk. Por otra parte, la vía MEK/ERK bloquea la formación de fibras de stress (SF) en las células LM3, lo que contribuiría indirectamente a aumentar su motilidad en respuesta a TGF- β . Además, demostramos que la vía MEK/ERK está directamente involucrada en la inducción de la migración celular y la invasión por TGF- β en las células LM3.

Más aún, determinamos que TGF- β induce la actividad de enzimas proteolíticas como MMP-9 y distintos componentes del sistema de activación del plasminógeno, contribuyendo en los procesos de migración e invasión celular. Encontramos que las vías p38Mapk y MEK/ERK bloquean el efecto de TGF- β sobre MMP-9, por lo que la actividad de la enzima es inducida por otra vía de señalización en respuesta a TGF- β en nuestro modelo.

**Modelo del mecanismo de inducción de la migración celular y la invasión por
TGF- β en las células de adenocarcinoma de mama murino LM3**



Efecto de TGF- β sobre el crecimiento y la diseminación tumoral de células de adenocarcinoma mamario murino.

Finalmente, como último objetivo de este subproyecto, nos propusimos establecer si TGF- β es capaz de modular el comportamiento *in vivo* de las células estudiadas extensamente *in vitro*. Para ello, inoculamos sc las células LM3 transfectadas con dnT β Rs y comparamos su capacidad tumorigénica y de formación de metástasis con las células LM3/BMN control.

Determinamos que tanto las células que expresan las formas inactivas de T β RI ó T β RII, LM3/5KR y LM3/K277R, respectivamente, como las células control son capaces de formar tumores subcutáneos y originar metástasis pulmonares al ser inoculadas en animales singeneicos. Cabe destacar que si bien todas ellas presentaron un periodo de latencia similar, la tasa de crecimiento tumoral fue significativamente menor en las células que expresan los receptores mutados con respecto a las células transfectadas con el vector control. Esto indica que la ausencia de un sistema de señalización funcional de TGF- β induce un retardo en el crecimiento tumoral en nuestro modelo de adenocarcinoma de mama. Oft y col. (1998) emplearon dos líneas celulares murinas, una de carcinoma de colon CT26 y otra de carcinoma de mama que expresa Ha-Ras, y las transfectaron con la misma construcción dnT β RII (K277R) utilizada en este trabajo. En ambas líneas celulares determinaron que el desarrollo tumoral es retardado o incluso inhibido cuando las células se inyectan sc en ratones BALB/c. Por otra parte, líneas celulares de cáncer de colon humano que expresan mutaciones de pérdida de función en T β RII tienen un bajo potencial invasivo intrínseco. La invasividad de estas células pudo ser restaurada por re-expresión de T β RII wild type. Por lo tanto, una función principal de TGF- β sería actuar como un promotor autónomo celular en la progresión tumoral (Markowitz y col., 1995).

Asimismo, las células LM3 que expresan T β RI no funcional crecen más lentamente que aquellas que presentan T β RII bloqueado. Debido a que ambas líneas transfectadas presentan aproximadamente el mismo nivel de expresión de EGFP (indicativo de eficiencia de transfección) en el momento de realizar los experimentos, desconocemos la causa de estos resultados. Sin embargo, si bien se detectaron células EGFP-positivas en los tumores formados

por LM3/K277R, no podemos asegurar que no se haya producido una selección poblacional *in vivo*.

Por otra parte, se analizó la capacidad metastásica de las distintas líneas de adenocarcinoma de mama transfectadas. Se encontró que todas las células inoculadas en animales fueron capaces de formar focos metastásicos en el órgano blanco, el pulmón. Además, no se encontraron diferencias ni en el número ni en el tamaño de metástasis entre las células que expresan dnT β Rs y las células control. Sin embargo, si bien todas las muestras *ex vivo* de los tumores primarios desarrollados por las transfectantes mostraron expresión de la proteína EGFP, en las metástasis se determinó la presencia de EGFP solamente en los nódulos pulmonares desarrollados por las células que expresan el vector control. Si bien se requieren estudios más exhaustivos para corroborarlo, podemos especular que los focos metastásicos están constituidos exclusivamente por células tumorales que conservan la expresión de T β Rs funcionales. Esto se explica debido a que la proteína EGFP (y por ende, los receptores inactivos) no se expresan en la totalidad de las células tumorales transfectadas (% de eficiencia de transfección), por lo que podríamos suponer que las células que conservan los receptores wild type presentan una ventaja selectiva en la capacidad metastásica.

Se ha encontrado que TGF- β es un efector autocrino de las metástasis en cáncer de mama humano. Utilizando una línea celular de cáncer de mama humano se observó que la expresión de T β RII que presenta una mutación inactivante disminuye la formación de tumor y de metástasis (Yin y col., 1999). Además, se determinó que células de carcinoma de colon CT26 que expresan dnT β RII inoculadas *iv* en ratones nude no forman metástasis experimentales. Sin embargo, en el trabajo realizado por Oft y col. (1998), las células que expresan dnT β RII fueron indetectables tanto en tumores primarios como en las metástasis. A pesar de que nuestros resultados *in vivo* fueron poco contundentes, pensamos que apoyan parcialmente estos conceptos. Para confirmar nuestra hipótesis, se requiere de otros experimentos *in vivo*, como la inoculación *iv* o bien ortotópica de las células LM3 transfectadas.

El hecho de haber establecido claras correlaciones entre la densidad de microvasos de un tumor y la metástasis y el pronóstico del paciente, destaca la importancia de la vasculatura

tumoral en la patogénesis del cáncer humano (Oberst y col., 2000). Se conoce que TGF- β puede promover activamente la angiogénesis y el spreading de células endoteliales (Roberts y col., 1986). La capacidad de los nuevos vasos para invadir el estroma tumoral requiere de la remodelación de la MEC por la acción de proteasas, como las MMPs y el uPA. En nuestro modelo de tumor de mama, si bien TGF- β estimula la actividad proteolítica, no es capaz de modular significativamente la angiogénesis producida por células LM3 inoculadas en animales. Por otro lado, en pacientes con cáncer de mama invasivo, se encontró una correlación positiva entre los niveles de PAI-1 y de uPA y la angiogénesis (Weidner y col., 1991). En las células LM3, en cambio, a pesar de una importante inducción de PAI-1 por TGF- β , este efecto parece no ser suficiente para incrementar el proceso angiogénico.

CONCLUSIONES EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a la bibliografía, en algunos sistemas celulares TGF- β tiene un rol relevante en la progresión tumoral.

Nuestros resultados indican que en nuestro modelo de adenocarcinoma de mama murino, TGF- β interviene en distintas etapas del proceso metastásico. Habiendo determinado que todas las células que componen este modelo expresan el sistema TGF- β /T β Rs y que éste es funcional a través de mecanismos autocrinos y posiblemente paracrinos tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante el siguiente esquema destacamos la participación de TGF- β en cada una de los pasos de la cascada metastásica.

En la etapa I se observa que las células tumorales de baja capacidad metastásica M3 son sensibles al efecto inhibitorio del crecimiento de TGF- β ; mientras que las células de alta capacidad metastásica, MM3, LM3 y LMM3, son resistentes a dicho efecto, por lo que la acción supresora de tumor de TGF- β estaría de este modo bloqueada en las células de fenotipo más agresivo.

La diseminación de las células tumorales requiere de su capacidad mótil, así como de enzimas proteolíticas, para alcanzar el órgano blanco. Como se muestra en el esquema en la etapa II, TGF- β produce diversos efectos sobre el sistema de activación del plasminógeno, inhibiendo su actividad neta en las células poco metastásicas M3, pero induciéndola en las células de fenotipo altamente metastásico. Además, TGF- β induce la migración celular y la invasión en nuestro modelo, y aumenta la actividad de MMP-9, que contribuiría en estos procesos. Nuestros resultados también aportan datos importantes acerca de las vías de transducción de señales involucradas en la acción de TGF- β sobre MMP-9 y sobre la invasión de células tumorales.

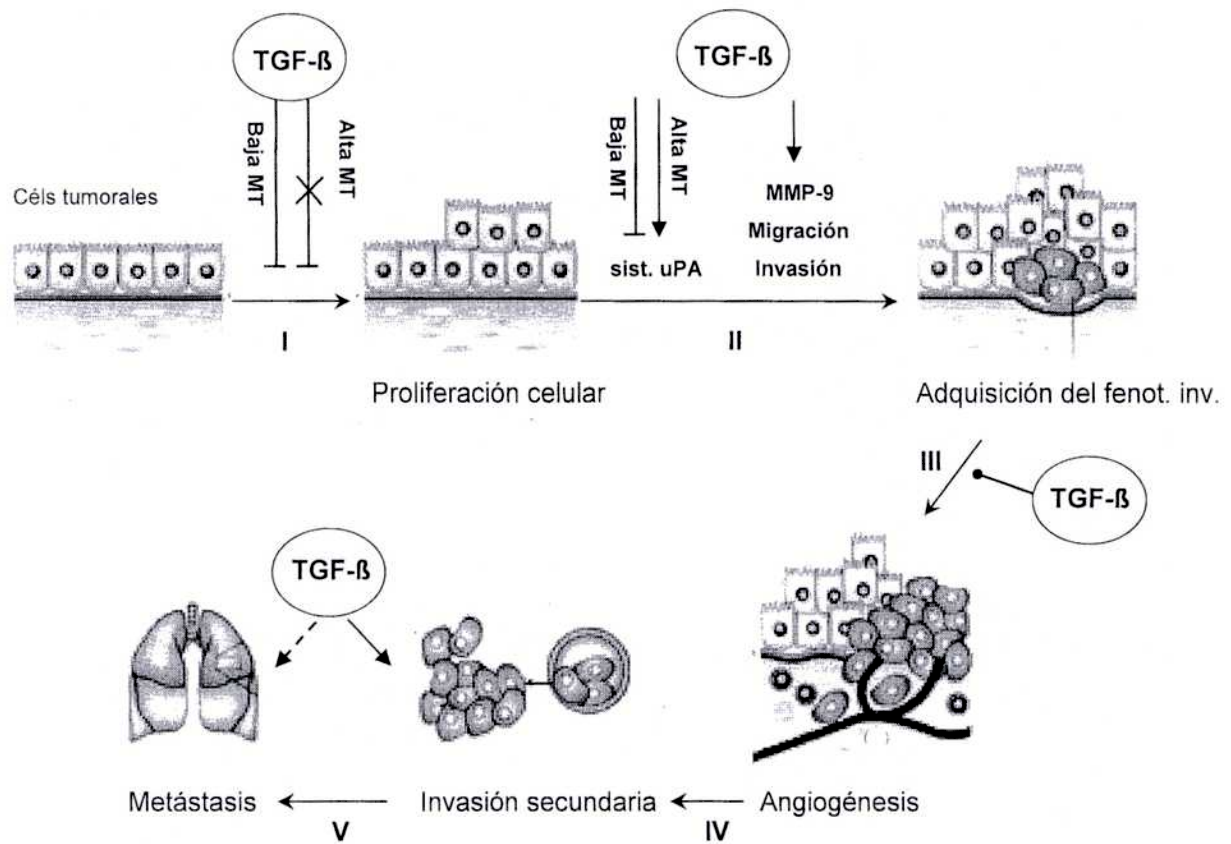
La etapa III del esquema muestra que TGF- β , si bien estimula la diseminación de las células tumorales, no es capaz de modular significativamente la capacidad angiogénica en LM3.

En la etapa IV se indica la adhesión de las células tumorales al endotelio y su extravasación en sitios blanco de metástasis, como el pulmón. Así como se describió en la

etapa II que TGF- β induce la adquisición del fenotipo invasivo, podemos suponer que también podría estimular el proceso de invasión secundaria en el órgano blanco.

Por último, en la etapa V se esquematiza que TGF- β podría estar también participando en la capacidad de formar metástasis de las células LM3, ya que la ausencia de señalización de TGF- β parece impedir la diseminación metastásica.

Entonces, de acuerdo a nuestros resultados, TGF- β estaría contribuyendo en la progresión tumoral en nuestro modelo de adenocarcinoma de mama murino.



Rol de TGF-β en las distintas etapas del proceso metastásico de las células de adenocarcinoma mamario murino.

(I) Crecimiento tumoral; (II) Adquisición del fenotipo invasivo; (III) Capacidad angiogénica; (IV) Proceso de invasión a nivel del órgano blanco; (V) Capacidad metastásica.

Baja MT/Alta MT: baja/alta capacidad metastásica.

→ : aumento —• : sin efecto —| : inhibición

CUARTA PARTE

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO

CAPITULO XI

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENDÓGENO TGF- β /TBRS

XI.1. EXPRESIÓN DE TGF- β

Mediante Western blot se analizó la expresión de TGF- β 1 en LC de la línea LP07 y de cultivos primarios P07. Se observó que mientras que las células parentales expresan altos niveles de TGF- β , comparables con las células MM3, las células LP07, en cambio, han perdido la expresión de la citoquina (**Fig. XI.1A**).

Debido a la dificultad de obtener cultivos primarios de P07, se utilizó un repique bajo (nº 10 a 15) de LP07 para evaluar la expresión endógena de TGF- β 1. Se encontró que, a diferencia de las células LP07 pasaje nº 35 usadas en este trabajo, las células LP07 de menor repique expresan TGF- β 1 a nivel de proteína, al igual que las células parentales P07 (**Fig. XI.1B**).

Para evaluar si la pérdida de expresión de TGF- β se produce a nivel de mRNA, se realizó RT-PCR (26 ciclos) utilizando RNA total de células LP07 de pasajes nº 15 y 35, tal como se describió en Materiales y Métodos. Para ello, se emplearon primers que permiten amplificar TGF- β 1 de ratón. Detectamos que tanto las células LP07 de repique nº 35 (R35) como las de repique nº 15 (R15) expresan TGF- β 1 a nivel de mRNA, en un nivel similar de expresión (**Fig. XI.1C**).

XI.2. EXPRESIÓN DE T β RS

Se estudió la expresión de los receptores de membrana de TGF- β en las células LP07. Mediante Western blot de LC se encontraron dos bandas, de 65 y 80 kDa, correspondientes a T β RI y T β RII, respectivamente (**Fig. XI.1D**). Por lo tanto, si bien las células LP07 han perdido la capacidad de producir TGF- β con respecto al tumor parental, conservan la expresión de ambos receptores de señalización.

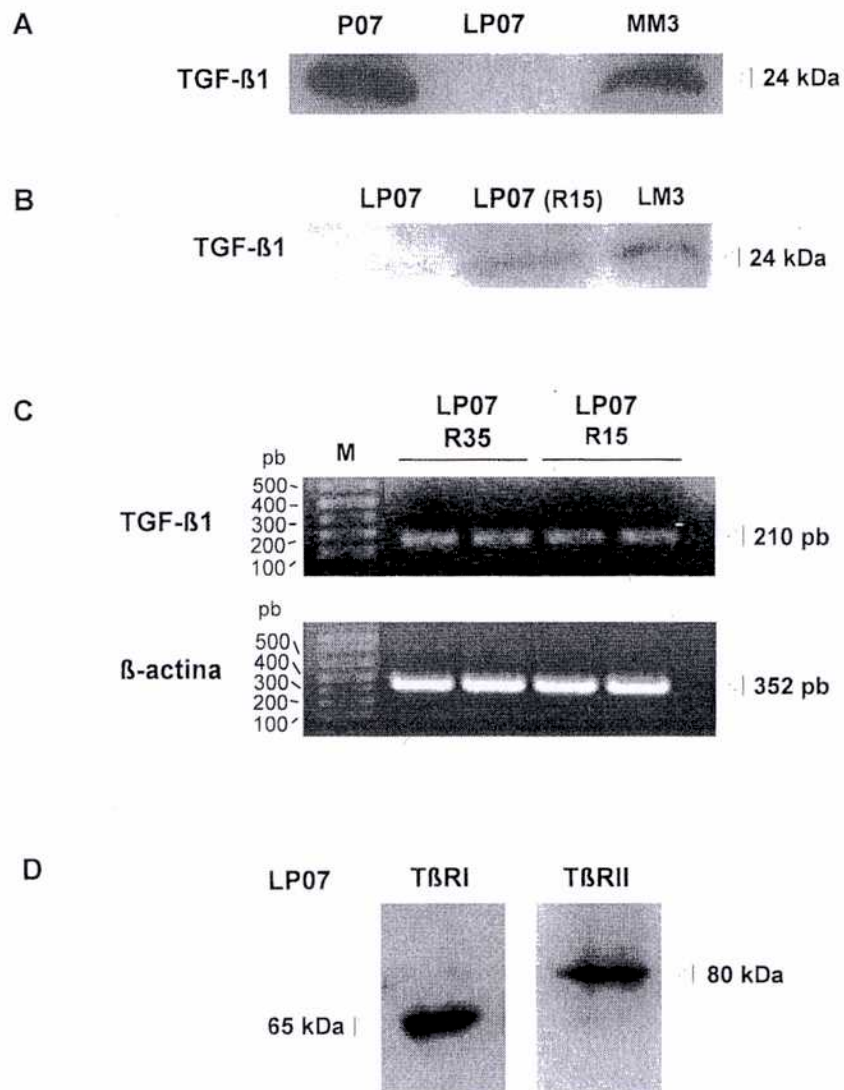


Figura XI.1

(A) Western blot de TGF-β1 en lisados celulares (LC) de LP07 y de las células de cultivo primario P07. Las células de adenocarcinoma de mama MM3 se utilizaron como control de expresión.

(B) El mismo ensayo que se muestra en (A), pero usando las células LP07 repique nº (R35) y LP07 R15. Las células LM3 se emplearon como control del ensayo.

(C) Expresión de TGF-β1 a nivel de mRNA, mediante RT-PCR de 28 ciclos. Las células analizadas son LP07 R35 y R15. La expresión de actina celular se utilizó como control del ensayo.

(D) Expresión de los receptores de señalización de TGF-β (TβRs) por Western blot en las células LP07. En todos los casos, las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

XI.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TGF- β

En las células de cultivo primario del tumor de pulmón P07 y en la línea celular derivada LP07, se realizó un bioensayo para medir la producción endógena de TGF- β , tal como se describió anteriormente para el modelo de adenocarcinoma de mama.

Se encontró que las células P07 secretan TGF- β , del cual un ~50% está en estado activo en el MC 24 hs (**Fig. XI.2**). Además, el TGF- β latente secretado por P07 es activable, como se observó mediante el tratamiento ácido del MC. En el MC de las células LP07, a diferencia de las células parentales, no se detectó actividad TGF- β a pesar de haber utilizado en el ensayo hasta un 50% de medio condicionado (**Fig. XI.2**). Estos resultados concuerdan con lo encontrado mediante Western blot, descrito anteriormente.

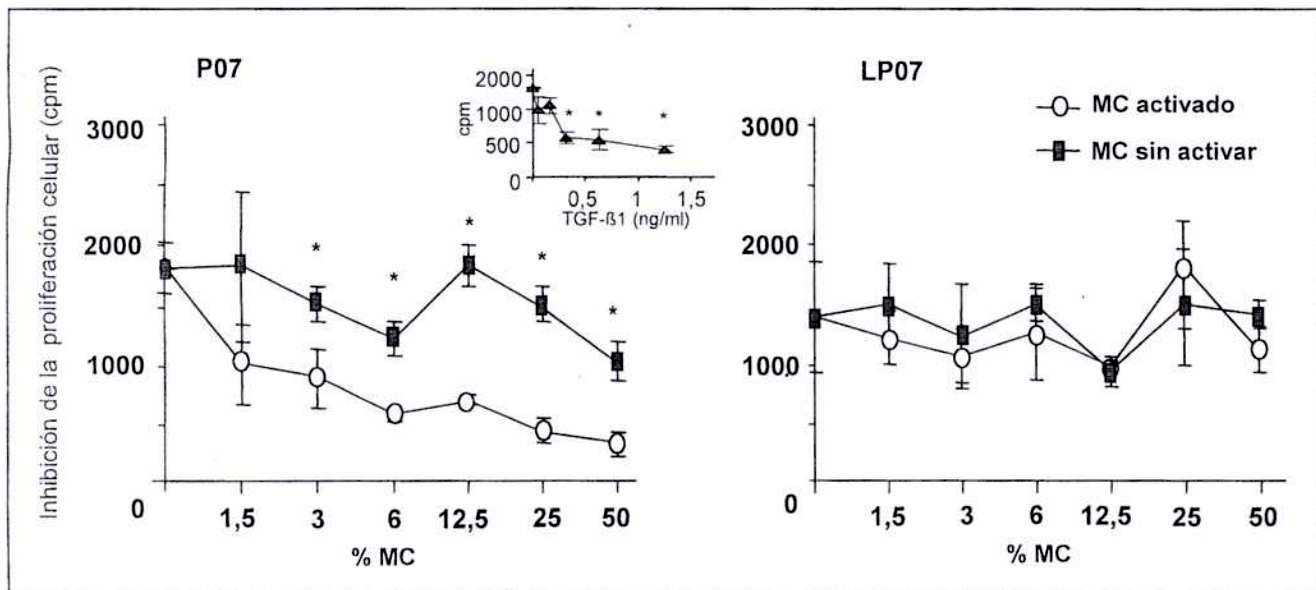


Figura XI.2

Bioensayo para detectar la producción de TGF- β en las células de cultivo primario P07 y en su línea derivada, LP07.

Los datos representan la incorporación de TdH³ de células Mv1Lu tratadas o no con distintas diluciones de medio condicionado (MC). Los valores se expresan como la media $\pm$ desvío estándar (SD) de triplicados y son representativos de dos experimentos independientes. Como inserto, se muestra una curva estándar de TGF- β 1 recombinante.

* $p < 0,05$ (ANOVA) vs MC activado.

CAPITULO XII

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDAS POR TGF- β

XII.1. FAMILIA SMADS

Mediante Western blot se estudió si TGF- β induce la activación de Smad2 en las células LP07. Para ello, se empleó un anticuerpo específico anti-fosfo-Smad2, tal como se describió para el modelo de mama. Se encontró que la proteína Smad2 se activa en respuesta a 30 y 60 min de tratamiento con 2 ng/ml TGF- β 1, y dicha activación decae luego de 4 hs de tratamiento (**Fig. XII.1A**).

Además, mediante inmunofluorescencia se analizó si TGF- β es capaz de activar la Co-Smad Smad4, utilizando un anticuerpo anti-Smad4, como se describió para el modelo de mama. Encontramos que TGF- β 1 induce la activación por translocación nuclear de Smad4 a partir de los 15 min y hasta las 4 hs de tratamiento (**Fig. XII.1B**).

XII.2. OTRAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Para determinar si TGF- β es capaz de inducir la activación de otras vías de señalización además de las Smad, se realizó Western blot de LC de LP07 contra las formas activas de las proteínas p38Mapk y ERK1/2. Se encontró que TGF- β 1 (2 ng/ml) induce la fosforilación de ERK1/2 a los 30 min de tratamiento y permanece activa hasta las 24 hs de tratamiento (**Fig. XII.2A**). Además, TGF- β también es capaz de activar a p38Mapk, a los 60 min. Esta activación perdura luego de 24 hs de tratamiento con la citoquina (**Fig. XII.2B**).

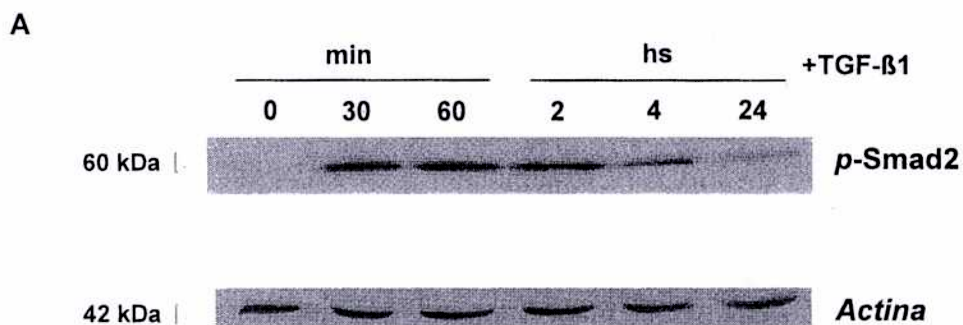


Figura XII.1

(A) Western blot de fosfo-Smad2 y su cinética de activación, en respuesta a 2 ng/ml TGF- β 1. Como control del ensayo se muestra la expresión de actina celular.

(B) Activación de Smad4 por translocación nuclear en las células LP07, en respuesta a distintos tiempos de tratamiento con TGF- β 1 (2 ng/ml). Las imágenes corresponden a microscopía de fluorescencia 400X (a) y 1000X (b). Las flechas blancas son indicativas de la presencia de Smad4 en el núcleo celular.

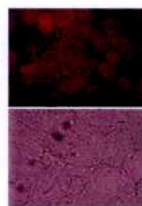
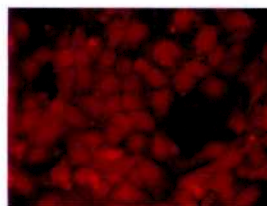
B

+ TGF- β 1

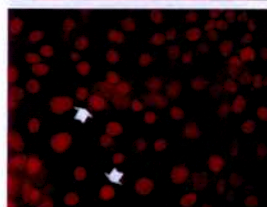
a

b

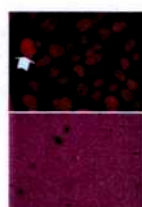
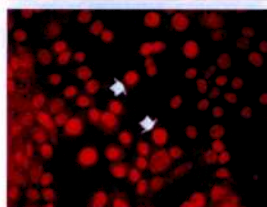
0



15 min



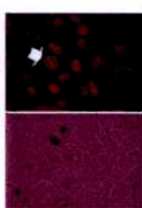
30 min



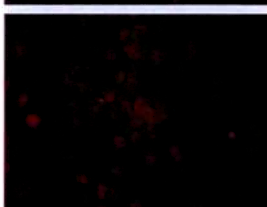
60 min



4 hs



24 hs



Smad4

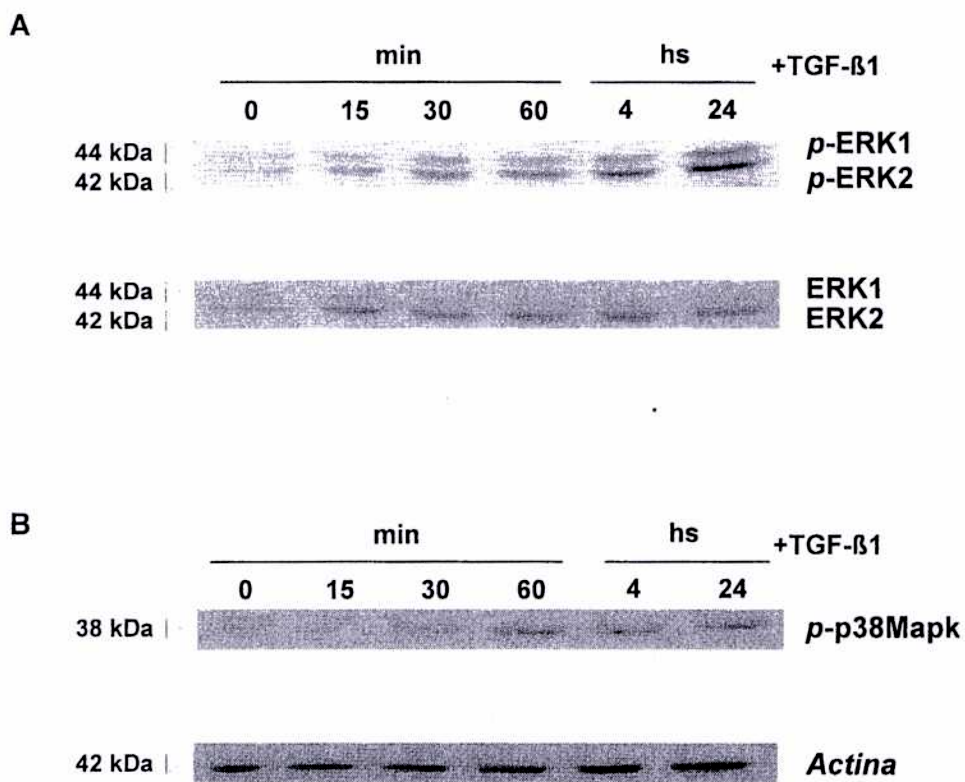


Figura XII.2

Western blot de fosfo-ERK1/2 (**A**) y fosfo-p38Mapk (**B**) en las células LP07, en respuesta a distintos tiempos de tratamiento con 2 ng/ml TGF- β 1. Se muestra la expresión total de las proteínas ERK1/2. La expresión de actina se empleó como control de ambos ensayos y se muestra en (**B**).

CAPITULO XIII

EFFECTOS *IN VITRO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN

XIII.1. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Los siguientes estudios *in vitro* se realizaron en células LP07 de repique nº 30-40.

Por medio del ensayo de incorporación de TdH³ analizamos el efecto de distintas concentraciones de TGF- β 1 sobre el crecimiento *in vitro* de las células LP07. Como control del experimento, se utilizaron las células Mv1Lu. Se determinó que TGF- β induce una marcada inhibición en la proliferación de LP07 en forma dosis-dependiente (**Fig. XIII.1**). Este efecto es comparable al observado en las células Mv1Lu, como puede apreciarse por la pendiente de las curvas de dosis-respuesta obtenidas, por lo que las células LP07 podrían considerarse también muy sensibles a los efectos antiproliferativos de TGF- β .

XIII.2. ACCIÓN DE TGF- β SOBRE LA SECRECIÓN DE PROTEASAS

XIII.2.1. Secreción de metaloproteinasas (MMPs)

Mediante zimografía cuantitativa de MC se analizó si TGF- β es capaz de regular la producción de MMPs en las células LP07. Se encontró que estas células no secretan MMP-9 ni ésta es inducida por acción de TGF- β (datos no mostrados). Sin embargo, las células LP07 secretan MMP-2, otra metaloproteinasa muy involucrada en la progresión tumoral (Urtreger, 2001). Se detectaron dos bandas, de ~65 y ~55 kDa, correspondientes a las formas latente y activa de MMP-2, respectivamente (**Fig. XIII.2.1**). El nivel basal de actividad de ambas formas de MMP-2 fue disminuído en forma dosis-dependiente en respuesta al tratamiento con TGF- β 1 (**Fig. XIII.2.1**).

XIII.2.2. Sistema de activación del plasminógeno

Mediante caseinólisis radial estudiamos la actividad del uPA secretado al MC por las células LP07, así como su regulación por TGF- β exógeno. Determinamos que TGF- β inhibe en forma dosis-dependiente la actividad del uPA secretado por LP07 (**Fig. XIII.2.2**).

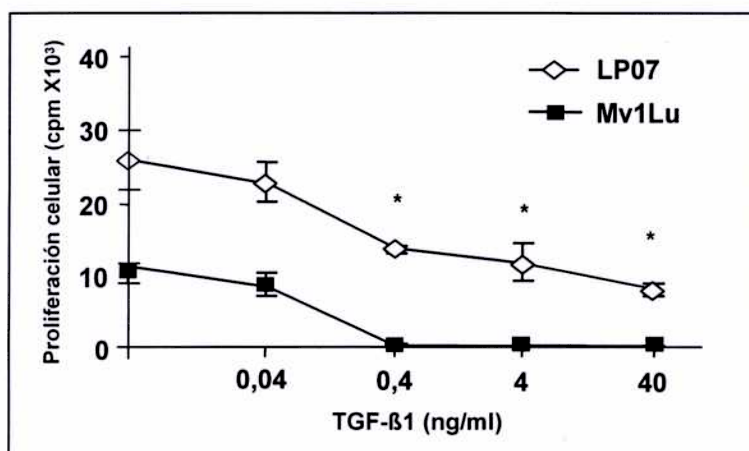


Figura XIII.1

Proliferación de las células LP07 en respuesta a TGF-β1, medida por incorporación de TdH³. Las células Mv1Lu se utilizaron como control del efecto antiproliferativo de TGF-β. Los valores se expresan como la media ± SD de triplicados y son representativos de tres experimentos distintos.

* $p < 0,05$ (ANOVA) vs control sin tratamiento.

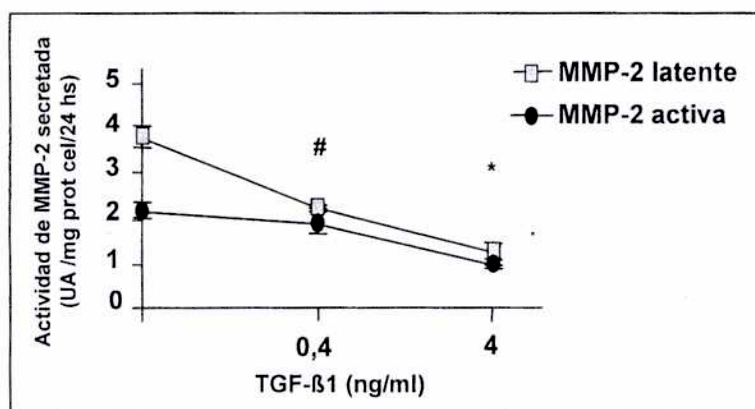


Figura XIII.2.1

Efecto de TGF- β 1 sobre la secreción de MMP-2. Mediante zimografía cuantitativa de medios condicionados de LP07, se detectaron la forma latente (~65 kDa) y la forma activa (~55 kDa) de MMP-2 murina. Se muestra una zimografía representativa de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de duplicados.

* $p < 0,05$ (t-test) vs células sin tratar; #: $p < 0,05$ (t-test) vs control, sólo para la forma latente de la enzima.

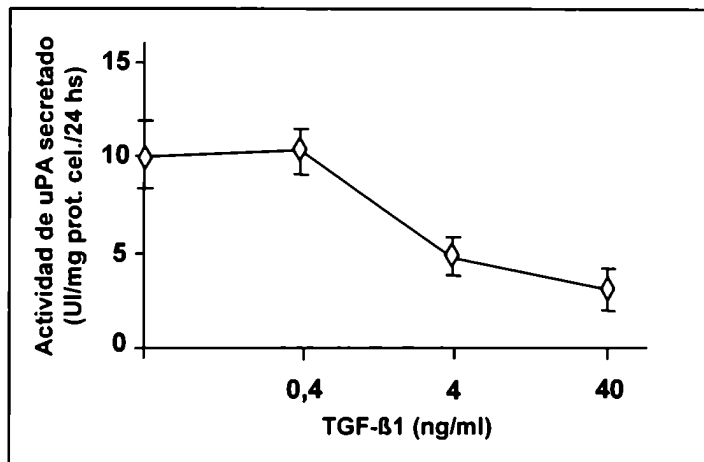


Figura XIII.2.2

Actividad del uPA secretado al MC de células LP07 tratadas o no con TGF-β1, medida por caseinólisis radial. Los datos se expresan como la media ± SD de triplicados y son representativos de tres experimentos independientes.

* $p < 0,05$ (ANOVA) vs células sin tratar.

XIII.3. EFECTO DE TGF- β SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA CELULAR

Mediante microscopía de fluorescencia estudiamos si TGF- β modula el citoesqueleto celular en las células LP07. Para ello, analizamos la organización de la actina y la tropomiosina (TM) en células tratadas o no durante distintos periodos de tiempo con 2 ng/ml TGF- β 1. La actina se detectó utilizando el compuesto faloidina-AlexaFluor 488 como se describió anteriormente; mientras que la TM se analizó por medio de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TM y un segundo anticuerpo marcado con TRITC. Como colorante de referencia, las células se tiñeron además con Hoescht 33258. Detectamos que, si bien la línea celular LP07 está compuesta por células de morfología epitelial y otras de tipo fibroblastoide, en general, la disposición de la actina se presenta en forma de fibras de stress. Además, esta configuración se correlaciona con la disposición celular de la TM (**Fig. XIII.3A**). TGF- β parece no modular ninguna de las moléculas analizadas, incluso después de 24 hs de tratamiento (**Fig. XIII.3A**).

Por otro lado, se estudió mediante inmunofluorescencia si las células LP07 expresan la proteína de membrana E-cadherina y si ésta es modulada por TGF- β 1 (2 ng/ml) a distintos tiempos de tratamiento. Se encontró que las células LP07 expresan E-cadherina basalmente y que dicha expresión, al igual que la morfología que presenta la línea LP07, es muy heterogénea. Además, el tratamiento con TGF- β no modula la molécula E-cadherina en estas células (**Fig. XIII.3B**).

XIII.4. EFECTO DE TGF- β SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Mediante el ensayo de cicatrización de heridas (Wound) se analizó si TGF- β modula la capacidad migratoria de las células LP07. Se determinó que TGF- β 1 (4 ng/ml) no es capaz de regular la motilidad *in vitro* de LP07, ni a las 24 ni a las 48 hs de tratamiento con la citoquina (**Fig. XIII.4**).

B

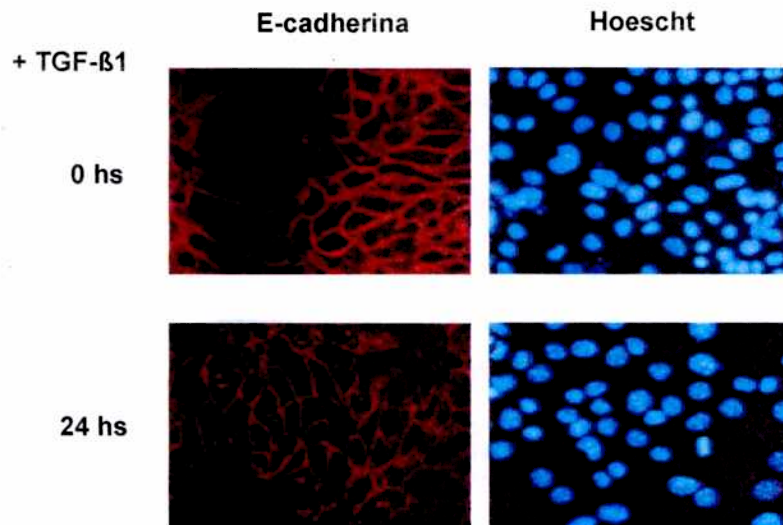
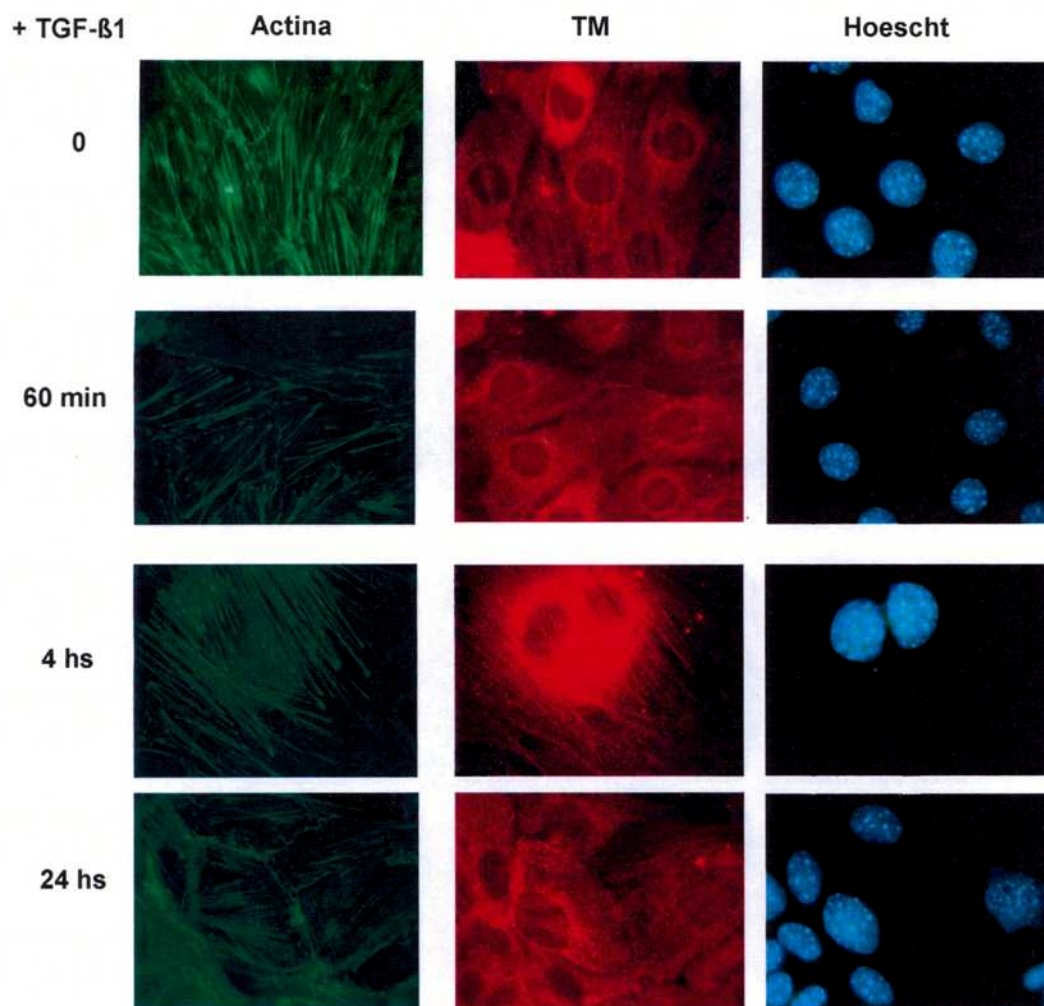


Figura XIII.3

(A) Efecto de TGF β (2 ng/ml) sobre el citoesqueleto de actina celular, medido por microscopía de fluorescencia (1000X). La actina se tiñó con faloidina AlexaFluor 488; mientras que la TM se evaluó con un anticuerpo específico y TRITC. Se utilizó Hoescht como colorante de referencia nuclear.

(B) Inmunofluorescencia de E-cadherina en células LP07 tratadas o no 24 hs con 2 ng/ml TGF β .

A



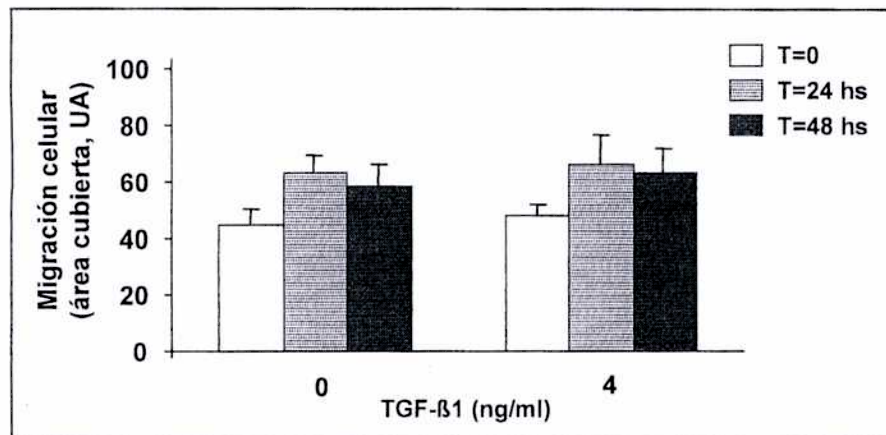


Figura XIII.4

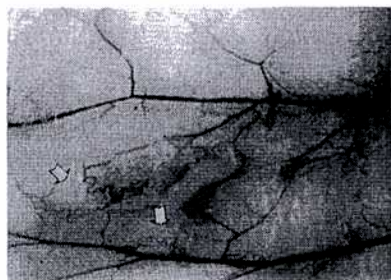
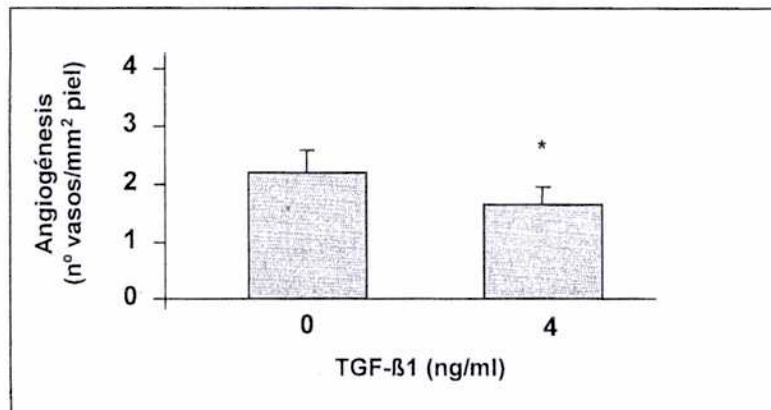
Capacidad migratoria de las células LP07 tratadas o no con 4 ng/ml TGF-β1 durante 24 ó 48 hs, medida por el ensayo de wound. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD de cuádruplicados y son representativos de dos experimentos independientes.

CAPITULO XIV

EFFECTOS *IN VIVO* DE TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN

XIV. ACCIÓN DE TGF- β SOBRE LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA

Se analizó la capacidad de TGF- β de inducir la formación de neovasos en las células LP07. Determinamos que TGF- β 1 (2 ng/ml) inhibe significativamente la capacidad angiogénica de LP07 (**Fig. XIV**). Además, como se observa en la figura, el número de loops que forman los vasos sanguíneos es considerablemente menor en las células tratadas con la citoquina respecto de las células sin tratar.



control



+ TGF-β1

Figura XIV

Efecto de TGF-β1 sobre la capacidad angiogénica *in vivo* de las células LP07. Los datos obtenidos se expresan como la media $\pm$ SD de diez datos independientes y son representativos de tres experimentos distintos. Las imágenes corresponden a fotografías de las células LP07 tratadas o no con TGF-β, donde las flechas indican la presencia de loops en el control.

* $p < 0,05$ (t-test) vs células sin tratar.

CAPITULO XV

TGF- β EN EL MODELO DE TUMOR DE PULMÓN MURINO

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

La utilidad del modelo de adenocarcinoma de pulmón murino P07/LP7 para el estudio del cáncer de pulmón, radica en el hecho de que existen muy pocos modelos experimentales para estudiar esta patología, y además en el hecho de que los animales portadores de un tumor P07 ó LP07 presentan características similares a las observadas en pacientes con cáncer de pulmón a células no-pequeñas, NSCLC, ya que desarrollan síndromes paraneoplásicos tales como caquexia, leucocitosis e hipercalcemia. Las causas de estos síndromes no se conocen totalmente (Natanson y Hall, 1997; Tisdale, 1997). Recientemente, Peluffo y col. (2004, en prensa) demostraron que estos síntomas se deben en parte a una respuesta inflamatoria sistémica. Como es bien conocido que TGF- β es un potente inmunomodulador y regula los procesos inflamatorios, nos resultó interesante caracterizar a las células de nuestro modelo experimental en relación al sistema TGF- β /T β Rs.

Con motivo de determinar si las células de nuestro modelo de adenocarcinoma de pulmón murino expresan el sistema TGF- β /T β Rs, analizamos la secreción y expresión de la citoquina y de sus receptores específicos. Encontramos que, tanto mediante Western blot como por un bioensayo, las células de cultivo primario del tumor parental P07, constituido casi exclusivamente por células tumorales, expresan TGF- β dimérico, de 24 kDa, y lo secretan al MC. Además, el nivel de expresión de TGF- β es comparable a lo encontrado en las células altamente metastásicas de adenocarcinoma de mama, MM3. Cabe destacar que aproximadamente el 50% del TGF- β total secretado por P07 se encuentra en estado activo a las 24 hs. Esta proporción de TGF- β activo es mucho mayor a la encontrada en nuestro modelo de tumor de mama, donde las células de cultivo primario M3 y MM3 secretan menos de un 10% de TGF- β activo en condiciones similares. Ya que ambos tipos de células, de adenocarcinoma de mama y de pulmón, son altamente metastásicas al ser inoculadas en animales singéneos y no son invasivas localmente, la diferencia observada no estaría asociada a estas características. Podría hipotetizarse que la alta capacidad de secretar TGF- β podría estar relacionada con la elevada producción de la citoquina encontrada en células de pulmón no transformadas, comparada con las células mamarias normales.

En cambio, a diferencia de lo encontrado en las células parentales P07, en la línea celular derivada LP07 no se detectó TGF- β ni por el ensayo biológico ni por Western blot,

sugiriendo que las células LP07 han perdido la capacidad de producir TGF- β que presenta el tumor parental. Es probable suponer que en los sucesivos pasajes para la obtención de la línea LP07 se haya perdido la capacidad de secretar un factor inhibitorio del crecimiento, como una ventaja adaptativa del crecimiento *in vitro*. Por ésto, para determinar si la falta de expresión de TGF- β en las células LP07 se debe a un evento ocurrido *in vitro*, analizamos si las células LP07 de un repique menor al utilizado expresan TGF- β 1. Encontramos que, a diferencia de las células LP07 de repique nº 35, las de repique más bajo conservan la capacidad de expresar TGF- β , la cual posiblemente se pierde en forma progresiva y rápidamente con los pasajes *in vitro*.

Debido a las diferencias encontradas en las células LP07 de distinto pasaje en cuanto a la expresión de la proteína TGF- β 1, analizamos su expresión a nivel de mRNA, mediante RT-PCR. Detectamos que ambos pasajes de LP07 expresan el mensajero de TGF- β . Por esto, consideramos que la regulación de la proteína TGF- β posiblemente se realice en un nivel post-transcripcional o bien a nivel de la traducción. Se conoce que TGF- β , además del importante control que ejerce la activación del TGF- β latente (Khalil, 2001; Annes y col., 2003), es regulado a nivel del promotor y la transcripción (Kim y col., 1989a; Lafyatis y col., 1991), a nivel post-transcripcional y a nivel traduccional (Kherl y col., 1986; Assoian y col., 1987; Kim y col., 1992). Por ejemplo, la regulación de TGF- β por esteroides y retinoides parece involucrar predominantemente mecanismos post-transcripcionales (Kim y col., 1994). En nuestro modelo de tumor de pulmón, la regulación de TGF- β se realiza previamente al control post-traduccional de la activación de la citoquina latente, ya que está directamente bloqueado el nivel de expresión de la proteína.

Analizamos también la expresión a nivel de proteína de los receptores tipo I y tipo II de TGF- β , en las células LP07. Si bien estas células no expresan el sistema completo TGF- β /T β Rs, ya que no producen TGF- β , son capaces de expresar los receptores de señalización T β RI y T β RII. En la siguiente etapa, estudiamos si dichos receptores son funcionales. Mediante incorporación de timidina tritiada, determinamos que TGF- β inhibe marcadamente la proliferación de las células LP07. A diferencia de lo observado en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC), donde la resistencia al efecto

antiproliferativo de TGF- β puede deberse a la falta de los receptores de señalización (Norgaard y col., 1994), en nuestro modelo de carcinoma de pulmón los receptores de señalización T β RI y T β RII son funcionales, ya que en presencia de TGF- β exógeno son capaces de inducir una evidente respuesta biológica. Estos resultados nos permiten concluir que, si bien las células LP07 han perdido la capacidad de expresar TGF- β , conservan la propiedad de responder a la citoquina.

Estudios recientes en células de cáncer de pulmón a células no-pequeñas que expresan T β Rs, muestran que TGF- β 1 inhibe la proliferación de estas células en crecimiento en agarosa. Por el contrario, las células de cáncer de pulmón SCL carecen de receptores y no son inhibidas por TGF- β 1 (Norgaard y col., 1994; Jakowlew y col., 1995). Nuestros resultados coinciden con lo descrito para las células NSCLC. Además, se encontró un nivel incrementado de TGF- β 1 en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón y una correlación positiva entre dicho nivel y el pronóstico de pacientes con NSCLC (Hasegawa y col., 2001; Barthelemy-Brichant y col., 2002).

Las células tumorales son capaces de desarrollar distintos mecanismos de evasión de la respuesta a factores inhibitorios. Así, si bien es un evento poco frecuente, se ha observado pérdida parcial de expresión y/o activación de TGF- β en algunos sistemas (Guo y col., 1997; Kim y col., 2000; Dumont y Arteaga, 2000; Blanchere y col., 2002; Tu y col., 2003). Además, se han descrito, en otros modelos, fallas en la señalización de TGF- β , que incluyen alteración en la expresión o disponibilidad en la superficie celular de T β Rs y mutaciones en las proteínas Smad, frecuentemente asociadas con malignidad. En conjunto, estas alteraciones en la señalización de TGF- β contribuirían a la progresión tumoral. Podríamos suponer que algo similar ocurre en las células LP07, pero a nivel de la expresión de la citoquina.

En las células LP07, debido a su control negativo de la proliferación celular, TGF- β podría funcionar como un supresor de tumor. Sin embargo, estas células podrían escapar de la acción supresora de TGF- β mediante el bloqueo de su producción. Si trasladamos nuestros resultados *in vitro* a lo que ocurre *in vivo*, se conoce que TGF- β es secretado por otras células, como las del estroma tumoral (Barnard y col., 1990). Entonces podría hipotetizarse que, si bien la señalización autocrina de TGF- β está reducida por la falta de

producción de la citoquina, las células LP07 podrían responder a TGF- β en forma paracrina en el microambiente tumoral.

Estudiamos también qué vías de señalización intracelular son activadas por TGF- β en las células LP07. Detectamos que TGF- β activa en forma temporal la proteína Smad2 por fosforilación a los 30 min y decae a las 4 hs de tratamiento con TGF- β , similar a lo encontrado en otros sistemas celulares (Lo y Massagué, 1999; Bakin y col., 2002). Habiendo determinado que TGF- β activa una R-Smad, analizamos si el tratamiento con la citoquina es capaz de activar la Co-Smad Smad4. Mediante inmunofluorescencia detectamos que TGF- β induce la translocación nuclear de la proteína Smad4. Estos resultados indican claramente que la vía de señalización Smad es funcional en las células LP07.

Se conoce que las proteínas Smad participan del efecto antiproliferativo de TGF- β (Liu y col., 1997; Miyazono y col., 2000) y como se mencionó anteriormente, la pérdida de sensibilidad a TGF- β es frecuente en el cáncer y la inactivación de miembros de la familia Smad juega un rol importante en la disrupción de la señalización de TGF- β (Tang y col., 1998; Yanagisawa y col., 2000). Las proteínas Smad2 y Smad4 son conocidas como supresores de tumor y son un blanco frecuente de mutaciones en diversos tipos de cáncer (Hahn y col., 1996; Maesawa y col., 1997). Por ejemplo, las mutaciones inactivantes del gen de Smad2 ocurren principalmente en carcinomas colorrectal y de pulmón humano (Tang y col., 1998; Yanagisawa y col., 2000).

Asimismo, también en este modelo detectamos que TGF- β es capaz de activar otras vías de transducción de señales. TGF- β induce la activación de p38Mapk a los 60 min y de ERK1/2 a los 30 min de tratamiento. Es de destacar que la activación de ambas vías de señalización es sostenida y perdura incluso luego de 24 hs de tratamiento con la citoquina. Algo similar fue descripto para la activación de la vía p38Mapk en otros sistemas celulares en respuesta a TGF- β (Engel y col., 1999; Bakin y col., 2002).

En la literatura no encontramos datos acerca de las vías de la señalización de TGF- β en células de pulmón normales o transformadas, por lo que estudiamos en nuestro modelo si TGF- β puede afectar otras respuestas biológicas, además de la proliferación. Así, determinamos que TGF- β inhibe fuertemente la actividad de MMP-2 y de uPA secretados por las células LP07. Por lo tanto, en LP07, TGF- β está inhibiendo los dos sistemas principales que regulan la degradación de las membranas basales durante las distintas etapas de la cascada metastásica (Tryggvason, 1993; Andreasen y col., 1997; Oberst y col., 2000). Si bien no se ha asociado a la actividad supresora de tumor de TGF- β con efectos biológicos específicos más allá de su acción antiproliferativa, dado el importante rol de las proteasas en muchas de las etapas de la progresión maligna, podríamos hipotetizar que el efecto inhibitorio de TGF- β sobre las proteasas apoyaría una actividad supresora tumoral de la citoquina en este modelo. Además, nuestros resultados difieren con lo observado en otros tipos de células tumorales de pulmón en respuesta a TGF- β , donde se encontró una expresión aumentada del sistema de activación del plasminógeno y de las metaloproteinasas (Lund y col., 1991; Garbisa y col., 1992; Jakowlew y col., 1997).

Por otra parte, varios autores demostraron que la expresión aumentada de proteasas como la MMP-2 y la generación de plasmina por las células tumorales incrementa la activación de TGF- β y la degradación de la MEC, con la consecuente liberación de citoquina de los reservorios (Andreasen y col., 1997). A su vez, TGF- β puede inducir MMP-2 vía Smad2, generando un feedback positivo (Piek y col., 2001). En nuestro modelo de tumor de pulmón, este circuito de autoinducción y activación de TGF- β estaría bloqueado, ya que incluso si el TGF- β secretado por las células vecinas al tumor *in vivo* actuara sobre las células LP07, la citoquina induciría la disminución de MMP-2, reduciendo así la posibilidad de activar TGF- β . Además, es factible suponer que algo similar ocurre con el sistema de activación del plasminógeno (Choong y Nadesapillai, 2003).

Estudiamos también si TGF- β regula la motilidad de las células LP07, mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Encontramos que TGF- β no es capaz de modular la migración de LP07, ni a las 24 ni a las 48 hs de tratamiento.

Por otra parte y en relación a la motilidad celular, determinamos que si bien las células LP07 son muy heterogéneas morfológicamente, presentan mayormente una distribución del citoesqueleto de actina en forma de fibras de stress. Estas células presentan TM colocalizadas con los filamentos de actina, lo que contribuye a la estabilización de dichos filamentos (Pawlak y Helfman, 2001). El tratamiento con TGF- β 1 no modula la distribución de las TM. Entonces, el hecho de que las células LP07 no presenten una elevada capacidad migratoria podría deberse a la alta proporción de SF estables que presentan, que mediante la creación de adhesiones focales con el sustrato, impedirían su motilidad. Por lo tanto, TGF- β no es capaz de modular ni el citoesqueleto de actina ni la TM asociada, así como tampoco modular la migración de LP07. Sin embargo, en la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549, Tada y col. (2000) encontraron que TGF- β induce marcadamente la expresión de tropomiosinas de alto peso molecular.

A pesar de que TGF- β parece no modular el citoesqueleto de LP07, estudiamos si la citoquina puede inducir la TEM. Como fue descripto que durante la TEM uno de los cambios observados es la pérdida de expresión de la molécula E-cadherina, estudiamos mediante inmunofluorescencia si dicha expresión es modulada en respuesta a TGF- β exógeno. Detectamos que el patrón de expresión de E-cadherina en las células LP07, si bien es heterogéneo, es muy marcado en la membrana celular y corresponde a células epiteliales. Este patrón no fue alterado por el tratamiento con TGF- β , por lo que TGF- β no induciría TEM en las células de adenocarcinoma de pulmón LP07.

Por último, estudiamos si TGF- β afecta algunos de los comportamientos *in vivo* de las células LP07. Es conocido que el proceso de angiogénesis es esencial para el desarrollo tumoral y su posterior diseminación. Encontramos que TGF- β inhibe significativamente la formación de neovasos, así como de loops vasculares. Se ha descripto que el nivel de expresión de la proteína TGF- β 1 se correlaciona con la angiogénesis tumoral en NSCLC (Hasegawa y col., 2001). Estos datos podrían relacionarse a la propiedad promotora de la

progresión tumoral que puede presentar TGF- β , y no con su actividad supresora de tumor como en nuestro modelo de tumor de pulmón.

Además, la capacidad de los nuevos vasos para invadir el estroma tumoral requiere de la remodelación de la MEC por proteasas, como las MMPs y el uPA (Mignatti y Rifkin, 1996; Itoh y col., 1998). Entonces, en nuestro modelo, la reducción de MMP-2 observada en las células LP07 en respuesta al tratamiento con TGF- β podría relacionarse con una menor capacidad angiogénica (Itoh y col., 1998).

Por último, desconocemos el rol de TGF- β en el tumor parental P07, también altamente metastásico y además productor de la citoquina. Se requiere de investigaciones más exhaustivas para determinar si TGF- β es funcional en estas células y qué papel desempeña con respecto a la progresión tumoral.

En resumen, si bien se requiere de otros estudios para completar la caracterización del sistema TGF- β /T β Rs, hemos descrito mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que nuestro modelo de adenocarcinoma de pulmón constituye un modelo experimental interesante para evaluar la acción supresora de tumor de TGF- β , incluso con vistas a una proyección en la clínica, para estudiar la posibilidad de emplear la señalización de TGF- β como agente terapéutico. Por ejemplo, recientemente se observó que en células de tumor de pulmón humanas A549, el tratamiento con TGF- β disminuye la tumorigenicidad *in vivo* (Katakura y col., 2002).

CONCLUSIONES EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO

Está bien descrito en la literatura que la alteración de la señalización de TGF- β contribuye a la pérdida de un supresor de tumor por pérdida de función.

De acuerdo a nuestros resultados, en el siguiente esquema sintetizamos el rol de TGF- β en las distintas etapas del proceso metastásico en nuestro modelo de tumor de pulmón murino.

Mientras que el tumor parental P07 expresa y activa TGF- β , la línea celular derivada LP07, si bien aún expresa el mRNA, ha perdido la capacidad de expresar y activar la proteína TGF- β . Sin embargo, al reconstituir el sistema TGF- β /T β Rs determinamos que las células LP07 responden a la citoquina. TGF- β activa la vía Smads y otras vías de transducción de señales, así como también induce distintos efectos biológicos en LP07.

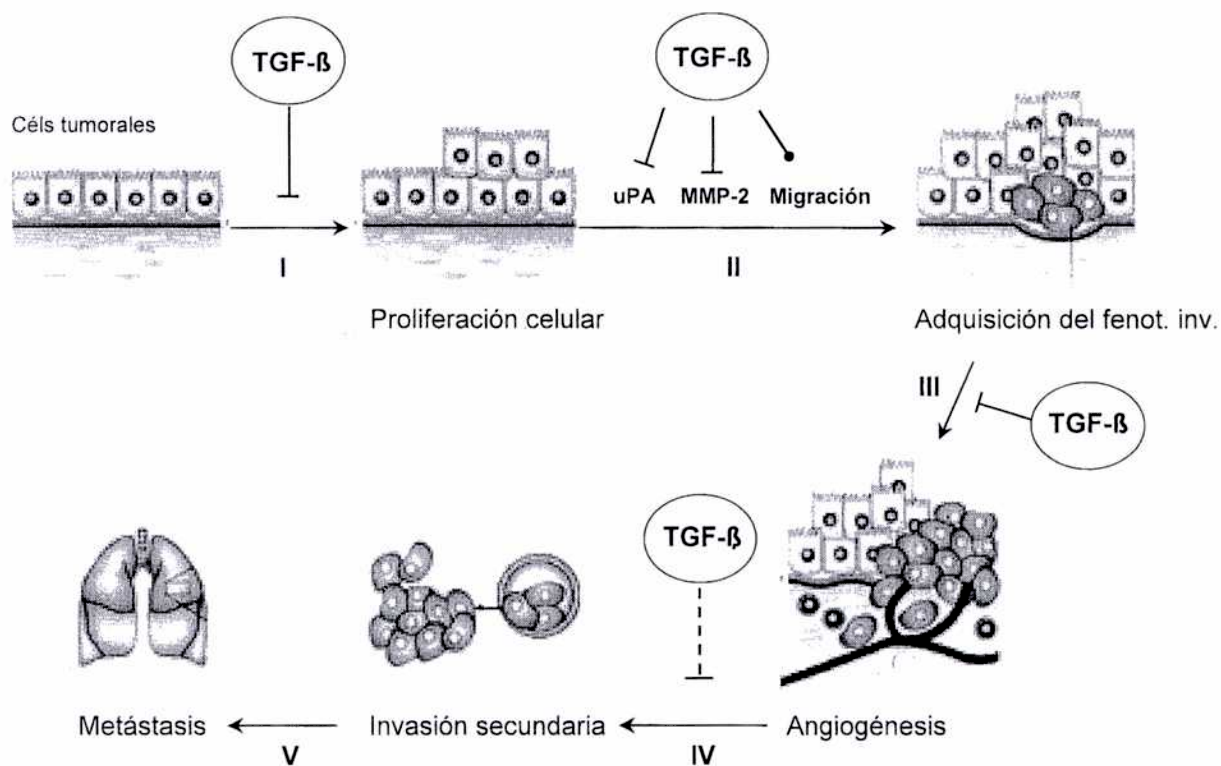
Como se observa en la etapa I del esquema, TGF- β es un potente inhibidor de la proliferación de las células LP07, por lo que TGF- β estaría actuando como un supresor de tumor.

En la etapa II del esquema se indica que, si bien no es capaz de modular la motilidad celular, TGF- β inhibe marcadamente la actividad de MMP-2 y de uPA, reduciendo la capacidad invasiva de las células LP07. Aunque la actividad supresora de tumor de TGF- β se ha asociado principalmente a su efecto citostático, los efectos sobre la actividad de enzimas proteolíticas claves en la metástasis podrían considerarse parte de su acción supresora tumoral. Entonces, la pérdida de señalización de TGF- β por falta de expresión de la citoquina podría contribuir al establecimiento de un fenotipo agresivo en las células LP07.

TGF- β inhibe además la capacidad angiogénica de las células LP07 (etapa III), tanto en el número de vasos como en la formación de loops vasculares, lo que también podría atribuirse a su actividad como supresor de tumor.

Por último, en la etapa IV del esquema se muestra la extravasación de las células tumorales en los sitios blanco de metástasis. Este paso de la cascada podría estar también bloqueado mediante la inhibición de TGF- β sobre las proteasas en las células LP07.

Según Wakefield y col. (2000), los TGF- β s deberían ser considerados como "supresores tumorales condicionados", debido a que su actividad supresora depende de una variedad de factores, que incluyen el estadio de la tumorigénesis y el nivel de expresión de TGF- β y sus receptores. En las células LP07 de nuestro modelo, la falta de expresión de un supresor tumoral como TGF- β podría estar contribuyendo al establecimiento de un fenotipo altamente metastásico.



Rol de TGF-β en las distintas etapas del proceso metastásico de las células de adenocarcinoma de pulmón murino.

(I) Crecimiento tumoral; (II) Adquisición del fenotipo invasivo; (III) Capacidad angiogénica; (IV) Proceso de invasión a nivel del órgano blanco; (V) Capacidad metastásica.

→ : aumento —• : sin efecto —| : inhibición

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo, estudiamos el rol del sistema TGF- β /T β Rs en dos modelos de adenocarcinomas murinos, de mama y de pulmón, en relación a la progresión tumoral.

Mediante estudios exhaustivos en el modelo de tumor de mama, tanto *in vitro* como *in vivo*, determinamos que TGF- β contribuye a la progresión y la metástasis en este sistema, afectando diversos procesos biológicos esenciales en las distintas etapas de la cascada metastásica. Además, consideramos que nuestros resultados aportarían datos importantes a nivel de los mecanismos empleados por TGF- β para inducir distintos efectos biológicos.

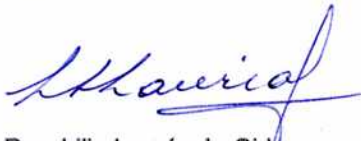
Por otra parte, encontramos que TGF- β se comporta como un supresor de tumor en nuestro modelo experimental de tumor de pulmón, no sólo a través de su efecto antiproliferativo, sino también regulando negativamente otros eventos fundamentales en la progresión tumoral. Estos datos son muy importantes, ya que no existen muchos modelos experimentales para estudiar el cáncer de pulmón; y además porque es poco lo que se conoce acerca del papel de TGF- β en este tipo de cáncer. Esto abre un camino para estudiar si la señalización de TGF- β podría ser un blanco de la acción terapéutica en algunos casos de cáncer de pulmón.

Debido a que TGF- β es una citoquina altamente pleiotrópica y que conoce poco sobre sus mecanismos de acción a nivel molecular, consideramos que nuestro trabajo es un importante aporte en relación al rol del sistema TGF- β /T β Rs en la progresión tumoral, en relación a las vías de transducción de señales implicadas en sus diversos efectos biológicos, y también acerca de la relevancia de los distintos componentes de la señalización de TGF- β .



Lic. Maria Cecilia Daroqui

Tesista



Dra. Lilia Lauria de Cidre

Directora de Tesis



Dra. Lydia Puricelli

Directora Asistente

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y., Matsumoto, K. p38 Mapk can be involved in TGF beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 19(3):2322-9, 1999.
- Adler, H.L., McCurdy, M.A., Kattan, M.W., Timme, T.L., Scardino, P.T., Thompson, T.C. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J. Urol.* 161(1):182-187, 1999.
- Aguirre Ghiso, J., Farías, E., Alonso, D., Bal de Kier Joffé, E. Secretion of urokinase and metalloproteinase-9 induced by staurosporine is dependent on a tyrosine kinase pathway in mammary tumor cells. *Int. J. Cancer* 76: 362-7, 1998.
- Aguirre-Guiso, J.A., Alonso, D.F., Farias, E.F., Gómez, D.E., Bal de Kier Joffé, E.D. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur. J. Biochem.*, 263:295-304, 1999.
- Akhurst, R.J., Derynck, R. TGF- β signaling in cancer – a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11:S44-S51, 2001.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., Kawabata, M. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J. Biol. Chem.* 274(49):35269-35277, 1999.
- Alonso, D.F., Farías, E.F., Bal de Kier Joffé, E. Impairment of fibrinolysis during the growth of two murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Lett.*, 70:181-187, 1993.
- Alonso, D.F., Gómez, D.E. *En: Introducción a la Oncología Molecular.* Universidad Nacional de Quilmes editores. Buenos Aires, Argentina. 1^{ra} Ed., 1998.
- Amann, K.J., Pollard, T.D. The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* 3:306-310, 2001.
- Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., Duffy, M.J. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72:1-22, 1997.
- Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 116:217-224, 2003.
- Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6024-6028, 1987.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., Gespach, C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in TGF beta-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 272(3):1429-32, 1997.
- Ayscough, K.R. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:102-111, 1998.
- Aznavoorian, S., Stracke, M.L., Kruttsch, H., et al. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J. Cell Biol.* 110:1427-1438, 1990.

Baillie, R., Coombes, R.C., Smith, J. Multiple forms of TGF- β 1 in breast tissues: a biologically active forms of the small latent complex of TGF- β 1. *Eur. J. Cancer* 32A(9):1566-1573, 1996.

Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L., Sacerdote de Lustig, E. Modified adhesion behaviour after *in vitro* passage of two related murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing ability. *Inv. Met.*, 6:302-312, 1986.

Bajou, K., Noel, A., Gerard, R.D., Masson, V., et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* 4:923-928, 1998.

Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., Arteaga, C.L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for TGF β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* 275(47):36803-10, 2000.

Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., Arteaga, C.L. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF β -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J. Cell Sci.* 115(15):3193-3206, 2002.

Barcellos-Hoff, M.H. Latency and activation in the regulation of TGF- β . *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 3:353-363, 1996.

Barcellos-Hoff, M.H., Ewan, K.B.R. Transforming growth factor- β and breast cancer mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2:92-99, 2000.

Barnard, J.A., Lyons, R.M., Moses, H.L. The cell biology of TGF- β . *Biochim. Biophys. Acta* 1032:79-87, 1990.

Barthelemy-Brichant, N., David, J.L., Bosquee, L., Bury, T., et al. Increased TGF β 1 plasma level in patients with lung cancer: potential mechanisms. *Eur. J. Clin. Invest.* 32(3):193-198, 2002.

Berardo, M.D., Allred, D.C., O'Connell, P. Breast Cancer. *In: Principles of Molecular Medicine.* Jameson, J.L. ed., pp 625-632. Humana Press, NJ, USA, 1998.

Bergers, G., Brakkens, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., et al.. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2:737-744, 2000.

Bergstraesser, L., Sherer, S., Panos, R., Weitzman, S. Stimulation and inhibition of human mammary epithelial cell duct morphogenesis *in vitro*. *Proc. Assoc. Am. Phys.* 108:140-154, 1996.

Birk, D.E., Siver, F.H., Trelstadt, R.L. Matrix assembly. *In: Cell Biology of Extracellular Matrix.* 2nd Ed, pp 221-254. NY Plenum Press Publishing Corp, 1991.

Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:728-735, 1995.

Blanchere, M., Saunier, E., Mestayer, C., Broshuis, M., Mowszowicz, I. Alterations of expression and regulation of transforming growth factor beta in human cancer prostate cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82(4-5):297-304, 2002.

Blasi, F., Vassali, J.D., Dano, K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptors and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104:801-804, 1987.

Blasi, F. Urokinase and urokinase receptor: A paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays*, 15:105-111, 1993.

Blasi, F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways. *Immunol. Today*, 18(9):415-417, 1997.

Boehm, J.R., Kutz, S.M., Sage, E.H., Staiano-Coico, L., Higgins, P.J. Growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression during epithelial cell stimulation by serum and transforming growth factor- β 1. *J. Cell. Physiol.* 181:96-106, 1999.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *J. Biol. Chem.*, 260:11389-11392, 1985.

Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C-H., Heuchel, R. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J. Biol. Chem.* 275(37):29023-29030, 2000.

Brown, P.D., Wakefield, L.M., Levinson, A.D., Sporn, M.B. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-betas 1, 2 and 3. *Growth Factors*, 3:35-43, 1990.

Chakravarthy, D., Green, A.R., Green, V.L., Kerin, M.J., Speirs, V. Expression and secretion of TGF-beta isoforms and expression of TGF-beta-receptors I, II and III in normal and neoplastic human breast. *Int. J. Oncol.* 15:187-194, 1999.

Chambers, A.F., Matrisian, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89(17):1260-1270, 1997.

Chang, L., Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40, 2001.

Chapman, H.A. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Op. Cell Biol.* 9:714-724, 1997.

Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L., Reiss, M. TGF- β type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 58:4805-4810, 1998.

Chen, T., Triplett, J., Dehner, B., Hurst, B., Colligan B., et al. TGF- β receptor type I gene is frequently mutated in ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 61:4679-4682, 2001.

Chen, C.R., Kang, Y., Siegel, P.M., Massagué, J. E2F4/5 and p107 as Smads cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* 110:19-32, 2002.

Chiao, P.J., Hunt, K.K., Grau, A.M., Abramian, A., et al. Tumor suppressor gene Smad4/DPC4, its downstream target genes, and regulation of cell cycle. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 880:31-37, 1999.

Choong, P.F., Nadesapillai, A.P. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin. Orthop.* 415 Suppl:S46-58, 2003.

Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9, 1987.

Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133:1403-1415, 1996.

Colombo, L., Bonaparte, Y., Klein, S., Stillitani D'Elia, Y. Selección *in vivo* de una línea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. *Medicina (Buenos Aires)* 40:827-828, 1980.

- Cory, G.O.C., Cramer, R., Blanchoin, A., Ridley, A. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol. Cell* 11:1229-1239, 2003.
- Cotran, R.S., Kumer, V., Robbins, S.L. La mama. *En: Patología Estructural y Funcional*. Cotran, R.S., Kumer, V., Robbins, S.L. Cap. 24. Schoen, F. ed., 5ta Ed., McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- Crawford, S.E., Stelmach, V., Murphy-Ullrich, J.E. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 *in vivo*. *Cell* 93:1159-1170, 1998.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364:229-233, 1995.
- Dalal, B.I., Keown, P.A., Greenberg, A.H. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143:381-389, 1993.
- Daniel, C.W., Silberstein, G.B. Postnatal development of the rodent mammary gland. *In: The Mammary Gland: Development, Regulation and Function*. Neville, M.C. and Daniel, D.W. ed., pp 3-36. NY Plenum Press Publishing Corp., 1987.
- Danielpour, D., Dart, L.L., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B. Immunodetection and quantitation of the two forms of TGF- β (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture. *J. Cell. Phys.*, 138:79-86, 1989.
- Davidson, B., Givant-Horwitz, V., Lazarovici, P., Risberg, B., et al. Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 20(7):621-631, 2003.
- Dayel, M.J., Holleran, E.A., Mullins, R.D. Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14871-14876, 2001.
- De, M., Yan, W., de Jonge, R.R., Garrigue-Antar, L., Vellucci, V.F., Reiss, M. Functional characterization of TGF- β type II receptor mutants in human cancer. *Cancer Res.* 58:1986-1992, 1998.
- de Jong, J.S., van Diest, P.J., van der Valk, P., et al. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J. Pathol.* 184:53-57, 1998.
- de Larco, J.E., Todaro, G.J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4001-4005, 1978.
- DeLean, A., Munson, P.J., Rodbard, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102, 1978.
- Delpech, B. Le stroma des cancer. *Bulletin Cancer* 78:869, 1991.

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., Gauthier, J-M. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17:3091-3100, 1998.

Derynck, R., Goeddel, D.V., Ullrich, A., Gutterman, J.U., et al. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.* 47:707-712, 1987.

Derynck, R., Feng, X.H. TGF- β receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333:F105-F150, 1997.

Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X.H. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95:737-740, 1998.

Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics* 29:117-129, 2001.

Derynck, R., Zhang, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584, 2003.

Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122:103-111, 1993.

Diament, M.J., García, C., Stillitani, I. Muñiz Saavedra, V., Manzur, T. Vauthay, L., Klein, S.M. Spontaneous murine lung adenocarcinoma PO7: a new experimental model to study paraneoplastic syndromes of lung cancer. *Int. J. Mol. Med.* 2:45-50, 1998.

Diament, M.J., García, C., Parma, M., Mondelo, N., Stillitani, I., Klein, S.M. Immune reactivity during the growth of a murine lung adenocarcinoma: evaluation of paraneoplastic syndrome development. *Oncol. Rep.* 8(5):1165-1170, 2001.

Donnini, S., Morbidelli, L., Taraboletti, G., Ziche, M. ERK1/2 and p38MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium. *Life Sci.* 74(24):2975-2985, 2004.

Duff, E.K., Clarke, A.R. Smad4 (DPC4) – a potent tumor supressor?. *Brit. J. Cancer* 78 (12):1615-1619, 1998.

Duggan, C., Maguire, T., McDermott, T., Ohiggins, N., Fennely, J.J., Duffy, M.J. uPA and uPAR in breast cancer. *Int. J. Cancer* 61:597-600, 1995.

Dumont, N., Arteaga, C.L. Transforming growth factor- β and breast cancer. Tumor promoting effects of transforming growth factor- β . *Breast Cancer Res.* 2:125-132, 2000.

Dumont, N., Bakin, A.V., Arteaga, C.L. Autocrine Transforming Growth Factor-beta Signaling Mediates Smad-independent Motility in Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 278(5): 3275-3285, 2003.

Egeblad, M., Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev.* 2:161-174, 2002.

Engbring, J.A., Kleinman, H.K. The basement membrane matrix in malignancy. *J. Pathol.* 200(4):465-470, 2003.

Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K., Moses, H.L. Interdependent SMAD and JNK signaling in TGF-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274(52):37413-20, 1999.

Farias, E., Ranuncolo, S.M., Cresta, C., et al. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int. J. Oncol.* 89:389-394, 2000.

Feng, X.H., Zhang, Y., Wu, R.Y., Derynck, R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for Smad3 in TGF- β -induced transcriptional activation. *Genes Dev.* 12:2153-2163, 1998.

Ferguson, C.M., Schwarz, E.M., Reynolds, P.R., Puzas, J.E., Rosier, R.M., O'Keefe, R.J. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* 141(12):4728-4735, 2000.

Fidler, I.J., Radinsky, R. Search for genes that suppress cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:1700-1703, 1996.

Foekens, J.A., Schmitt, M., vanPutten, W.L., Peters, H.A., et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* 52:6101-6105, 1992.

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *JNCI* 82:4-6, 1990.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113:173-185, 1991.

Fynan, T.M., Reiss, M. Resistance to inhibition of cell growth by TGF- β and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.* 4(5):493-540, 1993.

Garbisa, S., Scagliotti, G., Masiero, L., et al. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res.* 52:4548-4549, 1992.

Gomm, J.J., Smithe, J., Ryall, G.K., et al. Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β 1 in the human mammary gland. *Cancer Res.* 51:4685-4692, 1991.

Goodwin, L.O., Lees-Miller, J.P., Leonard, M.A., Cheley, S.B., Helfman, D.M. Four fibroblast tropomyosin isoforms are expressed from the rat alpha-tropomyosin gene via alternative RNA splicing and the use of two promoters. *J. Biol. Chem.* 266:8408-84015, 1991.

Gosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., Varga, J. Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* 19(31):3546-3555, 2000.

Grondahl-Hansen, J., Christensen, I., Rosenquist, C., Brunner, N., Mouridsen, H.T., Dano, K., Blichart-Toft, M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res.* 53:2513-2521, 1993.

Guerra, F., Eiján, A.M., Puricelli, L., Alonso, D., Bal de Kier Joffé, E., Kornblihtt, A., et al. Varying patterns of expression of insulin-like growth factors I and II and their receptors in murine adenocarcinomas of different metastasizing ability. *Int. J. Cancer* 65: 812-20, 1996.

Gum. R., Wang, H., Lengyel, E., Juarez, J., Boyd, D. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* 14:1481-1493, 1997.

Guo, Y., Jacobs, S.C., Kyprianou, N. Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor- β (TGF- β 1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int. J. Cancer* 71:573-579, 1997.

Hagedorn, H.G., Bachmeier, B.E., Nerlich, A.G. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas. *Int. J. Oncol.* 18(4):669-681, 2001.

Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluck, C.A., da Costa, L.T., et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-353, 1996.

Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., Kalluri, R. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 3(6):589-601, 2003.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.

Hartsough, M.T., Mulder, K.M. Transforming Growth Factor beta Activation of p44MAPK in Proliferating Cultures of Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 7117-7124, 1995.

Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., Tsushima, T., Imai, T., Okumura, K. TGF- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 91(5):964-971, 2001.

Hay, E.D. Cell Biology of extracellular matrix. Hay, E.D. ed., 2da Ed. Plenum, 1991.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell* 89:1165-1173, 1997.

Hearing, V.J., Law, L.W., Corti, A., et al. Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase in murine melanoma cells. *Cancer Res.* 48:1270-1278, 1988.

Hedges, J.C., Dechert, M.A., Yamboliev, I.A., Martin, J.L., et al. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J. Biol. Chem.* 274:24211-24219, 1999.

Heldin, C-H., Miyazono K., ten Dijke, P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659):465-71, 1997.

Higaki, M., Shimokado, K. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for growth factor-induced amino acid uptake by vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2127-32, 1999.

Hirohashi, S., Kanai, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 94(7):575-581, 2003.

Houle, F., Rousseau, S., Morrice, N., Luc, M., Mongrain, S., Turner, C.E., Tanaka, S., Moreau, P., Huot, J. Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress: impact on membrane blebbing. *Mol. Biol. Cell* 14(4):1418-1432, 2003.

- Hua, X., Miller, Z.A., Wu, G., Shi, Y., Lodish, H.F. Specificity in TGF β -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor μ E3 and Smad proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13130-13135, 1999.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., Landry, J. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 143:1361-1373, 1998.
- Inge, T.H., Hoover, S.K., Susskind, B.M., Barrett, S.K., Bear, H.D. Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor β 1. *Cancer Res.* 52:1386-1392, 1992.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshida, T., Nishimoto, H., Itohara, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase-A deficient mice. *Cancer Res.* 58:1048-1051, 1998.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268:1517-1520, 1993.
- Jakowlew, S.B., Mathias, A., Chung, P., Moddy, T.W. Expression of transforming growth factor β ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cell lines. *Cell Growth Differ.* 6:465-476, 1995.
- Jakowlew, S.B., Mariano, J.M., You, L. Effects of transforming growth factor-beta1 and phorbol ester on PAI-1 and PA genes in human lung cells. *Growth Factors* 14(2-3):177-197, 1997.
- Jakowlew, S.B., Moody, T.W., You, L., Mariano, J.M. Transforming growth factor-beta expression in mouse lung carcinogenesis. *Exp. Lung Res.* 24(4):579-593, 1998.
- Janda, E., Lehman, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., et al. Ras and cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* 156:299-313, 2002.
- Jang, C.W., Chen, C.H., Chen, C.C., Chen, J.Y., et al. TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4:51-58, 2002.
- Jänkun, J., Maher, V.M., Mc Cormick, J.J. Malignant transformation of human fibroblast correlates with increased activity of receptor-bound plasminogen activator. *Cancer Res.*, 51:1221-1226, 1991.
- Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V., Grenman, R., et al. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Sci.* 113:227-235, 2000.
- Joseph, H., Gorska, A.E., Sohn, P., Moses, H.L., Serra, R. Overexpression of a kinase-deficient transforming growth factor- β type II receptor in mouse mammary stroma results in increased epithelial branching. *Mol. Biol. Cell* 10:1221-1234, 1999.
- Kallapur, S., Ormsby, I., Doetschman, T. Strain dependency of TGF- β 1 function during embryogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 52:341-349, 1999.

Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., Miyazono, K. Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-olimerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.* 17:4056-4065, 1998.

Katakura, Y., Nakata, E., Tabira, Y., Miura, T., et al. Decreased tumorigenicity in vivo when transforming growth factor beta treatment causes cancer cell senescence. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(4):815-821, 2002.

Kelly, D.L., Rizzino, A. Growth regulatory factors and carcinogenesis: the roles played by transforming growth factor beta, its receptors and signaling pathways. *Anticancer Res.* 19(6A):4791-4807, 1999.

Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163:1037-1050, 1986.

Khalil, N. Post-translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications. *Histol. Histopathol.* 16(2):541-551, 2001.

Kim, S-J., Jeang, K-T., Glick, A., Sporn, M., Roberts, A. Promoter sequences of the human transforming growth factor- β 1 autoinduction. *J. Biol. Chem.* 264:7041-7045, 1989a.

Kim, S-J., Dennhez, F., Kim, K-Y., Holt, J., Sporn, M., Roberts, A. Activation of the second promoter of the TGF β 1 gene by TGF β 1 and phorbol esters occurs through the same target sequence. *J. Biol. Chem.* 264:19373-19378, 1989b.

Kim, S-J., Park, K., Koeller, D., Kim, K.Y., Wakefield, L.M., Sporn, M.B., Roberts, A.B. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J. Biol. Chem.* 267(19):13702-13707, 1992.

Kim, S-J., Romeo, D., et al. Transforming growth factor-beta: expression in normal and pathological conditions. *Horm. Res.* 42(1-2):5-8, 1994.

Kim, S-J., Im, Y.H., Markowitz, S.D., Bang, Y.J. Molecular mechanisms of inactivation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:159-168, 2000.

Kim, M-S., Lee, E-J., Kim, H-R.C., Moon, A. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63:5454-5461, 2003.

Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 137:481-492, 1997.

Kobayashi Fijishiro, D., Terao, T. Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 54:6539-6548, 1994.

Kobzik, L., Schoen, F. Pulmón. *En: Patología Estructural y Funcional.* Cotran, R.S., Kumer, V., Robbins, S.L. Cap. 15. Schoen, F. ed., 5^{ta} Ed., McGraw-Hill Interamericana, 1998.

Kohn, E.C., Liotta, L.A. Molecular insight into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res.* 55:1856, 1995.

Koshelnick, Y., Ehart, M., Stockinger, H., Binder, B.R. Mechanisms of signaling through urokinase receptor and the cellular response. *Thromb. Haemostas.* 81:594-600, 1999.

Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:770-774, 1993.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 277:680-685, 1970.

Lafyatis, R., Leichleider, R., Roberts, A.B., Sporn, M.B. Secretion and transcriptional regulation of transforming growth factor-beta3 during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11(7):3795-3803, 1991.

Laiho, M., Keski-Oja, J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res.* 49:2533-2553, 1989.

Lauffenburger, D., Horwitz, A. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369, 1996.

Lee, J., Ishihara, A., Theriot, J., Jacobson, K. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature* 362:167-171, 1993.

Lee, M.S., Ko, S.G., Kim, H.P., Kim, Y.B., Lee, S.Y., et al. Smad2 mediates ERK1/2 activation by TGF-beta1 in suspended, but not in adherent, gastric carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 24(5):1229-1234, 2004.

Leivonen, S.K., Chantry, A., Hakkinen, L., Han, J., Kahari, V.M. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase 3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for crosstalk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277(48):46338-46346, 2002.

Letterio, J.J., Roberts, A.B. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* 16:137-161, 1998.

Lin, Y.C., Stavnezer, J. Regulation of transcription of the germline Ig κ constant region gene by an ATF element and by novel TGF- β 1-responsive elements. *J. Immunol.* 149:2914-2925, 1992.

Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-336, 1991.

Liu, X., Sun, Y., Constantinescu, S.N., Karam, E., Weinberg, R.A., Lodish, H.F. TGF- β -induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10669-10674, 1997.

Liu, J., Tseu, I., Wang, J., Tanswell, K., Rost, M. Transforming growth factor beta2, but not beta1 or beta3, is critical for early rat lung branching. *Dev. Dyn.* 217(4):345-360, 2000.

Lo, R.S., Massagué, J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nat. Cell Biol.* 1:472-478, 1999.

Lucke-Huhle, C. Permissivity for methotrexate-induced DHFR gene amplification correlates with the metastatic potential of rat adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 15(4):695-700, 1994.

Lund, L.R., Romer, J., Ronne, E., Ellis, V., Blasi, F., Dano, K. Urokinase-receptor biosynthesis, mRNA level and gene transcription are increased by transforming growth factor beta 1 in human A549 lung carcinoma cells. *EMBO J.* 10(11):3399-3407, 1991.

Mac Dougall, J.R., Matrisian, L.M. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinase to tumor progression, invasion, and metastasis. *Cancer Met. Rev.* 14:351-362, 1995.

Maesawa, C., Tamura, G., Nishizuka, S., Iwaya, T., Ogasawara, S., et al. MAD-related genes on 18q21.1, Smad2 and Smad4, are altered infrequently in esophageal squamous cell carcinoma. *Jnp. J. Cancer Res.* 88:340-343, 1997.

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336-1338, 1995.

Martin-Blanco, E. P38MAPK signaling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22(7): 637-645, 2000.

Massagué, J. The TGF- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:597-641, 1990.

Massagué, J. TGF signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014, 1992.

Massagué, J., Attisano, L., Wrana, J.L. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* 4: 172-178, 1994.

Massagué, J. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791, 1998.

Massagué, J., Wotton, D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745-1754, 2000a.

Massagué, J., Blain, S.W., Lo, R.S. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309, 2000b.

Massova, I., Kotra, L.P., Fridamn, R., Mobashery, S. et al. Matriz metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J.* 12:1075-1095, 1998.

Matrisian, L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genetics* 6:121, 1990.

Matsumoto, T., Yokote, K., Tamura, K., Takemoto, M., et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J. Biol. Chem.* 274:13954-13960, 1999.

Mazar, A.P., Henkin, J., Goldfarb, R.H. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis*, 3:15-32, 1999.

McCaffrey, T.A., Falcone, D.J. Evidence for an age-related dysfunction in the antiproliferative response to transforming growth factor- β in vascular smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 4:315-322, 1993.

Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R., Derynck, R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* 127 (6):2021-2036, 1994.

- Mignatti, P., Rifkin, D.B. Plasminogen activators and angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213:33-50, 1996.
- Miguez, M., Davel, L., Sacerdote de Lustig, E.S. Lymphocyte- induced angiogenesis: Correlation with the metastatic incidence of two murine mammary adenocarcinomas. *Inv. Met.* 6:313, 1986.
- Minden, A., Karin, M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim. Biophys. Acta* F85-F104, 1997.
- Miyazono, K., Yuki, K., Takaku, F., Wernstedt, C., Kanzaki, T., Heldin, C-H. Latent forms of TGF- β : structure and biology. *Ann. New York Acad. Sci.* 593:51-58, 1990.
- Miyazono, K., Ichijo, H., Heldin, C-H. Transforming growth factor- β : latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 8:11-22, 1993.
- Miyazono, K., ten Dijke, P., Heldin, C-H. TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 75:115-157, 2000.
- Miyazono, K., Suzuki, H., Imamura, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* 94(3):230-234, 2003.
- Moller, L.B. Structure and function of the uPAR. *Blood Coag. Fibr.* 4:293-303, 1993.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergman, U., et al. Structure of human pro-MMP-2: activation mechanism revealed. *Science* 284:1667-1669, 1999.
- Morton, D.M., Barrack, E.R. Modulation of transforming growth factor β 1 effects on prostate cancer cell proliferation by growth factors and extracellular matrix. *Cancer Res.*, 55:2596-2602, 1995.
- Moses, H.L., Yang, E.Y., Pieterpol, J.A. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell* 63: 245-247, 1990.
- Mucsi, I., Skorecki, K.L., Goldberg, H.J. ERK and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of TGF-beta1 on gene expression. *J. Biol. Chem.* 271(28):16567-72, 1996.
- Mulder, K.M., Morris, S.L. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 267:5029-5031, 1992.
- Mulder, K.M. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11(1-2):23-35, 2000.
- Mundy, G.R., Guise, T.A. Hypercalcemia of malignancy. *Am. J. Med.* 103:134-145, 1997.
- Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., et al. Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J. Clin. Invest.* 109(12):1551-1559, 2002.
- Murphy, G., Atkinson, S., Ward, R., Gavrilovic, J., Reynolds, J.J. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann. NY Acad. Sci.* 667:1-12, 1992.
- Nagase, H. Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378:151-160, 1997.

Nagase, H., Woessner, J.R. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274(31):21491-21494, 1999.

Nakajima, M., Morikawa, K., Fabra, A., et al. Influence of organ microenvironment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *JNCI* 82:1890-1898, 1990.

Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., et al. Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 389:631-635, 1997.

Natanson, L., Hall, T. Paraneoplastic syndromes. *Semin. Oncol.* 24:265-268, 1997.

Nelson, A.R., Fingleton, B., Rothenberg, M.L., Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 18:1135-1149, 2000.

Nemis, M., Bhattacharyya, D., Li, X., Singh, K., et al. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J. Biol. Chem.* 275(2):969-976, 2000.

Nicolson, G.L., Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim. Biophys. Acta* 948:175-224, 1998.

Norgaard, P., Dampstrup, L., Rygaard, K., Spang-Thomsen, M., Skovgaard Poulsen, H. Growth suppression by transforming growth factor- β 1 of human small cell lung cancer cell lines is associated with expression of the type II receptor. *Br. J. Cancer* 69:802-808, 1994.

Norgaard, P., Hougaard, S., Skovgaard Poulsen, H., Spang-Thomsen, M. Transforming growth factor beta and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 21: 367-403, 1995.

Norgaard, P., Spang-Thomsen, M., Poulsen, H.S. Expression and autoregulation of transforming growth factor beta receptor mRNA in small-cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 73(9):1037-1043, 1996.

Oberst, M.D., Lin, C-H., Dickson, R.B., Johnson, M.D. Roles of proteases in breast cancer. *J. Women's Cancer* 2(4):201-216, 2000.

Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., Reichmann, E. TGF- β 1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* 10:2462-2477, 1996.

Oft, M., Heider, K-H., Beug, H. TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.*, 8:1243-1252, 1998.

Ossowski, L.. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell-surface bound urokinase. *J. Cell Biol.* 107:2435-2437, 1988.

Park, C.C., Bissell, M.J., Barcellos-Hoff, M.H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Molec. Med. Today*, 6:324-329, 2000a.

Park, B.J., Park, J.I., Byun, D.S., Park, J.H., Chi, S.G. Mitogenic conversion of TGF- β 1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer. *Cancer Res.* 60:3031-3038, 2000b.

Parma, M., Diament, M., Garcla, C., Piccinni, E., Mondelo, N., Klein, S. Mechanisms of paraneoplastic syndromes in mice bearing a spontaneous lung adenocarcinoma. *Tumor Biol.* 20:304-311, 1999.

Pawlak, G., Helfman, D.M. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:41-47, 2001.

Pedersen, H., G-Hansen, J., Francis, D., Osterlind, K., Hansen, H.H., Dano, K., Brunner, N. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 54:120-123, 1994.

Peluffo, G.D., Stillitani, I., Rodríguez, V.A., Diament, M.J., Klein, S.M. Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int. J. Cancer* 2004, en prensa.

Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpara, A., et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to TGF- β in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269:6271-6274, 1994.

Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C-H., ten Dijke, P. TGF- β type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112(15):4557-68, 1999.

Piek, E., Ju, W.J., Heyer, J., Escalante-Alcalde, D., Stewart, C.L., et al. Functional characterization of transforming growth factor β signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276:19945-19953, 2001.

Pittman R. Release of plasminogen activator and calcium dependent metalloprotease from cultured symphatic and sensor neurons. *Dev. Biol.* 110:91-101, 1985.

Portella, G., Cumming, S.A., Liddell, J., Cui, W., Ireland, H., Akhurst, R.J., Balmain, A. TGF- β is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: Implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.* 9:393-404, 1998.

Poste, G., Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283:139-146, 1980.

Preissner, K.T., Kanse, S.M., May, A.E. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr. Op. Cell Biol.* 12:621-628, 2000.

Price, J.T., Bonovich, M.T., Kohn, E.C. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32:175-253, 1997.

Rahimi, N., Tremblay, E., McAdam, L., Roberts, A., Elliott, B. Autocrine secretion of TGF-beta1 and TGF-beta2 by pre-adipocytes and adipocytes: a potent negative regulator of adipocyte differentiation and proliferation of mammary carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34:412-420, 1998.

Ramont, L., Pasco, L., Hornebeck, W., Maquart, F.X., Monboisse, J.C. TGF- β 1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system. *Exp. Cell Res.* 291(1):1-10, 2003.

Ranuncolo, S.M., Matos, E., Loria, D., Vilensky, M., Rojo, R., Bal de Kier Joffé, E.D., Puricelli, L.I. Circulating 92-Kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin fraction of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 94(5):1483-1491, 2002.

Ravanti, L., Toriseva, M., Penttinen, R., Crombleholme, T., et al. Expression of human collagenase-3 (MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *FASEB J.* 15(6):1098-1100, 2001.

Riggins, G.J. Frequency of Smad gene mutation in human cancers. *J. Nat. Cancer Inst.* 89 (17):1260-1268 1997.

Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., et al. Transforming growth factor type beta: a rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4167-4171, 1986.

Roberts, A.B., Sporn, M.B. The transforming growth factor beta. *In: Peptide Growth Factors and their Receptors, part I.* Ed. M.B. Sporn and A.B. Roberts, pp. 419-472. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

Robinson, S.D., Silberstein, G.B., Roberts, A.B., Flanders, K.C., Daniel, C.D. Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor- β isoforms in mouse mammary gland development. *Development* 113:867-878, 1991.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., et al. The interactions between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231, 1999.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Han, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15:2169-2177, 1997.

Saha, D., Datta, P.K., Beauchamp, R.D. Oncogenic ras represses transforming growth factor- β /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J. Biol. Chem.* 276:29531-29537, 2001.

Sargent, E.R., Gomella, L.G., Wade, T.P., Ewing, M.K., Kasid, A., Linehan, W.M. Expression of mRNA for transforming growth factors-alpha and -beta and secretion of transforming growth factor-beta by renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Commun.* 1:317-322, 1989.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.

Seeger, R., Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9:726-735, 1995.

Sehgal, I., Baley, P.A., Thompson, T.C. Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines *in vitro*. *Cancer Res.* 56:3359-3365, 1996.

Sellers, J.R., Pato, M.D. MLC and tropomyosin - The binding of smooth muscle myosin light chain kinase and phosphatases to actin and myosin. *J. Biol. Chem.* 259(12):7740-7746, 1984.

Selvamurugan, N., Fung, Z., Partridge, N.C. Transcriptional activation of collagenase-3 by transforming growth factor-beta1 is via MAPK and Smad pathways in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 532(1-2):31-35, 2002.

Sethi, G., Sodhi, A. Role of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UV-B-induced apoptosis of murine peritoneal macrophages. *Photochem. Photobiol.* 79(1):48-54, 2004.

Shain, K.H., Landowski, T.H., Dalton, W.S. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: A possible mechanism for *de novo* drug resistance. *Curr. Op. Oncol.*, 12:557-563, 2000.

Sheng, H., Shao, J., Hooton, E.B., Tsujii, M., Dubois, R.N., Beauchamp, R.D. Cyclooxygenase-2 induction and transforming growth factor beta growth inhibition in rat intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 8:463-470, 1997.

Sherbet, G.V., Lakshmi M.S. Proteinases and their inhibitors in cancer invasion. *In: The Genetics of Cancer - Genes associated with cancer invasion, metastasis and cell proliferation*, pp.123-143. London, UK: Academic Press, 1997.

Shin, I., Bakin, A.V., Rodeck, U., Brunet, A., Arteaga, C.L. Transforming growth factor β enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol. Biol. Cell* 12:3328-3339, 2001.

Siegel, P.M., Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Rev.* 3:807-820, 2003.

Sier, C.F.M., Quax, P.H.A., Vlodgraven, H.J.M., Verheijen, J.H., et al. Increased urokinase receptor levels in human gastrointestinal neoplasia and related liver metastasis. *Invasion Metastasis* 13:277-288, 1994.

Simon, C., Simon, M., Vucelic, G., Hicks, M.J., Plinkert, P.K., Koitschev, A., Zenner, H.P. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp. Cell Res.* 271:344-355, 2001.

Soff, G.A., Sanderowitz, J., Gately, S., Verrusio, E. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J. Clin. Invest.* 96:2593-2600, 1995.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. *Biometry*. Ed. Freeman, W.H. and Company, New York, 1995.

Somara, S., Bitar, K.N. Tropomyosin interacts with phosphorylated HSP27 upon agonist induced contraction in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004 Jan 28

Soriano, J.V., Orci, L., Montesano, R. TGF- β 1 induces morphogenesis of branching cords by cloned mammary epithelial cells at subpicomolar concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:879-885, 1996.

Stampfer, M.R., Yaswen, P., Alhadeff, M., Hosoda, J. TGF- β induction of extracellular matrix associated proteins in normal and transformed human mammary epithelial cells in culture is independent of growth effects. *J. Cell. Physiol.* 155:210-221, 1993.

Steeg, P.S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U.P., Talmadge, J.E., Liotta, L.A., et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* 80:200-204, 1988.

Steeg, P.S. Metastasis suppressors alter signal transduction of cancer cells. *Nature Rev.* 3:55-63, 2003.

Steiner, M.S., Zhou, Z.Z., Tonb, D.C., Barrack, E.R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer. *Endocrinology* 135:2240-2247, 1994.

Sternlicht, M.D., Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:463-516, 2001.

Stetler-Stevenson, W.C., Aznavoorian, S., Liotta, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:541-573, 1993.

Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* 103(9):1237-1241, 1999.

Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, O., Gaestel, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313:307-313, 1992.

Stracke, M.L., Aznavoorian, S., Beckner, M., et al. Cell motility, a principal requirement for metastasis. *In: Goldberg, I.D., ed. Cell motility factors.* Basel, Verlag, 1991.

Stracke, M.L., Krutzsch, H.C., Unsworth, E.J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., Liotta, L.A. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* 267:2524-2529, 1992.

Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T., Takenawa, T. Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J. Cell Sci.* 114:4533-4542, 2001.

Tada, A., Kato, H., Hasegawa, S. Antagonistic effect of EGF against TGF beta1 on transformed phenotype and tropomyosin expression of human lung carcinoma A549 cells. *Oncol. Rep.* 7(6):1323-1326, 2000.

Takahashi, K., Susuki, K., Ono, T. Loss of growth inhibitory activity of TGF- β toward normal human mammary epithelial cells growth within collagen gel matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1239-1247, 1990.

Tang, B., Bottinger, E.P., Jakowlew, S.B., Bagnall, K.M., Mariano, J., et al. Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat. Med.* 4:802-807, 1998.

Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Weinberger, R.P., Schevzov, G., Helfman, D.M. Distinct localizations of tropomyosin isoforms in LLC-PK1 epithelial cells suggests specialized function at cell-cell adhesions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 40:393-407, 1998.

Tisdale, M.J. Biology of cachexia. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1763-1773, 1997.

Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L., Rowley, D.A. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1486-1490, 1990.

Tripathy, D., Benz, C. Growth factors and their receptors. *Hematol. Oncol. Clin. Norht Am.* 8(1):29-50, 1994.

Tryggvason, K. Type IV collagenase in invasive tumors. *Breast Cancer Res.* 24:209-218, 1993.

Tsushima, H., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Shira, Y., et al. High levels of transforming growth factor β 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology* 110:375-382, 1996.

Tsuchiya, H., Sunayama, C., Okada, G., Matsuda, E., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 accelerates lung metastasis formation of human fibrosarcoma cells. *Anticancer Res.* 17:313-316, 1997.

Tu, W.H., Thomas, T., Masunori, N., Bhowmick, N.A., Gorska, A.E., et al. Loss of TGF- β signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia* 5(3):267-277, 2003.

Urtreger, A.J., Ladeda, V.E., Puricelli, L.I., Rivelli, A., Vidal, M.C., Lustig, E.S., Bal de Kier Joffé, E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated to the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol.*, 11:489-496, 1997.

Urtreger, A.J., Diament, M.J., Ranuncolo, S.M., Vidal, M.C., Puricelli, L.I., Klein, S.M., Bal de Kier Joffé, E.D. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int. J. Oncology* 18 (3):639-647, 2001.

Veale, D., Needham, G., Harris, A.L. Urokinase receptors in lung cancer and normal lung. *Anticancer Res.* 10:417-422, 1990.

Wakefield, L.M., Yang, Y., Dukhanina, O. Transforming growth factor- β and breast cancer: lessons learned from genetically altered mouse models. *Breast Cancer Res.* 2(2):100-106, 2000.

Wakefield, L.M., Roberts, A.B. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:22-29, 2002.

Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D., et al. Regulations of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273:1551-1555, 1996.

Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl. J. Med.* 324:1-8, 1991.

Weinstat-Saslow, D., Steeg, P. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J.* 8:401-407, 1994.

Weintraub, S.J. Lung Cancer. The Role of Tumor Suppressor Genes. *In: Principles of Molecular Medicine.* Jameson, J.L. ed., pp 357-361. Humana Press, NJ, USA, 1998.

Werb, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91:439-442, 1997.

Whitmarsh, A.J., Davis, J.R. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23:481-485, 1998.

Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., Massagué, J. TGF signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014, 1992.

Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., et al. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- β signaling. *Mol. Cell* 8:1277-1289, 2001.

Xu, J., Rodriguez, D., Petitclerc, E., Kim, J.J., Hangain, M., et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Cell Biol.* 154:1069-1080, 2001.

Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science* 270(5244):2008-11, 1995.

Yanagisawa, K., Uchida, K., Nagatake, M., Masuda, A., Sugiyama, M., et al. Heterogeneities in the biological and biochemical functions of Smad2 and Smad4 mutants naturally occurring in human lung cancers. *Oncogene* 19(19):2305-2311, 2000.

Yang, E.Y., Moses, H.L. Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell Biol.* 111:731-741, 1990.

Yang, X., Welch, D.R., Phillips, K.K., Weissman, B.E., Wei, L.L. KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett.* 119:149-155, 1997.

Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G.R., Guise, T.A. TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103:197-206, 1999.

Yu, H., Schultz, R.M. Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.* 50:7623-7633, 1990.

Yu, Q., Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14:163-176, 2000.

Yue, J., Mulder, K.M. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor β for transforming growth factor β 1 production in a Smad-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 275:30765-30773, 2000.

Yurchenko, P.D., Schitnny, J.C. Molecular architecture of basement membrane. *FASEB J.* 4:1577-1590, 1990.

Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., et al. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* 1:611-617, 1998.

Zetter, B.R. *Seminars in Cancer Biology* 4:219-229, 1993.

Zhang, F., Laiho, M. On and off: proteasome and TGF- β signaling. *Exp. Cell Res.* 291:275-281, 2003.

Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R. Regulation of Smad degradation and activity by Smuf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(3):974-979, 2001.

Zhao, J., Lee, M., Smith, S., Warberton, D. Abrogation of Smad3 and Smad2 or of Smad4 gene expression positively regulates murine embryonic lung branching morphogenesis in culture. *Dev. Biol.* 194(2):182-195, 1998.

Zimmerman, C.M., Padgett, R.W. TGF- β signaling mediators and modulators. *Gene* 249:17-30, 2000.

Zoller, M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J. Mol. Med.* 73(9):425-438, 1995.

Zucker, S., Lysik, R.M., Zarrabi, H.M., et al. Mr 92000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon and breast cancer. *Cancer Res.* 53:140-146, 1993.

AGRADECIMIENTOS

Creo que el primer agradecimiento lo merecen la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé y la Dra. Lydia Puricelli, por brindarme la oportunidad de conocer la ciencia y por enseñarme la más importante herramienta para hacer ciencia, el criterio. Además y no menos importante, gracias porque a lo largo de estos años han contribuido en mi desarrollo profesional y también personal. Y también gracias por el cariño que han generado en mí dos jefas/mamás.

Un gracias muy especial a la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, quien continúa siendo un ejemplo para todos los que tenemos el honor de conocerla. Ninguna otra persona se le asemeja en el amor por lo que hace y en transmitirlo con tanta serenidad y humildad, como sólo pueden hacerlo aquellas personas sabias.

Otra persona que no puedo olvidar, si bien ahora creo que su principal tarea es ser abuela, es a la Dra. Elena Matos, por sus palabras exactas en el momento adecuado y por su ternura maternal. Por estar siempre ahí cuando necesité escuchar una palabra de aliento.

A la Dra. Lilia Lauría, un reconocimiento especial por haberme aceptado bajo su ala y haberse convertido en mi Directora de Tesis.

Un gracias especial a mi amigo el Dr. Lucas Colombo, simplemente por ser una gran persona. Rescato algo de cada una de nuestras charlas!

Aunque desde que comencé a trabajar en el Instituto Roffo hasta el momento se ha ido renovando mucho tanto el "Becariato" como el Área en general, le agradezco en primer lugar a tres personas que se destacan, al Dr. Alejandro Urtreger, al Lic. Alejandro Adam y al Lic. Nicolás Zengarini, por las discusiones, científicas y de las otras, y por el humor. Y en un principio, ahora trabajando afuera, a los Dres. Esteban Mazzoni, Eduardo Farías y Julio Aguirre Ghiso. También al Lic. Martín Krasnapolski, por su gran sentido de ayudar al otro. Y a Bibiana Iglesias, por ayudarnos contra el tiempo. También a la Lic. María José Velloso, a la Lic. Giselle Peters, a la Lic. Laura Mauro, a la Lic. Laura Todaro, a la Lic. Valeria Grossoni, a la Dra. Gabriela Magenta y a la Dra. Marina Simian.

Muchas gracias al Lic. Guillermo Peluffo y a la Lic. Vanina Rodríguez, porque además de la buena onda, sin ellos no hubiera podido hacer mis experimentos en animales.

Un gracias colectivo pero no menos importante a la Dra. Maria Adela Jasnís, a la Dra. Dora Loria, a la Dra. Marta Vilensky, a la Dra. María Elena Sales, a la Dra. Ana María Eijan, a la Dra. Lilia Lauría, a la Dra. Liliana Vauthay, a la Dra. Miriam Diamant, al Dr. Eduardo Sandes y al Dr. Gabriel Fiszman, quienes, además de cruzarnos en el pasillo diariamente, siempre han aportado de alguna manera su cuota de ayuda y humor a mis días.

Gracias a Alicia Rivelli, Gloria Solarz y Catalina Sasko, por estar siempre dispuestas a ayudarme con las células, y a Mirta Carnero. Gracias también a Fernanda Roca, por el tiempo que dedicó a ayudarme con los preparados con su pancita de por medio.

En mis comienzos y hasta la fecha, recibí la ayuda y la amistad de muchas personas del Ibyme. Gracias a la Lic. Romina Carnevale, a la Lic. Mariana Salatino, a la Lic. Cecilia Proietti, a la Dra. Roxana Schillaci y a la Dra. Patricia Elizalde. Y un gracias especial al Dr. Guillermo Lanuza, por transmitirme su amor por la ciencia.

Gracias a la Fundación Bunge y Born, por otorgarme una beca para hacer una pasantía en Estados Unidos, que me permitió seguir avanzando, en el camino de la ciencia y en el de la vida.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Andrei Bakin, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, en Roswell Park Cancer Institute; por su paciencia para discutir de ciencia, por la libertad que me brindó para trabajar y por todo su apoyo como mi jefe en Buffalo.

Y a mis amigos en Buffalo. Especialmente a la Lic. Gaia Bistulfi, a la Lic. Silvia Pozzi, a la Lic. Giulia Somenzi, al Dr. Makoto Kimura, al Lic. Mukund Seshadri y a la Lic. Julie Platt, por brindarme su amistad de inmediato y hacerme sentir como en casa.

Un gracias súper especial a mis amigos de toda la vida, el casi Dr. Guillermo Basílico y el casi Dr. Mauricio Carobene, ellos saben por qué. Y a mi amiga Laura Trujillo. Los adoro!

Y desde hace unos años, a mis amigos los esquineros, Natalia Méndez, Cecilia Russo, Gustavo Bialostocki, Ana Martínez Lignelli, Luis Campos, Maxi Cirou, Echi Kosiner Blanco, Paula Vincent y Abel Guelman. Por el amor por la música, que nos convocó tantas veces en alguna esquina de Buenos Aires. Por el cariño. Por el apoyo en esos momentos...mesa para di

Un reiterativo gracias a mi familia. Mi papá, mi mamá, mis dos hermanas Laura y Patricia, Javier mi único hermano varón, mi tía Mary, mi prima Fernanda, mi cuñado Claudio y a mi pequeño amor, Joaquín, mi primer sobrino y el primer nieto de la familia.

To my love. I never expected this to happen to me. You are my everyday shine. Special thanks to you for your positive view of everything, always, for your patience and your support.

ABREVIATURAS

Alk5: "activin receptor-like kinase 5". Es el T β RI en humanos.

ANOVA: análisis de la varianza estadística.

Arp2/3: complejo de asociación a actina.

BB-94: inhibidor farmacológico de MMPs.

CAGA/Caja CAGA: secuencia de unión a Smads en diversos promotores génicos.

CAS: "cell analysis system".

CDK/CDI: "cyclin-dependent kinase/inhibitor". Moléculas reguladoras del ciclo celular.

cpm: cuentas por minuto.

DE/DT/DI/DC: dominios extracelular, transmembrana, intracelular y catalítico de un GF-R.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dnT β R: forma dominante negativa de un T β R. Es funcionalmente inactiva.

DO: densidad óptica.

ECL: "enhanced chemiluminescence". Método de revelado de Western blot.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EGFP: "enhanced green fluorescent protein".

GF: factor de crecimiento.

GF-R: receptor de factor de crecimiento.

HRP: "horseradish peroxidase".

HSP27: molécula relacionada con la actina.

IGF: factor de crecimiento tipo insulínico.

kDa: kilodalton.

LC: lisado celular.

LM3 y LMM3: líneas celulares derivadas de las células M3 y MM3, respectivamente. Son altamente invasivas y metastásicas.

LM3/5KR: línea LM3 transfectada en forma estable con dnT β RI.

LM3/BMN: línea LM3 transfectada en forma estable con el vector control BMN.

LM3/K277R: línea LM3 transfectada en forma estable con dnT β RII.

LP07: línea celular derivada del tumor P07, altamente metastásica.

LTBP: "latent TGF- β -binding protein".

LY294002: inhibidor farmacológico de la vía PI3K-Akt.

M3 y MM3: tumores/cultivos primarios de adenocarcinoma mamario murino, de baja y alta capacidad metastásica, respectivamente.

MAPK: "mitogen-activated protein kinase". Gran familia de proteínas de transducción de señales intracelulares.

MB: membrana basal.

mb-uPA: uPA asociado a membrana.

MC: medio condicionado.

MCL2: molécula relacionada con la actina.

MEC: matriz extracelular.

MEK/ERK: vía de señalización dentro de las MAPK.

MEM, D-MEM: medios de cultivo.

MMP: metaloproteinasa.

MT-MMP: metaloproteinasa asociada a membrana.

MvLu: línea celular no-tumorigénica de células epiteliales de pulmón de visón.

MW: marcador de peso molecular.

NMuMG: línea celular no-tumorigénica de células epiteliales mamarias murinas.

NSCLC: "non-small cell lung cancer". Tumor de pulmón a células no pequeñas, en humanos.

P07: adenocarcinoma de pulmón murino, altamente metastásico.

p38Mapk: vía de señalización dentro de las MAPK.

PAI/PAI-1/PAI-2: inhibidor de uPA.

pCAGA/3TP/FN/GCLC-lux: plásmidos reporteros de actividad luciferasa.

PI3K-Akt: "phosphatidylinositol 3-kinase". Vía de señalización.

RNA/mRNA: ácido ribonucleico/mensajero.

RT-PCR: "reverse transcriptase-polymerase chain reaction". Técnica.

SB202190: inhibidor farmacológico de la vía p38Mapk.

SCLC: "small cell lung cancer". Tumor de pulmón a células pequeñas, en humanos.

SFB: suero fetal bovino.

Smad: proteínas/vía de señalización. Tres grupos: R-Smads (reguladas por receptor); Co-Smads (comunes a diversos componentes de la superfamilia TGF- β); e I-Smads (inhibitorias).

TdH³: timidina tritiada.

TEM: transición epitelio-mesenquimática.

TF: factor de transcripción.

TGF- β : factor de crecimiento transformante tipo beta. En Mamíferos, tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3.

TGF- α : factor de crecimiento transformante tipo alfa.

TIMP: inhibidor de metaloproteinasas.

TM: tropomiosina.

tPA: activador del plasminógeno tipo tisular.

TRITC/FITC: cromógenos de emisión roja y verde, respectivamente.

T β R: receptor de TGF- β . Son T β RI, T β RII (receptores de señalización) y T β RIII.

U0126: inhibidor farmacológico de MEK1/2.

UA: unidades arbitrarias.

UI: unidades internacionales.

uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.