

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**INFLUENCIA DE COMPONENTES DE LA
MATRIZ EXTRACELULAR EN EL
COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS BCS-TC2
DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO:
ESTUDIOS “IN VITRO” E “IN VIVO”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa López Conejo

Bajo la dirección de las doctoras

María Antonia Lizarbe Iracheta

Nieves Olmo López

Madrid, 1997

ISBN: 84-669-2866-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



**INFLUENCIA DE COMPONENTES DE LA
MATRIZ EXTRACELULAR EN EL
COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS
BCS-TC2 DE ADENOCARCINOMA DE COLON
HUMANO. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO***



* 5 3 0 9 8 2 5 0 1 6 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

DIRECTORAS: Dra. M^a ANTONIA LIZARBE IRACHETA
Dra. NIEVES OLMO LOPEZ

M^a A. Lizarbe
Nieves Olmo

TESIS DOCTORAL REALIZADA POR

M^a TERESA LÓPEZ CONEJO

MADRID, 1997

La presente investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección de las Dras. M^a Antonia Lizarbe Iracheta y Nieves Olmo López. A ellas quiero agradecerles los conocimientos y orientaciones recibidos durante la realización de este trabajo. También doy las gracias al Dr. José G. Gavilanes Franco por haberme dado la oportunidad de incorporarme a este Departamento.

Al Dr. Javier Turnay le agradezco su inestimable ayuda y su permanente buen humor. A María, sus charlas a media mañana y, sobre todo, su amistad. A Isabel, a Olguita y al resto de componentes del laboratorio el cariño y el apoyo que siempre me han demostrado.

Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Angeles Fabra, al Dr. Javier Benítez por su ayuda en los estudios de metaloproteinasas e inestabilidad genética. Al personal del Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal y del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense, los medios prestados para la elaboración e interpretación de los estudios realizados.

A mis padres

A Florián

A Conchi

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.1. Carcinogénesis, invasión tisular y metástasis tumoral	1
1.2. Tipos y composición de la matriz extracelular	5
1.2.1. Colágenos	6
1.2.2. Proteoglicanos	10
1.2.3. Glicoproteínas no colagenosas	11
Lamininas	
Fibronectinas	
1.3. Matriz extracelular y progresión tumoral	21
1.4. Degradación de la matriz extracelular	21
1.5. Receptores de adhesión celular	26
1.5.1 Integrinas	28
1.6. El cáncer de colon	34
Alteraciones somáticas en oncogenes	
Pérdida de alelos y genes supresores de tumores	
Inestabilidad genética	

OBJETIVOS	42
---------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Proteínas de la matriz extracelular	44
2.1.1. Aislamiento y purificación de colágeno de tipo I	44
2.1.2. Aislamiento y purificación de los colágenos de tipo IV y V	45
2.1.3. Aislamiento y purificación de laminina y de los fragmentos E ₁₋₄ y E ₈	46
2.1.4. Obtención de matrigel	47
2.2. Técnicas generales de cultivo celular	48
2.2.1. Cultivo celular y subcultivos	48
2.2.2. Conservación de los cultivos celulares	49
2.2.3. Obtención de células a partir de explantes	49
2.3. Estudios de caracterización celular	50
2.3.1. Ensayos de adhesión celular y de inhibición de la adhesión	50
2.3.2. Ensayos de proliferación celular	53
2.3.3. Citometría de flujo	54

2.3.4. Técnicas de microscopía electrónica	54
2.3.5. Valoración del antígeno carcinoembrionario	55
2.4. Técnicas analíticas generales	56
2.4.1. PAGE-SDS y autorradiografía	56
2.4.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección	57
2.4.3. Determinación de la concentración de proteína	58
2.4.4. Análisis de RNAs por transferencia a membranas (<i>Northern Blot</i>)	59
2.4.5. Análisis de aminoácidos	61
2.5. Determinación de actividades enzimáticas	62
2.5.1. Valoración de la actividad de metaloproteinasas	62
2.5.2. Valoración de la actividad de fosfatasa alcalina	63
2.5.3. Ensayo de actividad de 5'-nucleotidasa	64
2.6. Estudios genéticos	65
2.6.1. Análisis del cariotipo	65
2.6.2. Aislamiento de DNA	65
2.6.3. Inestabilidad genética	66
2.6.4. Análisis de mutaciones en el gen <i>p53</i> y <i>MSH2</i>	66
2.7. Detección y purificación de receptores de tipo integrina	67
2.7.1. Inmunoprecipitación de los heterodímeros de integrinas	67
2.7.2. Cromatografías de afinidad en Sepharose 4B	69
2.7.3. Localización por inmunofluorescencia de receptores de tipo integrina	70
2.7.4. Inmunofluorescencia de microtúbulos y microfilamentos	71
2.7.5. Detección de proteínas fosforiladas en tirosinas	71
2.7.6. Detección de niveles de calcio intracelular	72
2.8. Estudios <i>in vivo</i>	73
2.8.1. Estudios de tumorigenicidad	73
2.8.2. Estudios de metástasis	75
2.8.3. Estudios histológicos	76
2.9. Anticuerpos utilizados	76

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de la matriz extracelular sobre el comportamiento <i>in vitro</i> de células BCS-TC2	79
3.1.1. Efecto sobre la adhesión celular	79
Efecto de matrices extracelulares	
Efecto de componentes de la matriz	
Efecto de péptidos	
Inhibición de la adhesión celular por péptidos	
3.1.2. Efecto sobre la extensión celular	90

3.1.1. Efecto sobre la proliferación celular	92
3.2. Receptores celulares implicados en la interacción células BCS-TC2-ECM	94
3.2.1. Expresión de integrinas	94
3.2.2. Receptores celulares implicados en la adhesión de las células a componentes de la ECM	99
Inhibición de la adhesión celular por anticuerpos anti-integrinas	
Receptores celulares implicados en la adhesión célula-fibronectina	
Receptores celulares implicados en la adhesión célula-colágeno	
Receptores celulares implicados en la adhesión célula-laminina	
3.2.3. Efecto de cationes divalentes en la interacción célula-ECM	111
3.3. Transmisión de la señal	113
Distribución de la integrina β_1	
Fosforilación de proteínas en tirosina como respuesta a la interacción células BCS-TC2-ECM	
Fosforilación de proteínas en tirosina como respuesta al agrupamiento de integrinas	
Modificación de los niveles de Ca^{2+} intracelular	
Organización del citoesqueleto	
3.4. Influencia de la ECM en el fenotipo tumorigénico de las células BCS-TC2	123
3.4.1. Inducción de la capacidad tumorigénica	123
Efecto del matrigel en la capacidad tumorigénica	
Efecto de distintos componentes del matrigel sobre la proliferación	
Efecto de distintos péptidos de reconocimiento celular sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2	
3.4.2. Obtención de células de los tumores inducidos por matrigel y estudio de su capacidad tumorigénica	134
3.5. Caracterización de las sublíneas tumorigénicas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2	139
3.5.1. Proliferación celular	139
3.5.2. Grado de diferenciación	141
Antígeno carcinoembrionario	
Actividad de fosfatasa alcalina	
Actividad de 5'-nucleotidasa	
Estudios morfológicos	
3.5.3. Expresión de receptores de componentes de la ECM	146
Expresión del receptor de 67 kDa	
Expresión de receptores de tipo integrina	
3.5.4. Adhesión de células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 a componentes de la ECM	151
3.5.5. Efecto de anticuerpos frente a la integrina β_1 en la tumorigenicidad de las células BCS-TC2.2	153
3.5.6. Expresión de metaloproteinasas	156

3.5.7. Estudios relativos al gen <i>p53</i>	164
3.5.8. Inestabilidad genética	166
Inestabilidad de microsátélites en la línea celular parental y en las sublíneas	
Inestabilidad de microsátélites durante la propagación <i>in vitro</i>	
Inestabilidad genética en el tejido tumoral	
Mutaciones en el gen MSH2	
3.6. Obtención de células de los tumores inducidos por coinyección de células BCS-TC2 con laminina y con fibronectina y estudio de su capacidad tumorigénica	176
3.6.1. Efecto de la laminina en la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2	176
3.6.2. Efecto de la fibronectina en la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2	179
3.6.3. Caracterización de las sublíneas celulares BCS-TC2.LNe, BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2	182
Cariotipo	
Grado de diferenciación	
Expresión de integrinas	
Metaloproteinasas	
3.7. Estudio de la capacidad metastática de las sublíneas celulares	187
3.7.1. Inducción de la capacidad metastática de las células BCS-TC2	191
3.7.2. Caracterización de células procedentes de metástasis hepáticas	196
Estudios morfológicos	
Estudios de cariotipo	
Estudios de tumorigenicidad	
CONCLUSIONES	200
BIBLIOGRAFÍA	204

ABREVIATURAS

ALP	fosfatasa alcalina
<i>apc</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
BSA	albúmina de suero bovino
CEA	antígeno carcinoembrionario
Células NK	<i>células natural killer</i>
Col I	colágeno de tipo I
Col IV	colágeno de tipo IV
<i>dcc</i>	<i>deleted in colorectal carcinomas</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro dihidratado
DEPC	dietil pirocarbonato
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
ECL	<i>enhanced Chemiluminescence Western Blotting</i>
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FAP	poliposis adenomatosa familiar
FCS	suero fetal bovino
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FN	fibronectina
Hepes	ácido 2-(4-(2hidroxietil)-piperanicil-1)-etanosulfónico
HNPCC	cancer colorrectal no poliposo hereditario
kDa	kilodalton
LN	laminina
<i>mcc</i>	<i>mutated in colorectal cancer</i>
MG	matrigel
MG <i>low</i>	matrigel bajo en factores de crecimiento
MMP	metaloproteinasas de matriz
MOPS	ácido [3-(N-morfolinopropano)] sulfónico
<i>MSH</i>	<i>mutS homologue (mismatch repair gen)</i>
N-CAM	molécula de adhesión celular de neuronas
NEM	N-etil-maleimida
PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico

PBS	tampón fosfato salino libre de iones calcio y magnesio
PCR	<i>polimerase Chain Reaction</i>
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIPES	ácido piperazin-N,N'-bis-2-etanosulfónico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RER ⁺	<i>replication errors</i>
RPMI	medio <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
SSCP	<i>single-strand conformational polymorphism</i>
TBS	tampón Tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilén-diamina
TGF	factor de crecimiento transformante
TIMP	<i>tissue-inhibitor of metalloproteinases</i>
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

INTRODUCCIÓN

Las células tumorales malignas se caracterizan por su crecimiento anormal y su tendencia a atravesar las barreras tisulares, a invadir los tejidos adyacentes, y a diseminarse a sitios distantes del foco primario, originando focos metastáticos. En condiciones fisiológicas, y de forma controlada, ciertos tipos celulares normales manifiestan también un comportamiento invasivo. Por ejemplo, para la formación de nuevos vasos sanguíneos, las células endoteliales deben invadir los basamentos membranosos y la matriz intersticial. La gran similitud entre ciertos procesos fisiológicos y la metástasis tumoral, cuando se observan a nivel molecular, sugiere que la capacidad de las células malignas para atravesar múltiples barreras tisulares resulta de la pérdida del control que las células normales tienen sobre la expresión del fenotipo invasivo. Ya que este fenotipo invasivo es esencial para que tengan lugar las diferentes etapas de la cascada metastática, el conocimiento de las bases moleculares asociadas al mismo pueden contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

1.1. CARCINOGENÉISIS, INVASIÓN TISULAR Y METÁSTASIS TUMORAL

La **carcinogénesis** se inicia cuando se produce un daño genético irreversible que no puede ser corregido por los mecanismos normales de reparación del DNA. Esta alteración cromosómica puede permanecer latente y se requieren fases posteriores, de inducción y progresión, para la generación de un tumor. En la fase de inducción, agentes promotores, que por sí mismos no son carcinogénicos, promueven procesos en los que se altera el control de la proliferación celular. De esta manera, la célula irreversiblemente transformada y activada puede proliferar. Este hecho, junto con la estimulación por factores de crecimiento, la existencia de interacciones alteradas entre estas células con componentes de la matriz extracelular, y el aumento de vascularización, favorecen la proliferación celular formándose un tumor. El crecimiento del tumor requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos (proceso denominado **angiogénesis**), una vez que el tamaño de la masa tumoral excede de 2 mm de diámetro, asegurándose así el aporte de los nutrientes necesarios para el mantenimiento de la masa tumoral (Fidler, 1995; Neeman, 1996). Además, la angiogénesis es crucial para favorecer la capacidad de las células tumorales de dejar el sitio primario y para el establecimiento y expansión del tumor secundario, ya que los vasos neoformados son lábiles

(Karp y Broder, 1995). Para que se produzca el proceso de angiogénesis se requiere la participación de diversos factores de crecimiento y otras citoquinas, moléculas que son sintetizadas por las células tumorales y/o células normales del entorno, o que se encuentran almacenadas en la matriz extracelular (Benezra *et al.*, 1993; Folkman, 1995).

El crecimiento tumoral está asociado a la **invasión** del tejido circundante, produciéndose la destrucción y colonización del mismo. Para ello, se produce un incremento en los niveles de enzimas que degradan la matriz extracelular. En condiciones normales, en los tejidos existen inhibidores naturales de estas enzimas, pero durante el crecimiento tumoral su síntesis se encuentra disminuida, favoreciéndose la degradación tisular. En numerosos procesos fisiológicos también se producen cambios en la composición de la matriz extracelular, con síntesis de nuevos componentes y la eliminación de otros preexistentes por acción de proteasas que los degradan selectivamente. Estos procesos, de eliminación y de síntesis, ocurren simultáneamente de una forma progresiva y ordenada, por lo que se mantiene la función de la matriz. En condiciones patológicas se rompe este equilibrio alterándose la dinámica entre la formación y la degradación de componentes de la matriz extracelular. De esta forma, puede tener lugar una producción excesiva de componentes de la matriz (fibrosis) o un incremento de la degradación proteolítica de proteínas del estroma normal (destrucción del tejido). Esto causa alteraciones en la distribución, composición y función de la matriz, que se observan en varias patologías. Aún con una pérdida neta de matriz, como en general ocurre en el cáncer, puede existir un incremento en la síntesis de algún componente específico o una acumulación de componentes de la matriz alterados (Stetler-Stevenson, 1996). Por otro lado, las células tumorales sintetizan su propia matriz extracelular, una matriz en la mayoría de los casos vulnerable. Estas alteraciones en la matriz extracelular están, además, asociadas a una modificación de las interacciones célula-matriz extracelular, lo que facilita la capacidad de migración celular.

Para que tenga lugar la **metástasis** las células transformadas necesitan liberarse del tumor primario, migrar a través de la matriz intersticial y/o basamento membranoso e invadir localmente los vasos sanguíneos o linfáticos (**intravasación**). De esta manera las células tumorales entran en la circulación y son transportadas por el sistema circulatorio. En la mayor parte de los casos, las metástasis ocurren primero en nódulos linfáticos y, en un estadio posterior, las células dejan el tejido linfoide para entrar en el torrente sanguíneo. En la circulación, un gran número de células tumorales son destruidas por trauma mecánico debido a la circulación turbulenta. Por tanto, sólo un número reducido de células sobreviven y salen del torrente circulatorio dando lugar a la metástasis. En el proceso de **extravasación**, células individuales o pequeños agregados celulares, en capilares de órganos concretos, interaccionan con las células del endotelio de los vasos a través de diferentes moléculas de adhesión, y atraviesan la barrera del basamento membranoso subendotelial. La unión de las células

neoplásicas en el órgano diana presenta especificidad de tejido. En muchos casos este paso sigue al crecimiento del tumor dentro del vaso y la ruptura física de la pared microvascular por la expansión de la masa tumoral. La extravasación también puede ser mediada por interacciones específicas célula endotelial-célula tumoral y la unión selectiva a componentes de la matriz específicos (Zhu *et al.*, 1991; Tang y Honn, 1994-95). Otras veces se produce una retracción del endotelio exponiendo el basamento membranoso al cual se adhieren las células cancerígenas, lo que desencadena la degradación de éste y la migración de las células dentro de los compartimentos de tejidos extravasculares. Todos estos mecanismos implican la adhesión inicial de las células malignas intravasculares al endotelio. Existen agentes que interfieren en este paso y disminuyen la metástasis experimental: anticuerpos frente a receptores de tipo integrina (Schiller y Bittner, 1995; Newton *et al.*, 1995), péptidos sintéticos que bloquean a estas moléculas de adhesión (Yamamura *et al.*, 1993; Saiki *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996) o tratamientos con drogas que modifican las propiedades adhesivas de la membrana de las células transformadas (Newton *et al.*, 1989).

Una vez alcanzado el sitio de metástasis, las células tumorales pueden sobrevivir y crecer en el ambiente particular de dicho órgano (Fidler, 1995). La hipótesis de Paget (Paget, 1889) de *la semilla y la tierra* proponía que la formación de metástasis no es un proceso al azar, sino que depende, en parte, de la interacción de las células tumorales (*semilla*) con el medio compatible proporcionado por el entorno particular del órgano (*tierra*). Numerosos estudios, como los realizados en cáncer de colon humano (Radinsky, 1993), confirman esta hipótesis y muestran que la producción de metástasis específicas de tejido dependen de la proliferación de células que expresen receptores para factores de crecimiento. De esta manera, los factores de crecimiento paracrinos específicos producidos por células normales del órgano diana pueden estimular el crecimiento de las células metastáticas. Las células metastáticas proliferan en órganos secundarios que producen factores de crecimiento compatibles, es decir, similares a los implicados en la regulación celular del tejido normal del que se originó el tumor primario. El microentorno del órgano huésped influye profundamente en el crecimiento de las células tumorales metastáticas, por lo que se puede considerar a la célula metastática como una célula receptiva a un entorno particular (Fidler, 1995). Estudios realizados sobre el desarrollo de tumores en roedores han demostrado que la metástasis es un proceso selectivo que puede tener un origen clonal, desarrollándose de la proliferación de una única célula (Fidler, 1995).

Una forma común de cáncer son los carcinomas, tumores que derivan del epitelio (Figura 1). El epitelio está formado por un conjunto de células adyacentes unidas fuertemente y organizado en una o varias capas, la última de ellas adherida al basamento membranoso. Esta organización se mantiene por interacciones célula-célula y célula-basamento membranoso mediadas por receptores de adhesión presentes en la membrana plasmática de las células

epiteliales. Sólo considerando la transformación de epitelio normal a carcinoma invasivo, se detectan una serie de cambios en las proteínas de adhesión, alterándose los mecanismos normales de adhesión célula-célula y célula-basamento membranoso. Además, en los complejos procesos de invasión y metástasis participan una gran variedad de mecanismos y proteínas diferentes. En relación al contenido de esta Memoria, hay que destacar que en diferentes etapas la matriz extracelular actúa como una barrera natural que se opone a la diseminación celular. Un esquema del proceso de invasión y metástasis se recoge en la figura 1.

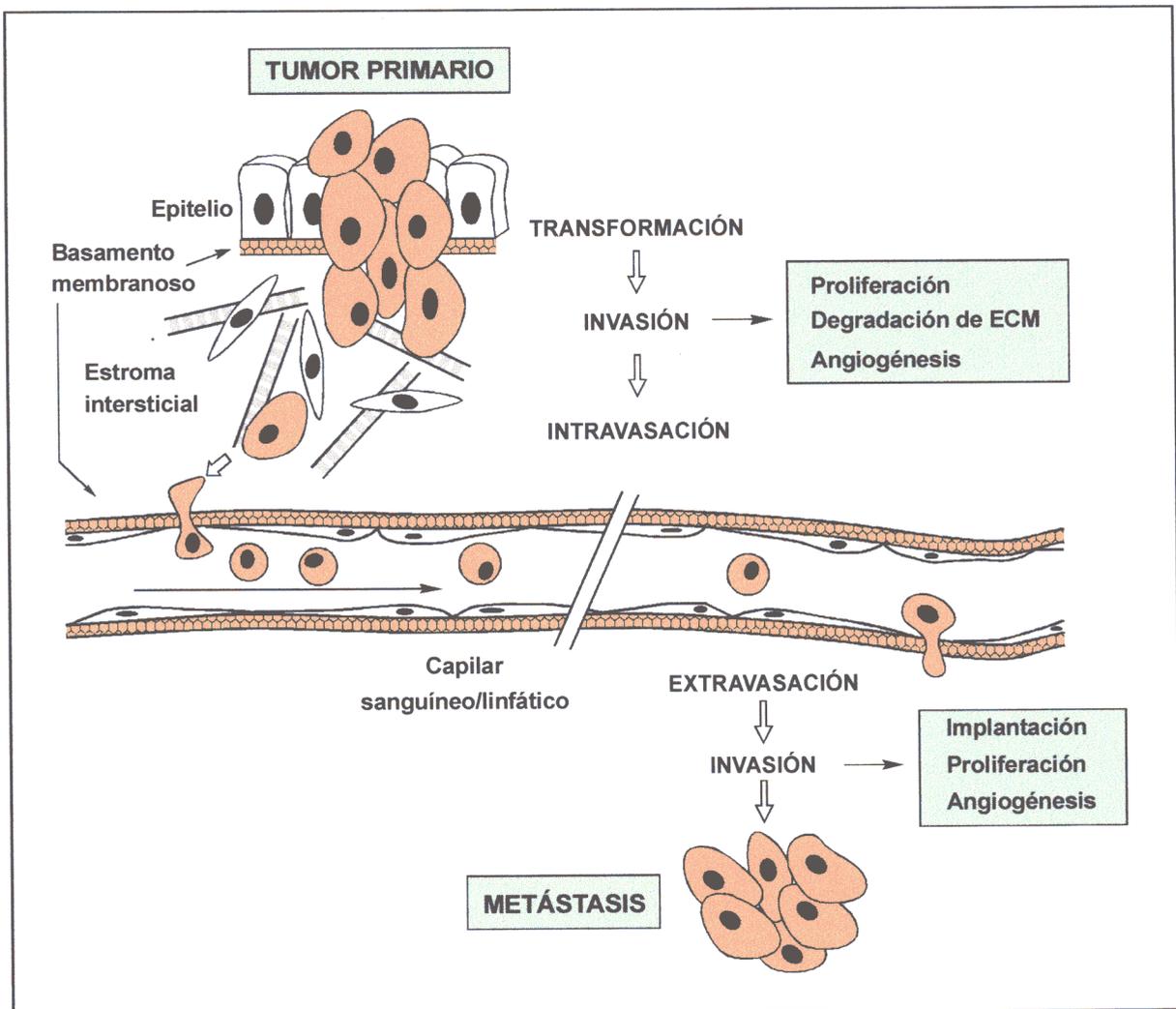


Figura 1.- Etapas de la invasión tumoral y formación de metástasis.

En el esquema se recogen los procesos implicados en la formación de focos secundarios después de la transformación maligna de células de epitelio. Las células transformadas se liberan del tumor primario, atraviesan la pared de los capilares y entran en la circulación. De esta manera, alcanzan lugares, distantes del tumor primario, donde se extravasan y comienzan a proliferar, formando un foco secundario o metástasis.

1.2. TIPOS Y COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La **matriz extracelular** (ECM) es una asociación o entramado organizado de distintos tipos de macromoléculas, cada una de ellas con una función especializada, que constituye el entorno de las células eucarióticas. La composición de la ECM es específica para cada tejido y genera el ambiente específico y diferente para las distintas células del cuerpo. La ECM actúa como soporte para el crecimiento celular y proporciona una estructura estable alrededor de las células. Además de esta función estructural, la matriz contiene información *codificada*, en función del tipo de moléculas que la constituyan, que se transmite al interior celular (Dedhar y Hanningan, 1996; Lafrenie y Yamada, 1996), por lo que ejerce un papel esencial en el desarrollo de la función celular normal (Gullberg y Ekblom, 1995; Roskelley y Bissell, 1995). Influye en el comportamiento celular: en procesos de adhesión y separación, en la motilidad, en el establecimiento de la morfología, en la iniciación de la transmisión de señales, modula la proliferación celular y la diferenciación tisular, y participa en la regulación de diversas funciones metabólicas (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Hay, 1991; Lochter y Bissell, 1995). La matriz extracelular también desempeña una importante función en la angiogénesis (Ingber y Folkman, 1989; Bonfil *et al.*, 1994). Actúa como reservorio de moléculas con actividad biológica ya que, por ejemplo, algunos factores de crecimiento y citoquinas están unidos a los proteoglicanos de la matriz y de la superficie celular (Taipale y Keski-Oja, 1997). Además, algunas proteasas y sus inhibidores se asocian con componentes de la matriz (Liotta y Stetler-Stevenson, 1991; Farina *et al.*, 1996).

A mediados de siglo se consideraba a la matriz extracelular como "*fibras de colágeno embebidas en una sustancia coloidal*". Sin embargo, los conocimientos actuales sobre ella demuestran que su composición es compleja y su organización muy variada, según los conocimientos actuales sobre ella. Está compuesta por cuatro tipos diferentes de macromoléculas que pertenecen a las familias de los colágenos, los proteoglicanos, las glicoproteínas no colagenosas y, en algunos tejidos, las elastinas. Alrededor de una treintena de genes codifican a las moléculas de los colágenos, y se han descrito decenas de moléculas que *constituyen las familias de los proteoglicanos y de las glicoproteínas no colagenosas*. Estas macromoléculas, frecuentemente multiméricas, se asocian entre sí de manera no covalente para formar una matriz insoluble, generando estructuras especializadas que difieren en su forma y propiedades, lo que les permite adaptarse a los requerimientos funcionales de los diferentes tejidos. Las propiedades de la matriz dependen de las moléculas particulares que la forman, del porcentaje relativo de cada una de ellas y de las interacciones que se establezcan entre los diferentes componentes. La composición y, por tanto, la organización supramolecular de los componentes de la matriz extracelular, determinan su influencia en el comportamiento celular.

En los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto el carácter modular de los componentes de la matriz extracelular. En las moléculas de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas no colagenosas se han detectado elementos estructurales o módulos diferentes que se repiten en la misma proteína o están presentes en diferentes macromoléculas (Engel, 1996). Además, muchas de estas proteínas son multifuncionales, pudiendo establecer interacciones con diferentes macromoléculas, propiedad imprescindible para el desarrollo de sus funciones.

En general se distinguen dos tipos principales de tejido conectivo: el estroma, o matriz intersticial, y los basamentos membranosos. En el estroma, donde las células están embebidas, los colágenos mayoritarios forman estructuras fibrilares y se asocian con otros componentes entre los que se puede destacar a la fibronectina, glicoproteína mayoritaria, y, entre los proteoglicanos, a los de tipo condroitín y dermatán sulfato (Postlethwaite y Kang, 1992; Aumailley y Krieg, 1994). Los basamentos membranosos son una matriz acelular especializada, en forma de lámina uniforme que soporta las células, y están compuestos principalmente por colágeno de tipo IV, la glicoproteína laminina, y proteoglicanos del tipo heparán sulfato (Timpl, 1996; Lindblom y Paulsson, 1996).

1.2.1. COLÁGENOS

Estas proteínas son los principales elementos estructurales de la matriz extracelular que proporcionan la forma, la fuerza y la flexibilidad a los tejidos, entre otras propiedades. El colágeno ha sido sinónimo de proteína fibrosa, ya que los primeros colágenos conocidos, mayoritarios en los tejidos, forman fibras. Un ejemplo es el colágeno de tipo I, que constituye el 90% del colágeno corporal; la molécula está formada por una triple hélice rígida (**triple hélice de colágeno**), que se asocia formando las características fibras visualizadas por microscopía electrónica. Sin embargo, el descubrimiento de otros tipos ha permitido concluir que *la formación de fibras es una característica de un número limitado de colágenos.*

En el término **colágeno** se engloba a una superfamilia de proteínas de, hasta la fecha, 19 tipos de moléculas diferentes, formadas por más de una treintena de cadenas polipeptídicas genéticamente diferentes (Tabla I) (van der Rest y Garrone, 1991; Mayne y Brewton, 1993; Brown y Timpl, 1995; Bateman *et al.*, 1996). Algunos colágenos identificados en la última década son componentes minoritarios en los tejidos y todavía no se conoce la estructura macromolecular y/o la función que desempeñan. Los colágenos se pueden definir como *"moléculas cuyas propiedades dependen de la triple hélice"* o como aquellas *"macromoléculas estructurales de la matriz extracelular que incluyen en su estructura uno o varios dominios que se encuentran en conformación de triple hélice"* (van der Rest y Garrone, 1991). Dentro de

Tabla I. Características y tipos de colágenos

Tipo de colágeno y cadenas	Organización molecular y supramolecular. Origen celular/distribución tisular
Colágenos fibrilares:	
I [$\alpha_1(I)$, $\alpha_2(I)$]	[$\alpha_1(I)$] ₂ $\alpha_2(I)$] y forma minoritaria [$\alpha_1(I)$] ₃ . Fibras con periodicidad de 67 nm y diámetro 45-180 nm. Fibras con colágenos de tipo III y V. Fibroblastos y osteoblastos. Distribución ubicua: piel, hueso, tendón, dentina, ligamentos, vasos, etc.
II [$\alpha_1(II)$]	[$\alpha_1(II)$] ₃ . Fibra: 5-100 nm diámetro. Fibras con colágeno de tipo IX y XI. Condrocitos. Cartilago hialino y cuerpo vítreo.
III [$\alpha_1(III)$]	[$\alpha_1(III)$] ₃ . Fibras de 40 nm de diámetro. Fibroblastos. Piel y vasos.
V [$\alpha_1(V)$, $\alpha_2(V)$, $\alpha_3(V)$]	[$\alpha_1(V)$] ₂ , [$\alpha_1(V)$] ₂ $\alpha_2(V)$], [$\alpha_1(V)$ $\alpha_2(V)$ $\alpha_3(V)$] y otras formas. En fibras de colágeno tipo I. Células de músculo liso. Membranas fetales, piel, hueso, placenta, etc.
XI [$\alpha_1(XI)$, $\alpha_2(XI)$, $\alpha_3(XI)$]	[$\alpha_1(XI)$ $\alpha_2(XI)$ $\alpha_3(XI)$]. En fibras de colágeno tipo II. Condrocitos. Cartilago.
Colágenos asociados a fibras:	
IX [$\alpha_1(IX)$, $\alpha_2(IX)$, $\alpha_3(IX)$]	[$\alpha_1(IX)$ $\alpha_2(IX)$ $\alpha_3(IX)$]. Asociado a fibras de colágeno de tipo II. Condrocitos. En los mismos tejidos que el colágeno de tipo II.
XII [$\alpha_1(XII)$]	[$\alpha_1(XII)$] ₃ . Asociado a fibras de colágeno de tipo I. Fibroblastos. En los mismos tejidos que el colágeno de tipo I.
XIV [$\alpha_1(XIV)$]	[$\alpha_1(XIV)$] ₃ . Asociado a fibras de colágeno tipo I. Fibroblastos. Piel, tendón, pulmón.
Colágenos no fibrilares:	
IV [$\alpha_1(IV)$, $\alpha_2(IV)$, $\alpha_3(IV)$, $\alpha_4(IV)$, $\alpha_5(IV)$]	[$\alpha_1(IV)$] ₂ $\alpha_2(IV)$] mayoritaria y otras formas. Estructura reticular. Células epiteliales y endoteliales. Membranas basales.
VI [$\alpha_1(VI)$, $\alpha_2(VI)$, $\alpha_3(VI)$]	[$\alpha_1(VI)$ $\alpha_2(VI)$ $\alpha_3(VI)$]. Red microfibrilar de filamentos con glóbulos. Fibroblastos. Vasos y tejidos intersticiales.
VII [$\alpha_1(VII)$]	[$\alpha_1(VII)$] ₃ . Manojos filamentosos. Células de epitelio. Unión dermoepitelial.
VIII [$\alpha_1(VIII)$, $\alpha_2(VIII)$]	[α_1 (VIII)] ₃ (?). Redes hexagonales. Células de endotelio. Endotelio vascular.
X [$\alpha_1(X)$]	[$\alpha_1(X)$] ₃ . Redes hexagonales. Condrocitos hipertróficos. Placa de crecimiento.
Otros colágenos:	
XIII [$\alpha_1(XIII)$]	[$\alpha_1(XIII)$] ₃ (?). Asociado a membrana. Fibroblastos y células de endotelio. Piel, hueso, intestino, músculo y cartilago.
XIV [$\alpha_1(XIV)$]	[$\alpha_1(XIV)$] ₃ . Asociado a fibras. Piel fetal y tendón.
XV [$\alpha_1(XV)$]	[$\alpha_1(XV)$] ₂ (?). Fibroblastos, células musculares y de endotelio. Riñón y páncreas.
XVI [$\alpha_1(XVI)$]	[$\alpha_1(XVI)$] ₃ (?). Placenta.
XVII [$\alpha_1(XVII)$]	[$\alpha_1(XVII)$] ₃ (?). Asociado a membrana. Células de epitelio. Hemidesmosomas.
XVIII [$\alpha_1(XVIII)$]	[$\alpha_1(XVIII)$] ₃ (?). Riñón, hígado y pulmón.
XIX [$\alpha_1(XIX)$]	[$\alpha_1(XIX)$] ₃ (?). Fibroblastos (?).

Las cadenas α se nombran con un subíndice indicándose entre paréntesis el tipo de colágeno. En la tabla se omiten las posibles variantes de las cadenas α (por ejemplo para cada uno los colágenos de tipo XII y XIV se han descrito dos cadenas, una corta y otra larga). Las características, origen tisular y distribución de algunos de los colágenos recientemente descritos se conocen sólo parcialmente.

esta familia se incluye a las moléculas de colágeno que no tienen una triple hélice continua y que presentan dominios globulares. Además, se excluyen otras proteínas, como el componente C_{1q} del complemento o la acetilcolinesterasa, que aunque contienen una región en triple hélice no se encuentran en la matriz extracelular.

La peculiar secuencia de las cadenas polipeptídicas del colágeno, la repetición del triplete glicocola-X-Y, hace posible que se genere la triple hélice de colágeno, estructura resistente a la acción de proteasas comunes. En los colágenos que no forman fibras la estructura en triple hélice queda interrumpida por las denominadas regiones no colagenosas, que varían desde dominios globulares extensos hasta pequeñas regiones donde la secuencia del triplete no se repite o se altera. Estas zonas son sensibles al ataque proteolítico, pero confieren flexibilidad a la molécula de colágeno y la capacita para formar una gran diversidad de estructuras macromoleculares.

A los diferentes tipos de colágeno se les ha asignado un número correlativo en función de la fecha de su descubrimiento; pero se ha establecido una clasificación, en tres grandes grupos, según las estructuras macromoleculares que forman (Tabla I). Así, podemos distinguir:

- Colágenos fibrilares**, o colágenos de tipo intersticial (tipos I, II, III) y de tipo V y XI, que presentan una triple hélice continua de 300 nm. Forman fibras resistentes, estabilizadas por enlaces covalentes, y con bandas periódicas y diámetro característico para cada uno de ellos.
- Colágenos asociados a fibras** (tipos IX, XII y XIV), moléculas en las que los dominios en triple hélice se alternan con regiones no colagenosas.
- Colágenos que no forman fibras**. En este grupo se incluyen colágenos que forman redes o mallas (tipos IV, VIII y X), o que se presentan en forma de filamentos con glóbulos (tipo VI) o constituyentes de las fibras de anclaje (tipo VII). Dos colágenos recientemente descritos (tipos XVI y XIX) se han agrupado con los asociados a fibras ya que contienen uno o dos dominios comunes con el colágeno de tipo IX. Otra subfamilia la forman los colágenos asociados a membrana, de tipo XIII y XVII. Los colágenos de tipo XV y XVIII están relacionados entre sí por sus homologías de secuencia.

En la figura 2 se recogen diferentes formas de asociación supramolecular de distintos tipos de colágeno: organización en estructuras fibrilares (colágeno tipo I), formación de redes de colágeno de tipo IV, estructura de colágenos de tipo VI y VII y asociación de distintos tipos de colágeno a fibras, por ejemplo, colágenos de tipo IX y XI a fibras de colágeno de tipo II.

Aunque la principal función que desempeñan los colágenos es estructural, tres de ellos, los colágenos de tipo I, IV y VI, son a su vez miembros de la familia de las denominadas "glicoproteínas de adhesión" (von der Mark y Goodman, 1993), en la cual también se encuentran incluidos otros componentes de la matriz extracelular. Se caracterizan porque en la mayoría de los casos contienen distintas secuencias específicas de reconocimiento celular

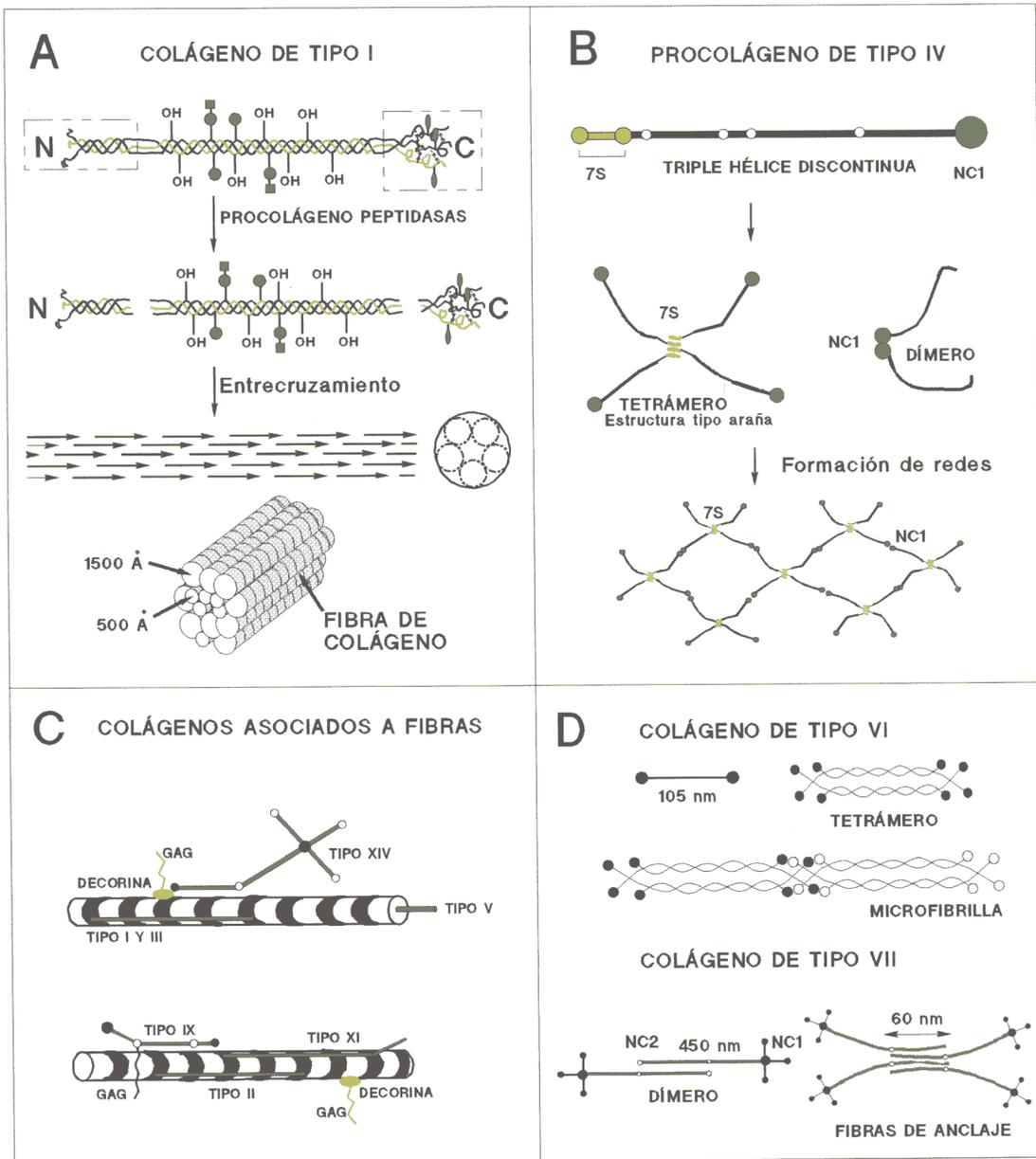


Figura 2.- Formación de fibras y redes de colágeno en el espacio extracelular.

Según el tipo de colágeno, el procesamiento extracelular de las moléculas de procolágeno es diferente y, por tanto, las estructuras supramoleculares que forman. (A) Proceso de formación y estabilización de las fibras de colágeno intersticial. Las procolágeno peptidasas actúan sobre el procolágeno, que pierde los dominios no colagenosos de los extremos, y la lisil oxidasa convierte ciertos residuos de lisina e hidroxilisina en los correspondientes aldehídos. La triple hélice resultante agrega lateralmente, formando microfibrillas que se estabilizan por formación de enlaces de entrecruzamiento covalentes. (B) Interacción de moléculas de colágeno de tipo IV para formar estructuras en forma de red. La molécula de procolágeno de tipo IV no se procesa, es una molécula más flexible que la de los colágenos fibrilares, ya que contiene inclusiones y deleciones en la secuencia del triplete Gly-X-Y. El procolágeno de tipo IV no pierde los extremos no colagenosos por lo que no puede formar fibras. La asociación, de las moléculas precursoras se establece a través de los extremos terminales (7S y NC1), formando dímeros y tetrámeros y, en último término, una red tridimensional. Estas estructuras se estabilizan por enlaces covalentes de entrecruzamiento y por puentes disulfuro. (C y D) Otros tipos de asociaciones que muestran la versatilidad de esta superfamilia de moléculas de la matriz extracelular.

y, por tanto, son capaces de interactuar con las células a través de receptores de la superficie celular (Hynes, 1992; Gullberg *et al.*, 1992; Pfaff *et al.*, 1993; Kern *et al.*, 1993; Underwood *et al.*, 1995). Esto implica que estos colágenos, dependiendo del tipo celular considerado, influyen en el comportamiento celular modulando procesos como adhesión, extensión, migración y proliferación celular. De hecho, en numerosos estudios se utiliza colágeno de tipo I o de tipo IV como sustratos adhesivos, analizando la respuesta de distintos tipos de células.

1.2.2. PROTEOGLICANOS

Un segundo tipo de componentes de la matriz extracelular, que se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos animales, son los proteoglicanos (Fosang y Hardingham, 1996). Los **proteoglicanos** son "*macromoléculas constituidas por un núcleo proteico al que se unen covalentemente distintas cadenas de hidratos de carbono sulfatadas denominadas glicosaminoglicanos*". La presencia de los **glicosaminoglicanos** es la característica común de este conjunto de proteínas. Los glicosaminoglicanos son cadenas polianiónicas, de longitud variable, generadas por la repetición de un disacárido, donde un residuo siempre es una hexosamina (D-glucosamina o D-galactosamina) y el otro un ácido hexurónico (D-glucurónico o L-idurónico). Según la naturaleza del disacárido presente se obtienen distintos tipos de glicosaminoglicanos que forman estructuras grandes y extendidas, con alta densidad de carga negativa debido a los grupos sulfato y carboxilo de los restos de ácido hexurónico. Algunos proteoglicanos contienen distintos tipos de cadenas de glicosaminoglicanos y su longitud y la relación entre ellas puede cambiar durante el desarrollo, la edad y en estados patológicos. Los proteoglicanos pueden presentar oligosacáridos unidos a la cadena proteica a través de enlaces N- y O-glicosídicos (Kjellén y Lindahl, 1991; Scott, 1992).

La nomenclatura de los proteoglicanos es compleja, ya que suelen reconocerse por su nombre trivial (agrecano, decorina, serglicina, etc.) que hace mención a sus características estructurales o funcionales. La distribución topográfica de los proteoglicanos, en relación a la célula, se ha utilizado como forma de clasificación. Un grupo está constituido por los que se depositan en la matriz extracelular (agrecano, versicano, decorina, etc.). En un segundo grupo se incluyen los proteoglicanos anclados a la membrana plasmática (fibroglicano, sindecano, glicano, etc.). Los proteoglicanos localizados intracelularmente en gránulos secretorios (serglicina) constituyen el tercer grupo.

También se han clasificado atendiendo a su secuencia de aminoácidos, reactividad inmunológica y propiedades, en las siguientes subfamilias:

- a) **Proteoglicanos extracelulares de gran tamaño** que son capaces de interactuar con el ácido hialurónico, en los que predominan las cadenas de condroitín sulfato.
- b) **Proteoglicanos pequeños** con núcleos proteicos homólogos sustituidos por una o dos cadenas de glicosaminoglicanos (condroitín, dermatán o queratán sulfato).
- c) **Proteoglicanos de los basamentos membranosos** que contienen cadenas de heparán sulfato.
- d) **Proteoglicanos asociados a la membrana celular** que normalmente son del tipo híbrido con condroitín y heparán sulfato.
- e) **Proteoglicanos intracelulares** o serglicinas; contienen un núcleo proteico cuya secuencia alterna serinas y glicocolas y lleva unidas cadenas de condroitín y heparán sulfato.

Los proteoglicanos participan en la organización de la matriz extracelular y son responsables de mantener su hidratación. Una propiedad física de los geles de proteoglicanos es que son permeables a solutos de baja masa molecular pero no a macromoléculas, formando barreras de permeabilidad. Además de ser un soporte estructural, las funciones de los proteoglicanos son más amplias, influyendo en procesos celulares como adhesión, motilidad, proliferación, diferenciación y morfogénesis (Fosang y Hardingham, 1996). Una de las funciones más sobresalientes de este grupo de componentes de la matriz extracelular es la de actuar como reservorio de moléculas con actividades biológicas diversas, pudiendo, a su vez, controlar la actividad y prolongar la vida media de las mismas. Diferentes factores de crecimiento se asocian con proteoglicanos de tipo heparán sulfato (Taipale y Keski-Oja, 1997). Este tipo de proteoglicanos interactúa con el FGF a través de los glicosaminoglicanos, incrementando la unión de éste a su receptor y su actividad mitogénica (Yayon *et al.*, 1991). Otro ejemplo lo constituye el TGF- β , que interactúa con el núcleo proteico del betaglicano y la decorina, inhibiéndose su actividad (Yamaguchi *et al.*, 1990).

1.2.3. GLICOPROTEÍNAS NO COLAGENOSAS

La mayoría de las células que crecen *in vitro* necesitan adherirse para sobrevivir y proliferar, y requieren factores de adhesión, sobre todo durante los estadios iniciales después de la siembra. El suero utilizado en cultivos celulares proporciona estos factores. Contiene al menos dos glicoproteínas no colagenosas, fibronectina y vitronectina, que pueden, de manera individual, promover la adhesión celular. Las glicoproteínas no colagenosas constituyen un grupo heterogéneo de macromoléculas de la matriz extracelular que desempeñan funciones como la regulación del ensamblaje de componentes de la matriz, proporcionan centros de interacción entre las macromoléculas y median en las interacciones con las células. Entre las proteínas que componen este grupo se encuentran algunas que forman parte de las glicoproteínas de adhesión. Éstas son proteínas multifuncionales que presentan diferentes dominios estructurales donde reside su capacidad de unión a células y a otros componentes de

la matriz. En la mayoría de los casos contienen la secuencia -RGD- de reconocimiento celular e interaccionan con las células a través de las integrinas. En este grupo se incluyen proteínas como la fibronectina, laminina, entactina, tenascina, trombospondina, vitronectina y al factor de von Willebrand, además de los ya comentados colágenos de tipo I, IV y VI (von der Mark y Goodman, 1993; Johansson, 1996). En este apartado sólo se van a presentar algunas de las características de dos de estas moléculas, la laminina y la fibronectina. En la tabla II se recogen algunas de las características de otros miembros de esta familia que se mencionan en diferentes puntos de esta Memoria.

Lamininas

La laminina es una glicoproteína multifuncional que media la adhesión de ciertos tipos celulares a los basamentos membranosos. También interacciona con otros componentes de la matriz como el colágeno de tipo IV, proteoglicanos, entactina o nidógeno y heparina. Debido a estas múltiples interacciones, se cree que la laminina desempeña una función importante en el mantenimiento de la estabilidad y en la organización de la matriz. Además, es la responsable del anclaje de las células al basamento membranoso y del control de los estados diferenciados de las células que están asociadas a los basamentos membranosos (Ruoslahti, 1990; Paulsson, 1992; Boudreau *et al.*, 1995). La laminina ejerce probablemente estas actividades *in vivo* durante el desarrollo tisular, en condiciones patológicas, incluyendo la progresión tumoral, y en la reparación de heridas (Friedrichs *et al.*, 1995; Malinda y Kleinman, 1996).

Estudios *in vitro* muestran que la unión de las células a laminina produce cambios drásticos en su fenotipo (Kleinman *et al.*, 1993; Yudoh *et al.*, 1996). La laminina induce la adhesión y extensión celular, genera una respuesta mitogénica, favorece la migración e invasión celular, promueve el crecimiento neuronal, participa en el mantenimiento de la morfología y de un fenotipo diferenciado e influye en la expresión génica.

Estructura de la laminina

La molécula de laminina presenta en microscopía electrónica una estructura extendida en forma de cruz latina, asimétrica, con tres brazos cortos aparentemente idénticos de 36 nm y un brazo largo de 77 nm, observándose elementos globulares en cada uno de los brazos (Timpl *et al.*, 1983). Dos de los brazos cortos contienen, cada uno, una región globular central y otra terminal, separadas por regiones en forma de varilla; el tercer brazo corto presenta una región globular adicional. El brazo largo de la laminina se muestra como una varilla flexible, con un gran dominio globular terminal (Beck *et al.*, 1990). Utilizando diversas enzimas proteolíticas se han obtenido fragmentos de la proteína que han permitido asignar funciones

Tabla II. Principales glicoproteínas no colagenosas

<p>ENTACTINA/ NIDÓGENO</p>	
<p>FIBULINAS</p> <p>Una cadena polipeptídica (80 kDa) Proteína plasmática y de matriz extracelular Proteína de unión de calcio, rica en cisteínas Unión a fibronectina y fibrinógeno</p>	
<p>OSTEONECTINA</p> <p>Una cadena polipeptídica (32 kDa) Amplia distribución Se une a colágenos, gelatina e hidroxiapatito Ensamblaje de la matriz ósea</p>	
<p>TENASCINAS</p> <p>Distintas cadenas polipeptídicas (190-230 kDa) Forma hexámeros (Tenascinas C y R) o trimeros (Tenascina X) Localización en cerebro, cartilago y piel Consta de 4 dominios: - Región globular N-terminal (autoasociación) - Repeticiones tipo EGF (actividad antiadhesiva) - 11 repeticiones adicionales de tipo III de FN (unión a proteoglicanos, fibronectina y células) - Dominio C-terminal homólogo al del fibrinógeno β y γ</p>	
<p>TROMBOSPONDINAS</p> <p>Tres cadenas polipeptídicas (150 kDa) Amplia distribución Se une a heparina, fibronectina, fibrinógeno, colágeno de tipo V y calcio Contiene 8 secuencias de tipo calmodulina en el extremo carboxilo terminal</p>	
<p>VITRONECTINAS</p> <p>Una cadena polipeptídica (70 kDa) Proteína plasmática y de matriz extracelular Dos formas con diferente afinidad por heparina</p>	

Se indican las principales características estructurales, sus dominios de unión y su distribución. EGF, factor de crecimiento epitelial. *EF hand*, sitio de unión de calcio de alta afinidad. A y B, diferentes formas de procesamiento alternativo del extremo carboxilo termina de la fibulina. FN, fibronectina. PG, proteoglicano. PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. C7, C8 y C9, proteínas del complemento.

específicas a distintas regiones de la molécula. Por ejemplo, por digestión con pepsina se obtiene el fragmento P1 que contiene los tres brazos cortos sin los dominios globulares. Algunos de los fragmentos obtenidos por digestión con elastasa de la molécula de laminina se recogen en la figura 3.

Las lamininas constituyen una familia de glicoproteínas de la matriz formadas por cadenas α , β y γ de masas moleculares comprendidas entre 140-400 kDa (Timpl, 1996). Las cadenas polipeptídicas se clasifican en estos tres grupos en función de su secuencia y organización en dominios. Actualmente se conocen 10 cadenas de laminina genéticamente distintas que, en su ensamblaje heterotrimérico, dan origen a las 11 diferentes isoformas (Figura 3). La mayoría de los estudios iniciales sobre laminina se han realizado con la laminina-1 [α 1 β 1 γ 1], denominadas anteriormente A, B1 y B2] procedente del tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón. Se han clonado y secuenciado las tres cadenas polipeptídicas de la laminina de diferentes fuentes, lo que ha permitido apreciar una organización en dominios acorde con las ultraestructuras observadas. El análisis de la secuencia de aminoácidos de las tres cadenas de la laminina-1 revela la existencia de los diferentes dominios que, en números romanos, aparecen recogidos en la figura 3. Los elementos estructurales de los brazos cortos son alrededor de 42 repeticiones homólogas de tipo EGF, de aproximadamente 60 aminoácidos, que contienen 8 cisteínas organizadas en posiciones regulares, en lugar de las 6 que se encuentran normalmente en repeticiones similares de otras proteínas. Además, estas secuencias de tipo EGF también se han descrito en otras glicoproteínas de la matriz como en la tenascina, la trombospondina o la entactina (Tabla II). Un análisis detallado de cada uno de estos dominios, la estructura de cada uno de los brazos de la laminina y las funciones de esta proteína se encuentra en Beck *et al.* (1990) y en Engvall y Wewer (1996).

En las tres cadenas que forman la laminina-1 se han identificado 74 sitios potenciales de N-glicosilación. Estos sitios, desigualmente distribuidos entre las cadenas, están concentrados en posiciones localizadas en la superficie de la hélice del brazo largo. Los porcentajes de glicosilación oscilan entre un 12-27% (Knibbs *et al.*, 1989). Se ha descrito que la glicosilación no es necesaria para el ensamblaje de las cadenas ni para la unión a heparina, y no confiere estabilidad frente a las proteasas. Sin embargo, parece que los hidratos de carbono de la laminina pueden modular la respuesta celular (Bouzon *et al.*, 1990), no siendo esenciales para la adhesión celular pero sí para promover la extensión celular y la salida de neuritas (Dean *et al.*, 1990; Chandrasekaran *et al.*, 1991).

Isoformas de la laminina

Las lamininas, según su composición, se pueden clasificar en dos grupos, lamininas

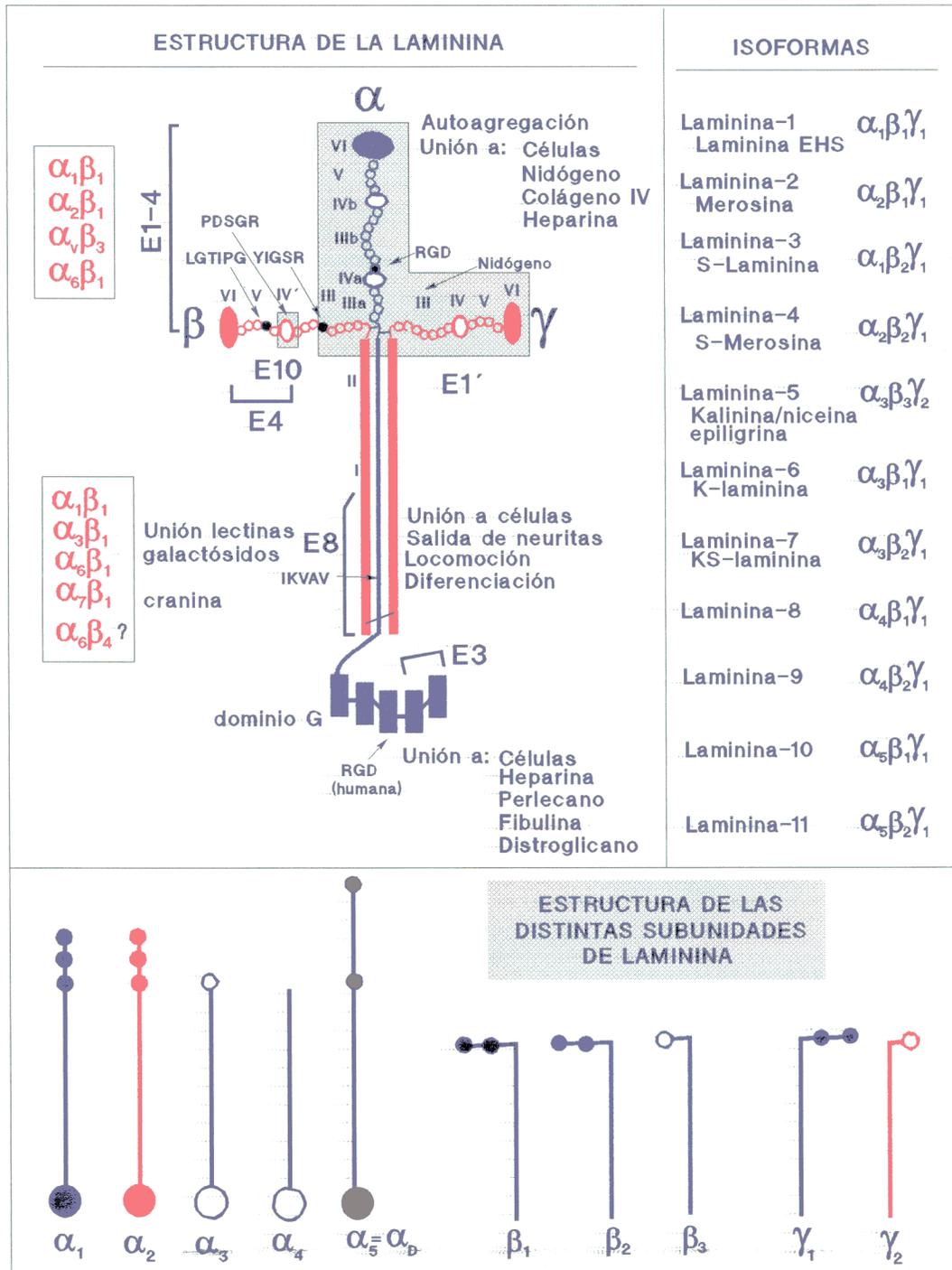


Figura 3.- Organización en dominios estructurales y funcionales e isoformas de la laminina.

Las tres cadenas α, β, γ de la laminina se asocian formando una estructura en forma de cruz latina. Los dominios estructurales de cada una de las cadenas se indican por números romanos. En el extremo del brazo largo se encuentra el dominio G. Cada uno de los brazos cortos contiene dominios globulares. Las secuencias de tipo EGF de los brazos cortos se representan por círculos. Sobre la molécula se recoge la localización de varios fragmentos activos (E1-4, E8, etc.), algunas secuencias de reconocimiento celular y las interacciones con diferentes componentes de la matriz extracelular y con las células. En la parte derecha se recoge la nomenclatura de las isoformas de esta molécula y la composición en cadenas polipeptídicas. Por microscopía electrónica y secuenciación de proteínas se ha observado que las lamininas-1, -2, -3 y -4 presentan una estructura similar. Las cadenas α_3 , β_3 y γ_2 , sin embargo, muestran deleciones en los brazos cortos pero, aparentemente, mantienen el dominio en hélice α largo y, en α_3 , un dominio G.

que contienen las subunidades completas (lamininas 1, 2, 3 y 4), y las que contienen una o más subunidades truncadas (lamininas 5-9) (Timpl, 1996). La pérdida de parte de alguna subunidad puede ser importante. Por ejemplo, muchas de las lamininas son capaces de autoensamblarse y formar redes, y unirse a otras proteínas como el nidógeno; pero la laminina-5 no puede realizar estas funciones a causa de la falta de los dominios responsables para estas interacciones (Yurchenco y Cheng, 1993; Pöschl *et al.*, 1994). Las analogías y diferencias entre las isoformas de laminina se representan esquemáticamente en la figura 3. Por ejemplo, las lamininas-2, -3 y -4 se diferencian de la laminina-1 por una nueva cadena α_2 o β_2 o ambas, que no produce un cambio significativo en la forma de la molécula. De las últimas isoformas descritas, la secuencia completa y la forma de ensamblaje de las cadenas α_4 y α_5 no se conocen todavía.

La diversidad de las lamininas parece tener un significado biológico. Así, la laminina-1 rodea al epitelio, mientras que la laminina-2 se encuentra asociada con fibras musculares (Sanes *et al.*, 1990). Por otro lado, en la unión neuromuscular, las cadenas α_1 y α_2 están presentes y la cadena β_2 reemplaza a la β_1 . La laminina-1 induce la adhesión y el crecimiento de muchos tipos de neuronas; la laminina-3 es adhesiva para neuronas motoras, pero impide el crecimiento de axones que es promovido por la laminina-1 (Porter *et al.*, 1995). Los filamentos de anclaje en las uniones epidermis-dermis contienen un complejo unido por puentes disulfuro de laminina-5 y laminina-6 (Burgeson, 1993), mientras que otras lamininas están presentes en la lamina densa. La laminina-5 promueve la migración de las células de carcinoma si se la compara con la laminina-1 (Kikkawa *et al.*, 1994). La existencia de diferentes isoformas puede indicar una evolución compleja y una adaptación a funciones diferentes con gran especificidad.

Relaciones estructura-función

Las lamininas, como componentes típicos de los basamentos membranosos, poseen distintos sitios de interacción para el resto de componentes de los basamentos membranosos gracias a su naturaleza multidominio (Martin y Timpl, 1987; Paulsson, 1993). Así, desempeñan una función clave en la formación y mantenimiento de la estructura tridimensional compleja necesaria para la función correcta de estas estructuras laminares (Yurchenco y O'Rear, 1994; Timpl, 1996). Las moléculas con las que las lamininas pueden interactuar aparecen recogidas en la tabla III. Además, su tamaño y forma hacen posible la unión de los basamentos membranosos a los receptores de la superficie celular. A través de estos receptores, las lamininas pueden ejercer una gran variedad de efectos sobre diversos procesos celulares (Tabla III).

Tabla III. Interacciones y actividades biológicas en las que participa la laminina

INTERACCIONES	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS
Nidógeno	Adhesión y extensión celular
Colágeno de tipo IV	Diferenciación celular
Proteoglicanos	Crecimiento celular y morfología
Heparina	Haptotaxis
Autoensamblaje	Aglutinación
Interacción con células	Ensamblaje de la matriz extracelular
	Metástasis de células tumorales

La clonación y secuenciación de las cadenas de la laminina ha permitido definir secuencias específicas responsables de las funciones de la proteína (Figura 3). La función de varias secuencias activas se ha puesto de manifiesto a través del uso de péptidos sintéticos (Kibbey *et al.*, 1992; Yamamura *et al.*, 1993; Bresalier *et al.*, 1996). Sin embargo, los péptidos sintéticos representan sólo una pequeña parte de los dominios de los que se derivan y pueden, por tanto, no presentar la estructura correcta o activa. Además, las funciones de la laminina son dependientes de la conformación. En particular, la función mitogénica del fragmento P1 se pierde después de la reducción de los puentes disulfuro y las actividades de adhesión celular y crecimiento neuronal del fragmento E8 se pierden después de su desnaturalización térmica.

Fibronectinas

La fibronectina es una glicoproteína multifuncional presente en la matriz extracelular, en forma insoluble, y en fluidos corporales, en forma soluble (Hynes, 1990; Akiyama *et al.*, 1995a,b). Es fundamental en procesos de adhesión celular y migración, en el mantenimiento de la morfología celular normal, en la organización del citoesqueleto, en procesos de hemostasis y trombosis, en reparación de heridas, en la embriogénesis y también en la diferenciación celular y en la transformación maligna.

La fibronectina contiene un 4-10% de hidratos de carbono, dependiendo del origen de la proteína. Se ha sugerido que los hidratos de carbono pueden protegerla frente a la proteólisis y controlan múltiples interacciones con células y con otras macromoléculas. La ausencia de hidratos de carbono incrementa la interacción de fibronectina con gelatina así como su capacidad para promover la adhesión y la extensión de fibroblastos.

Estructura

La molécula de fibronectina está formada por dos cadenas polipeptídicas que se asocian por puentes disulfuro cerca del extremo carboxilo terminal formando un dímero de masa molecular aproximada de 500 kDa (Skorstengaard *et al.*, 1986). En la figura 4 se recoge la estructura general de la fibronectina. Esta proteína muestra un carácter modular donde se repiten tres tipos distintos de módulos que difieren en su estructura primaria y secundaria. Cada cadena está constituida por 12 módulos de tipo I, 2 módulos de tipo II, y un mínimo de 15 repeticiones de tipo III, distribuidos en la molécula como se muestra en la figura 4. Algunos de los elementos que se repiten en la fibronectina aparecen también en otras proteínas. Por ejemplo, las secuencias de tipo I se encuentran en el activador del plasminógeno de origen tisular y en el factor XIIIa; las de tipo II en el factor XIIa, y las de tipo III, entre otras, en los colágenos de tipos VI, XII y XIV, en la tenascina y en la cadena β_4 de las integrinas.

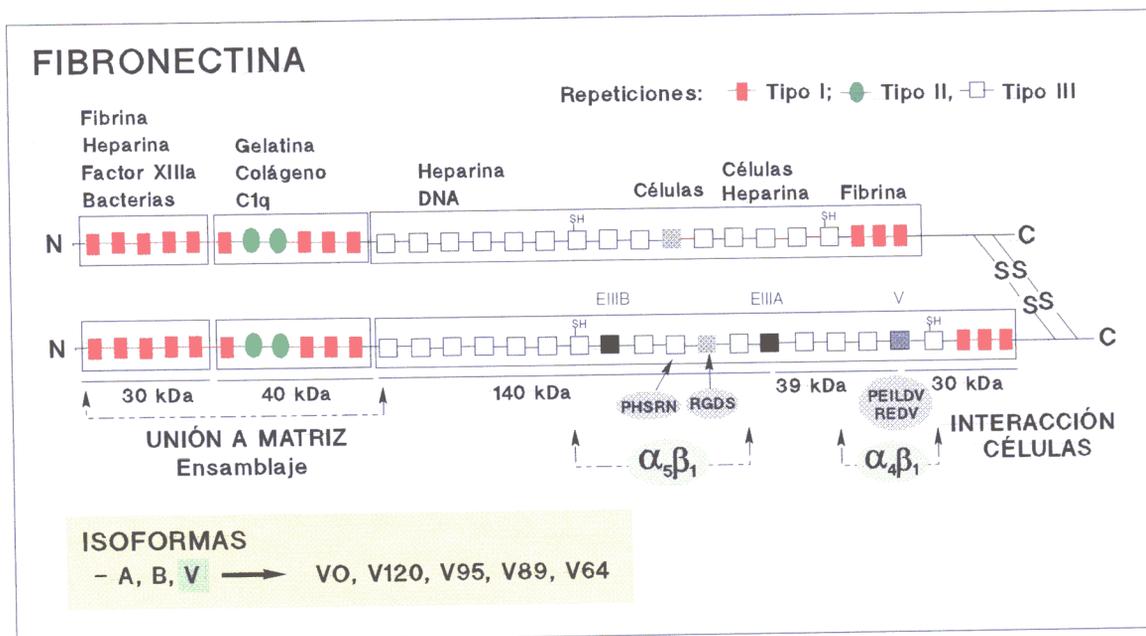


Figura 4.- Estructura modular de la fibronectina; organización de dominios estructurales y funcionales.

A lo largo de cada cadena polipeptídica que compone la fibronectina se repiten tres tipos de repeticiones estructurales diferentes (tipo I, II y III). La secuencia -RGD-, reconocida por las células, se encuentra en la décima repetición de tipo III. En la figura se muestra una molécula de fibronectina hipotética, con una cadena donde aparecen todos los módulos (se incluyen las regiones susceptibles de sufrir procesamiento alternativo: EIIIA, EIIIB y V) y otra carente de ellos. Los estudios con diferentes fragmentos de fibronectina que aparecen recuadrados en la figura, obtenidos por digestión proteolítica controlada, han permitido determinar las regiones funcionales y los lugares de unión específicos de diferentes moléculas y células. En la parte superior de una de las cadenas se detallan los ligandos que pueden interaccionar con la fibronectina. Para la heparina y la fibrina se ha descrito más de una localización de unión. La región amino-terminal parece implicada principalmente en la interacción con componentes de la matriz, mientras que la responsable de la interacción con células se localiza hacia el extremo carboxilo terminal de la molécula. La expresión del segmento variable V puede generar nuevos centros de interacción con células (-PEILDV-, -REDV-).

Los principales dominios funcionales de esta molécula aparecen en la figura 4. Dentro de la porción amino terminal de 70 kDa se encuentran diferentes sitios de unión; entre ellos, sitios para unión a fibrina, heparina, factor XIIIa, *Staphylococcus aureus*, y centros implicados en el ensamblaje de la matriz, probablemente a través del autoensamblaje de la fibronectina. El dominio de unión a colágeno/gelatina se encuentra localizado también en esta región. La parte central de la molécula está compuesta por repeticiones de tipo III y contiene sitios para interactuar con heparina y con células a través de dominios específicos.

Las diferencias que existen entre las cadenas de fibronectina del plasma (sintetizada por hepatocitos) y las secretadas por distintas células se deben a variaciones en el procesamiento postranscripcional del mRNA, lo que genera una variedad de isoformas derivadas del mismo gen. Se han identificado tres regiones susceptibles de sufrir un procesamiento alternativo (segmentos EIIIA, EIIB y el conector V) cuya expresión puede modificar parcialmente la función de la fibronectina. Los segmentos EIIIA y EIIB pueden estar presentes, como en la fibronectina sintetizada por diversos tipos celulares, o ser eliminados, como ocurre en la fibronectina plasmática (Hynes, 1990). Cinco variantes diferentes de fibronectina pueden obtenerse en función de que el segmento V sea eliminado, expresado parcial o completamente (Hershberger y Culp, 1990). Estas modificaciones confieren a la fibronectina propiedades diferentes, alterándose la solubilidad y la glicosilación, la sensibilidad a proteasas y generándose nuevos centros de unión a células. Según se exprese del segmento V se pueden introducir uno o dos sitios adicionales de unión a células y se puede afectar la actividad de unión a heparina. Además, este dominio contiene dos sitios de unión para O-oligosacáridos y uno para N-oligosacáridos lo que puede modificar las propiedades de adhesión de la fibronectina. Por el procesamiento del segmento EIIB, se introduce una localización sensible a la degradación proteolítica. La expresión de EIIIA es mayor en células transformadas y en tumores que en células normales de mamífero, sin embargo esto no ocurre, por ejemplo, en células de pollo.

La estructura multidominio de la fibronectina, como muchas otras proteínas de la matriz extracelular, le permite establecer interacciones no sólo con las células sino también con un gran número de macromoléculas, entre las que se encuentran la gelatina (colágeno desnaturalizado), diversos tipos de colágenos nativos, heparina, fibrina, trombospondina, DNA y actina. Los sitios de unión para estas macromoléculas se encuentran en dominios separados, por lo que la fibronectina puede generar múltiples interacciones simultáneas con células y con otras moléculas (Akiyama *et al.*, 1995b). Esto hace que la proteína pueda mediar en el control de distintas actividades biológicas (Tabla IV).

Dominio de unión a células

La fibronectina presenta al menos dos regiones de adhesión celular que pueden interactuar independientemente con distintos receptores de la superficie celular.

Tabla IV. Interacciones y actividades biológicas en las que participa la fibronectina

INTERACCIONES	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS
Colágenos, gelatina y poliaminas	Adhesión y extensión celular
Heparina	Proliferación y migración celular
Fibrina	Morfología celular y diferenciación
Autoensamblaje	Hemostasia y reparación de heridas
Interacción con células	Inflamación
Actina, DNA factor XIIa	Ensamblaje de la matriz de fibronectina
Bacterias	Metástasis de células tumorales

El primer sitio de adhesión celular de la fibronectina se localiza en la parte central de la proteína, en el décimo módulo de tipo III, en concreto en la secuencia -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser- (-GRGDS-) (Yamada y Kennedy, 1984; Pierschbacher y Ruoslahti, 1984a). Además, existe una secuencia adicional que actúa de manera sinérgica con el sitio RGD para promover la adhesión celular, la secuencia -Pro-His-Ser-Arg-Asn- (-PHSRN-) localizada en el módulo nueve de tipo III, que se conserva entre diferentes especies, lo que confirma su importancia funcional. El aminoácido crucial en dicha secuencia es la arginina, ya que incluso una sustitución conservativa de lisina por arginina da lugar a la pérdida de actividad adhesiva. Diversos estudios han indicado que los sitios PHSRN y RGD deben estar orientados o espaciados correctamente para favorecer al máximo la adhesión celular (Aota *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1995a). Puesto que la secuencia -RGD- no es específica de fibronectina, se intenta explicar la especificidad de las interacciones celulares con varias glicoproteínas a través de la implicación de secuencias próximas, o de elementos de adhesión distales, o de diferencias conformacionales. Por experimentos de inhibición de anticuerpos se ha podido determinar que ambos sitios, el RGD y el sinérgico, participan en la migración celular y en la organización del citoesqueleto de células sembradas sobre fibronectina, indicando que los dos sitios se requieren para un gran número de actividades de la glicoproteína.

Una segunda región de adhesión celular independiente se localiza cerca de la región carboxilo terminal, en el segmento conector o módulo V (Akiyama *et al.*, 1995a). Esta región participa en la adhesión de células de la cresta neural, células de melanoma y ciertos leucocitos. Al menos dos secuencias dentro de este módulo contienen actividad adhesiva. Las secuencias mínimas de reconocimiento de esta región son -Leu-Asp-Val- (-LDV-) y -Arg-Glu-Asp-Val- (-REDV-). Al contrario que las secuencias centrales -RGD- y -PHSRN-, las secuencias -LDV- y -REDV- no actúan sinérgicamente, sino que tienen un efecto aditivo en la adhesión celular (Akiyama *et al.*, 1995b).

1.3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROGRESIÓN TUMORAL

La interacción de la célula maligna con el basamento membranoso es un hecho fundamental en la invasión tumoral y señala el inicio de la cascada metastática (Fidler *et al.*, 1990; Liotta *et al.*, 1991; Heino, 1996). Como se ha comentado, durante este proceso es continua la presencia de barreras de tejido conectivo en muchos puntos claves de la cascada metastática: liberación de las células del tumor primario, intravasación y extravasación durante la diseminación por los vasos sanguíneos y en la invasión tisular.

Los basamentos membranosos no contienen poros que permitan la migración pasiva de las células tumorales. Así, las moléculas que componen los basamentos membranosos constituyen una barrera para las células no invasivas, pero también proporcionan sitios de adhesión para las células invasivas. Esta interacción célula-matriz, mediada por receptores de tipo integrina, puede inducir la expresión de metaloproteinasas de matriz, y permite a las células la migración a un nuevo entorno (Larjava *et al.*, 1993; Riikonen *et al.*, 1995; Rubin *et al.*, 1996). Además, hay que tener en cuenta que algunos de los productos de la degradación son quimiotácticos para las células tumorales, facilitando que éstas se dirijan hacia las zonas más debilitadas del tejido y que presentan menor resistencia.

En los procesos tumorales también suele tener lugar una síntesis alterada de componentes de la matriz extracelular. Este hecho, junto con su mayor degradación, da lugar a una desorganización, reduciéndose la oposición ejercida por los basamentos membranosos y por el estroma intersticial frente a la invasión maligna y facilitándose los procesos de migración celular asociados a la invasión tumoral y la formación de metástasis (Tryggvason *et al.*, 1987). Así, en tumores humanos se ha observado una expresión incrementada de proteoglicanos, fibronectina y tenascina, que pueden ser funcionalmente diferentes de las del tejido normal. Esto genera una matriz alterada y proporciona un entorno que permite la invasión de células tumorales o bien facilita la metástasis por modulación de la adhesión o controlando la proliferación de la célula tumoral. Los componentes individuales, laminina y fibronectina, parece que incrementan el fenotipo maligno *in vitro* (Kleinman *et al.*, 1993; Schiller y Bittner, 1995; Yudoh *et al.*, 1996) y promueven el crecimiento de la célula tumoral *in vivo* (Topley *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1994; Varner *et al.*, 1995).

1.4. DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La degradación de la matriz extracelular en un tejido normal, proceso organizado y muy regulado, se debe a la acción de proteasas específicas que degradan la mayoría de los componentes de la matriz (Birkedal-Hansen, 1995; Stetler-Stevenson, 1996). Las células malignas deben ser capaces de invadir el tejido que les rodea, aumentando así el tamaño de

la masa tumoral, y además deben ser capaces de cruzar dos, y en muchos casos tres basamentos membranosos para alcanzar el sitio secundario. Por tanto, las células con capacidad para interactuar y degradar los componentes membranosos los atravesarán más fácilmente, y formarán metástasis distantes del foco primario. Las proteinasas implicadas en la degradación de los basamentos membranosos pertenecen a las familias de las aspartil-, cisteín-, serín- y metaloproteinasas (Tabla V y VI).

Tabla V. Enzimas con actividad degradativa de la matriz extracelular

ENZIMA	SUSTRATOS E INHIBIDORES
METALOPROTEINASAS (MMPs)	(ver tabla VI)
SERÍN PROTEASAS	
Elastasa	Elastina. Gelatina. COL IV. Activa MMP1 y MMP3. [α_1 -PI]
Plasmina	Fibrina. COL IV y V. PG. LN. FN. Activa MMP1, MMP2, MMP3, prouroquinasa y pro-TGF- β . [α_2 -antiplasmina]
Activadores de plasminógeno	Plasminógeno. [PAI-1, PAI-2]
Catepsina G	LN. FN. PG. COL I. Activa a MMP3. [α_1 -PI]
Trombina	FN. LN. COL IV. Activa al plasminógeno. [Antitrombina].
CISTEÍN PROTEASAS	
Catepsinas B y H	LN. PG. FN. COL I, II, IV, V, IX y XI. Activa a MMP1. [Cistatinas]
Catepsina L	Elastina. PG. FN. LN. COL I, II, IV, V, IX y XI. [Cistatinas]
ASPARTIL PROTEASAS	
Catepsina D	LN. FN. PG. [α_2 -macroglobulina, pepstatina]
GLICOSIDASAS	
Heparanasa	Heparán sulfato. [α_2 -macroglobulina, inhibidor de heparanasa]
Hialuronidasa	Ácido hialurónico. [α_2 -macroglobulina, heparina, suramina]
β -D-Glucuronidasa	GAG, oligosacáridos de glicoproteínas.
N-Acetil- β -D-glucosaminidasa	GAG, oligosacáridos de glicoproteínas.
N-Acetil- β -D-galactosaminidasa	GAG, oligosacáridos de glicoproteínas.

Los inhibidores se indican entre []. COL, colágeno; FN, fibronectina; LN, laminina; PG, proteoglicano y GAG, glicosaminoglicano. TIMP-1 y TIMP-2, inhibidores tisulares de metaloproteinasas de tipo 1 y 2; α_1 -PI, α_1 -inhibidor de proteasas, PAI-1 y PAI-2, inhibidores del activador de plasminógeno de tipo 1 y 2.

Las **metaloproteinasas de la matriz** (MMPs) requieren los iones Zn^{2+} y Ca^{2+} para ser activas y tienen la capacidad de degradar a los componentes de la matriz extracelular a pH fisiológico. Estas enzimas se secretan como proenzimas y sufren una ruptura proteolítica en el dominio amino terminal durante su activación en el compartimento extracelular. Además, existen MMPs con un dominio transmembrana localizadas en la superficie celular, las MMP

TABLA VI. Clasificación de las metaloproteinasas de la matriz.

ENZIMA	MMP	kDa	SUSTRATOS [INHIBIDORES]
COLAGENASAS			
Colagenasa intersticial	MMP-1	52	Colágenos I, II, III, VII, VIII, IX y gelatina Entactina y tenascina. Agrecano, MMP-2, MMP-9. [TIMP-1>TIMP-2]
Colagenasa de neutrófilos	MMP-8	75	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X y gelatina Agrecano
Colagenasa-3	MMP-13	52	Colágeno I
GELATINASAS			
Gelatinasa A	MMP-2	72	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI Fibronectina y laminina. Agrecano, elastina, MMP-9. [TIMP-1>TIMP-2]
Gelatinasa B	MMP-9	92	Colágenos IV, V y gelatina Entactina, agrecano y elastina. [TIMP-2>TIMP-1]
ESTROMELISINAS			
Estromelisina-1	MMP-3	55	Colágenos II, III, IV, V, IX, X, XI y gelatina Fibronectina, laminina y tenascina Agrecano, elastina, MMP-1, MMP-8, MMP-9 [TIMP-1>TIMP-2]
Estromelisina-2	MMP-10	55	Colágeno IV. Agrecano y elastina
Estromelisina-3	MMP-11	61	No conocido
Matrilisina	MMP-7	28	Colágenos IV y gelatina Fibronectina, laminina, tenascina y entactina. Agrecano, elastina. MMP-1, MMP-2 y MMP-9
MMPs de MEMBRANA			
MT-MMP-1	MMP-14	66	MMP-2. [TIMP-1, TIMP-3]
MT-MMP-2	MMP-15	64	MMP-2
MT-MMP-3	MMP-16	72	No conocido
MT-MMP-4	MMP-17	70	No conocido
OTRAS MMPs			
Elastasa	MMP-12	54	Fibronectina y elastina
Metaloproteasa ácida	MMP-4	55	Proteoglicanos
Metaloproteasa neutra	MMP-6	35	Insulina y telopéptidos de colágeno

Se indican las metaloproteinasas de la matriz, agrupadas en diferentes subclases, el número de MMP asignado a cada una de ellas, su masa molecular (en kDa) y sus principales sustratos e inhibidores (entre []). TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3, inhibidores tisulares de metaloproteinasas de tipo 1, 2 y 3. En la actualidad se han identificado dos nuevas metaloproteinasas, la MMP-18, que se relaciona con las MMP-1, MMP-3, MMP-10 y MMP-11 (Cossins *et al.*, 1996) y la MMP-19 (Pendas *et al.*, 1996).

de membrana (MT-MMP). En la tabla VI se recogen las metaloproteinasas de la matriz identificadas hasta el momento. Se han identificado 19 miembros de la familia MMP (Birkedal-Hansen, 1995; Cossins *et al.*, 1996; Sang y Douglas, 1996; Pendas *et al.*, 1996). Entre estas enzimas existe un solapamiento en la especificidad de sustrato *in vitro*; sin embargo, su especificidad *in vivo* se desconoce. También es posible que algunas MMP sean isoenzimas de otras, diferenciándose principalmente en sus patrones de expresión (Crawford y Matrisian, 1994-95).

Estas actividades degradantes son críticas en procesos fisiológicos que implican remodelación e invasión tisular (cicatrización de heridas y fracturas, angiogénesis, inflamación, desarrollo del intestino delgado, morfogénesis de la glándula salivar, embriogénesis, ciclo del endometrio, etc.) (Ries y Petrides, 1995). Todos son procesos limitados que preservan la integridad y la función de la matriz. Sin embargo, en condiciones patológicas, las alteraciones en la matriz extracelular son más extremas y originan cambios en la distribución, composición y función de la matriz. La expresión de MMPs se ha relacionado con procesos patológicos que implican destrucción de los tejidos, como invasión y metástasis de células tumorales, y artritis reumatoide (Ries y Petrides, 1995; Basbaum y Werb, 1996; Coussens y Werb, 1996). La sobreexpresión de MMPs se ha asociado con la progresión maligna en carcinomas humanos de pulmón, próstata, estómago, colon, mama, ovario, tiroides, cabeza y carcinoma escamoso de cuello (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Las MMPs están reguladas de diferentes formas: transcripcionalmente por factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y oncogenes; postranscripcionalmente por alteraciones en la estabilidad del mRNA y, postraduccionalmente, por su secreción bajo la forma de proenzimas. Además, también se regula la degradación de las enzimas activas. Por otro lado, las MMPs pueden inhibirse por inhibidores de proteasas generales y por inhibidores tisulares específicos. Los inhibidores de MMPs son proteínas multifuncionales que tienen también capacidad para modular la proliferación celular. Se les conoce como TIMPs o inhibidores tisulares de metaloproteinasas, y son capaces de bloquear la invasión tumoral y la metástasis tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas múltiples formas de regulación implican que los niveles y la actividad de MMP están cuidadosamente controlados en procesos fisiológicos. Sin embargo, en la invasión y metástasis tumoral parece que existe una expresión y activación excesiva de MMPs (Brown *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1993a,b). Los dominios estructurales de estas MMPs, así como las formas de regulación y su actividad, se esquematizan en la figura 5.

La importancia de las MMPs en la progresión tumoral y metástasis se ha puesto de manifiesto en diferentes tipos de estudios, por ejemplo, utilizando los inhibidores tisulares (TIMPs) (Khokha *et al.*, 1992a,b; Chirivi *et al.*, 1995). Se ha descrito que existe una correlación directa entre la expresión de MMPs en células y el comportamiento invasivo y

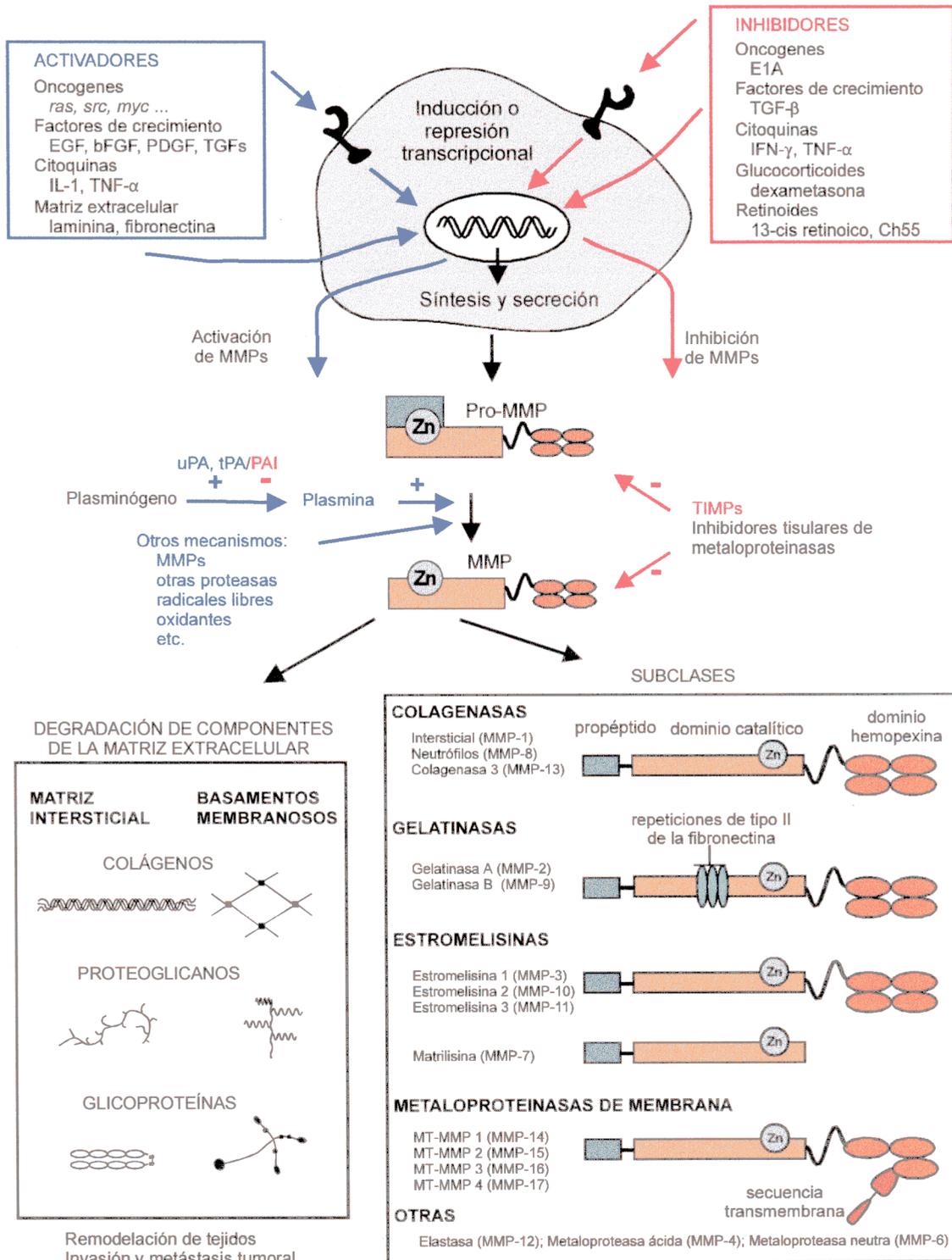


Figura 5.- Estructura y control de la actividad de las metaloproteinasas (MMPs).

Se recoge la estructura de las MMPs y sus distintas formas de regulación. La síntesis de la proenzima está controlada por diferentes inductores o represores. La activación de la proenzima se produce por eliminación del propéptido por acción de proteasas. La interacción de las MMPs con inhibidores específicos (TIMPs) conduce a su inactivación. Las distintas MMPs difieren en la presencia o ausencia del dominio tipo hemopexina, de las repeticiones tipo II de la fibronectina o de la existencia de un dominio transmembrana.

metastático de las mismas en modelos animales (Sreenath *et al.*, 1992; Powell *et al.*, 1993). La producción incrementada o *de novo* de MMP, o una mayor activación de éstas, se asocia con estados avanzados de muchos cánceres (Azzam *et al.*, 1993; Newel *et al.*, 1994; MacDougall *et al.*, 1995). Otros estudios sugieren que las MMPs afectan a la proliferación inicial de las células, actuando no tanto en el proceso de la extravasación, sino en el posterior crecimiento (Koop *et al.*, 1994; Witty *et al.*, 1994). Todo ello sugiere que la producción de MMPs puede influir en estadios tempranos, intermedios y últimos de la progresión tumoral.

En estudios inmunohistoquímicos se ha observado que la expresión de las MMPs puede tener lugar en las células transformadas o en las células del estroma. Por lo tanto, puede ser que las células cancerígenas produzcan las metaloproteinasas por sí mismas, o induzcan a otras células a producirlas. Experimentos *in vitro* muestran que la interacción de células transformadas con la matriz pueden inducir la síntesis de MMPs (Larjava *et al.*, 1993; Riikonen *et al.*, 1995; Chintala *et al.*, 1996). Esto sugiere que la expresión por las células tumorales debe ser limitada y que tiene lugar sólo durante el corto período en que las células se adhieren a ligandos extracelulares. Los patrones de expresión *in vivo* de las MMPs en tumores indican que la expresión de estas proteinasas por parte del estroma está implicada en la invasión tumoral, mientras que la expresión por las células tumorales es importante para la metástasis (Poulson *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 1994).

Puesto que en tejido normal prácticamente no se expresan MMPs, debe existir algún mecanismo responsable de su inducción. En tejidos tumorales parece ser que la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores de tumores, junto con la interacción con la matriz, originan de manera directa o indirecta la expresión de MMPs por las células tumorales. Las células del estroma expresan MMPs en respuesta a mediadores solubles secretados por las células tumorales o por células inflamatorias infiltradas, por contacto célula tumoral-fibroblastos del estroma, o por cambios en la arquitectura del tejido y en la matriz extracelular (Kataoka *et al.*, 1993; Himelstein *et al.*, 1994). Al degradarse la matriz se liberan o activan factores de crecimiento. Por otro lado, las alteraciones de las interacciones célula-célula y célula-matriz originan cambios celulares que pueden provocar un incremento en la proliferación. En algunos tumores, además de los fibroblastos, también las células endoteliales liberarían MMPs y esto influiría en la invasión de los capilares (Autio-Harminen *et al.*, 1993; Pyke *et al.*, 1993).

1.5. RECEPTORES DE ADHESIÓN CELULAR

La adhesión celular es un proceso crítico para la célula, ya que permite el anclaje, la migración y la iniciación de señales para el crecimiento y la diferenciación. La adhesión

celular es también un proceso clave de la cascada metastática puesto que, además de ser fundamental durante el proceso de angiogénesis (Stromblad y Chersesh, 1996), tienen lugar interacciones de diferentes clases: célula tumoral- matriz extracelular, célula tumoral-célula tumoral y célula tumoral-célula huésped (plaquetas, leucocitos y células endoteliales) (Weiss 1994-95; Tang y Honn, 1994-95). De hecho, en varios estados de la progresión tumoral y la metástasis se han implicado a distintos miembros de las familias de receptores de adhesión (integrinas, cadherinas, inmunoglobulinas y selectinas) además de moléculas que también presentan propiedades adhesivas, como lectinas y proteoglicanos (Honn y Tang, 1992; Bevilaqua y Nelson, 1993; Rubin *et al.*, 1996).

En células transformadas, cuando se las compara con células normales del mismo tejido, se observa tanto la sobreexpresión como la disminución/supresión de la síntesis de proteínas de adhesión. Por tanto, es posible que las modificaciones sean necesarias para que tenga lugar la motilidad, invasión y metástasis de la célula maligna. En este sentido, se han descrito numerosos ejemplos en los que las interacciones célula-célula se modifican. Por ejemplo, en carcinomas, la supresión de la expresión de la E-cadherina es uno de los primeros cambios que tienen lugar en las células de epitelio transformadas y, como consecuencia se origina la pérdida de contactos célula-célula, paso esencial en la progresión tumoral. Sin embargo, la expresión de CEA y CD44 se incrementa en este mismo tipo de tumores. La sobreexpresión y la liberación de CEA al espacio intercelular de células tumorales adyacentes desestabiliza las interacciones célula-célula. Por otro lado, la sobreexpresión de ciertas isoformas del CD44 hace que tengan mayor importancia las interacciones célula-matriz que las interacciones célula-célula (Jothy *et al.*, 1995).

La ruptura de la estructura epitelial, por disminución en la adhesión entre células tumorales y células-matriz, origina la liberación de las células tumorales del tumor primario ya que se promueve la motilidad celular. Esto favorece la migración de las células tumorales a través del basamento membranoso, desde el sitio donde originalmente proliferan al estroma que rodea al tumor. Una vez alcanzado este estado, el carcinoma ha progresado de un crecimiento *in situ* relativamente benigno, a uno más invasivo (Jothy *et al.*, 1995).

Las células metastáticas expresan frecuentemente receptores de adhesión no presentes en las células normales, que facilitan su interacción con la pared de los vasos y con la matriz. Este fenómeno, denominado expresión ectópica, es una expresión que se considera anormal, como es el caso de la expresión de las integrinas $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ y $\alpha_{\text{L}}\beta_2$ y de las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas PECAM-1, ICAM-1 y N-CAM, en tumores sólidos.

Las interacciones célula tumoral-célula endotelial son claves en la preferencia de órgano de la metástasis. En los vasos, las células tumorales se adhieren a la monocapa de células del endotelio reconociendo receptores en dichas células. Normalmente están implicados

mecanismos de reconocimiento carbohidrato-carbohidrato, carbohidrato-selectina, y proteína-proteína. Esta adhesión célula-célula da lugar a la activación de las células tumorales y/o endoteliales, incrementándose la expresión de ciertos receptores de adhesión, generalmente integrinas, lo que conduce a una unión más fuerte entre las células tumorales y el endotelio (Tang y Honn, 1994-95). La expresión de selectinas por células endoteliales incrementa la adhesión de células tumorales y la metástasis experimental (Bevilaqua y Nelson, 1993).

1.5.1. Integrinas

Las integrinas son los principales receptores celulares por los que las células se adhieren a su entorno (matriz extracelular) y a otras células, pero también son esenciales durante el desarrollo, en la migración celular y en la invasión de las células tumorales (Varner y Cheresch, 1996; Sheppard, 1996; Rubin *et al.*, 1996). A estos receptores se les denominó integrinas ya que integran el citoesqueleto de la célula a la matriz extracelular. Las integrinas están implicadas en varias enfermedades lo que demuestra su importancia en procesos fisiológicos y patológicos. La capacidad para interferir en las funciones de las integrinas con anticuerpos anti-integrina o péptidos sintéticos ofrece numerosas oportunidades para la intervención terapéutica en enfermedades como trombosis, inflamación y cáncer.

Estructura

Las integrinas son heterodímeros de subunidades α y β , glicoproteínas transmembrana, unidas no covalentemente. Se han identificado al menos 16 subunidades α y 8 subunidades β diferentes, que al combinarse forman las 22 integrinas identificadas hasta el momento. Inicialmente las integrinas se clasificaron en subfamilias en función de la cadena β que contenían. Sin embargo, mientras que alguna subunidad α se une a una única subunidad β , algunas subunidades α se asocian con varias cadenas β . Además, el número de miembros de esta familia se podría incrementar si se considera que varias subunidades pueden sufrir un procesamiento alternativo en el dominio citoplasmático. En la figura 6 se recoge la asociación de las cadenas α y β de las distintas integrinas. Las características estructurales generales son similares para todas ellas, presentando un gran dominio extracelular globular, un dominio transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático de menos de 60 aminoácidos conectado al citoesqueleto (Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992). Sin embargo, la cadena β_4 presenta un dominio citoplasmático de alrededor de 1000 aminoácidos (Hogervorst *et al.*, 1990; Tamura *et al.*, 1990). El sitio de unión al ligando parece estar formado por secuencias de las regiones N-terminales de las dos subunidades α y β .

Todas las subunidades β presentan en el extremo amino terminal cuatro repeticiones de un segmento rico en cisteínas, con numerosos puentes disulfuro internos, que forma parte del dominio de unión al ligando (Calvete *et al.*, 1991). Todas las subunidades α contienen

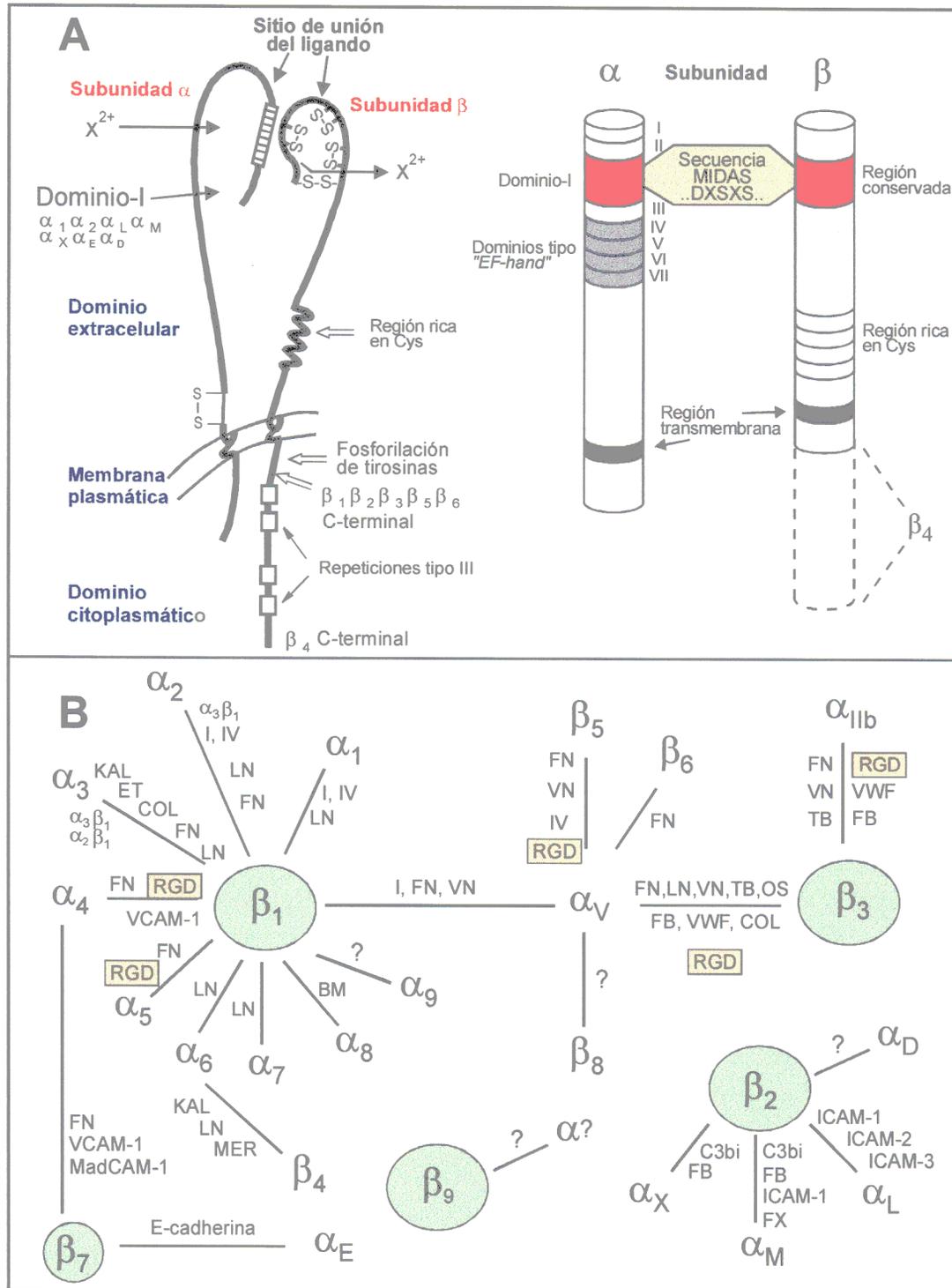


Figura 6.- Superfamilia de las integrinas.

(A) Características estructurales y dominios presentes en las integrinas. En la región extracelular las subunidades α (en el dominio I) y β contienen secuencias MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*). Los dominios V-VII de la subunidad α , en integrinas que contienen el dominio I (o IV-VII en otros), presentan secuencias tipo *EF hand* de unión a cationes divalentes. (B) Superfamilia de las integrinas. Las líneas indican las integrinas $\alpha\beta$ y sobre ellas se representan los ligandos reconocidos por éstas: Col (colágeno), I y IV (colágenos de tipo I y IV), LN (laminina), KAL (kalinina), MER (merosina), FN (fibronectina), ET (entactina), VN (vitronectina), OS (osteopondina), TB (trombospondina), FB (fibrinógeno), VWF (factor con Willebrand), C3bi (factor del complemento), BM (basamento membranoso), MadCAM-1 (molécula de adhesión celular de tipo adresina de la mucosa), VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular tipo 1), FX (factor X), ICAM- (molécula de adhesión intercelular), ? (ligando desconocido). RGD, la interacción con el ligando es a través de RGD.

siete repeticiones de un segmento homólogo. Las últimas tres o cuatro repeticiones contienen secuencias (-Asp-X-Asp-X-Asp-Gly-X-X-Asp- o similares) que participan en las propiedades de unión a cationes divalentes de estas subunidades. Esta región de la subunidad α también forma parte del dominio de unión al ligando. La naturaleza de los cationes, que son fundamentales para la función de las integrinas y necesarios para la asociación de las subunidades $\alpha\beta$ de algunas integrinas, pueden afectar a la afinidad y a la especificidad por los ligandos (Mould *et al.*, 1995a; Humphries, 1996). La sustitución del metal de coordinación origina cambios conformacionales en la proteína que afectan a la región implicada en la unión al ligando lo que puede conducir a una modificación en la adhesión celular y de la actividad de la integrina (Mould, 1996).

Las integrinas pueden unir a más de un ligando, y los ligandos normalmente son reconocidos por más de una integrina (Figura 6). La mayoría de los ligandos son proteínas de la matriz extracelular implicadas en la adhesión célula-sustrato. Sin embargo, algunos ligandos como el fibrinógeno son factores solubles. También pueden mediar la adhesión directa célula-célula. Así, algunas integrinas reconocen proteínas integrales de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1).

El patrón de expresión de integrinas varía enormemente dependiendo de los diferentes tipos celulares. Algunas líneas celulares de mamíferos expresan sólo unas pocas integrinas, mientras que otras pueden tener hasta diez. Las integrinas $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$, que se expresan preferentemente en células epiteliales, son receptores para laminina (Rabinovitz *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1996; Nista *et al.*, 1996). Por otro lado, las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$ se detectan en células con capacidad para migrar (Albelda, 1993). Algunos tipos celulares expresan integrinas altamente especializadas, como la integrina $\alpha_{Ib}\beta_3$, de megacariocitos y plaquetas, que participa en la agregación plaquetaria. Del mismo modo, las integrinas β_2 se expresan sólo en leucocitos y median la extravasación de leucocitos y la inflamación.

En células transformadas se han detectado cambios en la expresión de diferentes integrinas con respecto a la de las células normales. Sin embargo, la heterogeneidad de resultados hace difícil establecer una relación clara entre el grado de malignidad y el patrón de expresión de integrinas. En general, el fenotipo maligno se relaciona con una alteración en el nivel y/o tipos de integrinas expresadas. En la conversión de células epiteliales a un estado maligno, además, se suele producir una alteración en la distribución de las integrinas, pasando de una distribución polarizada a una localización más difusa.

Ligandos de las integrinas y secuencias de reconocimiento

Las integrinas presentan especificidad de unión a los diferentes ligandos de la matriz extracelular, como queda recogido en la figura 6. Algunas integrinas son bastante específicas, como la $\alpha_5\beta_1$, que interacciona sólo con fibronectina. Sin embargo, una integrina puede interaccionar con diferentes ligandos (especificidad superpuesta), ya que reconocen en los ligandos secuencias cortas presentes en diferentes proteínas. Además, una célula puede expresar dos o tres integrinas capaces de reconocer el mismo ligando. Este comportamiento parece ser redundante en cuanto a adhesión celular. Sin embargo, dos integrinas que unen el mismo ligando pueden no desempeñar la misma función en la célula ya que diferentes subunidades α/β pueden transmitir señales distintas de la matriz extracelular al interior celular. Las integrinas no siempre reconocen a todos los ligandos que se han descrito en la bibliografía para ellas, sino que las células que las expresan pueden regular su especificidad. Por ejemplo, la integrina $\alpha_2\beta_1$, expresada en plaquetas es receptor de colágeno, pero en otras células se une además a laminina y fibronectina.

La mayoría de las integrinas reconocen la secuencia -RGD- presente en las glicoproteínas de adhesión. La conformación de la región donde se encuentra dicha secuencia parece ser fundamental para el reconocimiento específico de las diferentes integrinas (Ruoslahti, 1996). En la mayoría de las secuencias de reconocimiento es de destacar una característica común, la presencia de un residuo de aspartato en todas ellas. Este grupo funciona en adhesión celular proporcionando un grupo de coordinación alternativo en las integrinas para quelar el catión divalente (Humphries, 1996).

La función de las integrinas se puede modular, pudiendo encontrarse éstas en un estado activo o inactivo (Mould *et al.*, 1995a; Humphries, 1996; Mould, 1996). De esta manera, la especificidad y la afinidad de una integrina concreta sobre una célula dada no es siempre constante, sino que depende de su estado activo-inactivo. Algunas integrinas necesitan ser activadas para poder unir a su ligando, como es el caso de la integrina de plaquetas $\alpha_{IIb}\beta_3$ o las integrinas β_2 de neutrófilos. La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ puede ser activada por anticuerpos contra el receptor, por el propio ligando, o por la activación de plaquetas. Este proceso es similar para las integrinas β_2 , deben activarse, no uniéndose al ligando en caso contrario. La activación de las integrinas parece que se origina por cambios conformacionales (Mould, 1996). Por otro lado, una integrina puede regular la función de otra. Por ejemplo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ puede regular la función del receptor de fibronectina $\alpha_5\beta_1$ (Blystone *et al.*, 1994). También, la inducción por fibronectina de la expresión de genes de metaloproteinasas vía integrina $\alpha_5\beta_1$ se inhibe fuertemente por interacciones mediadas por el receptor de fibronectina $\alpha_4\beta_1$ (Huhtala *et al.*, 1995).

Funciones de las integrinas

Las integrinas participan en los procesos de ensamblaje y remodelación de la matriz, permitiendo a las células su adhesión. Un ejemplo es la integrina $\alpha_5\beta_1$ que es necesaria para que las células de ovario de hámster chino depositen fibronectina en la matriz (Ruoslahti, 1994-95). También en este proceso se ha implicado a la integrina $\alpha_3\beta_1$ (Wu *et al.*, 1995). El mecanismo por el que ocurre este proceso se desconoce, pero puede que la integrina concentre la fibronectina en la superficie celular y cambie su conformación de manera que pueda ser incorporada en fibrillas. Otra integrina, $\alpha_v\beta_1$, que se une al mismo sitio RGD en la fibronectina que $\alpha_3\beta_1$ y también media la adhesión, sin embargo, no participa en el ensamblaje de la matriz. Por otro lado, la integrina $\alpha_2\beta_1$ es el receptor que usan las células para moldear los geles de colágeno por contracción (Chan *et al.*, 1992).

Las integrinas median la adhesión de las células a la matriz extracelular, lo que tiene consecuencias importantes, ya que muchos tipos celulares sólo sobreviven y proliferan si se encuentran adheridos a una superficie. También están implicadas en la migración celular, determinando la dirección, velocidad y diana final de dicho proceso. Los movimientos celulares que tienen lugar durante la reparación tisular pueden depender de interacciones mediadas por integrinas. Lo mismo ocurre con el efecto de los componentes de la matriz extracelular en la diferenciación celular.

Las integrinas, además de mediar la adhesión celular durante el proceso invasivo y metastático, pueden transmitir señales de la matriz extracelular al interior celular. De esta manera participan en una gran variedad de procesos celulares que influyen en el desarrollo tumoral, incluyendo la regulación de la proliferación y la apoptosis, la motilidad celular y la invasión, la localización en la superficie celular de MMPs y la angiogénesis (Varner y Cheresch, 1996).

Integrinas y transmisión de la señal

Los cambios en la morfología y en el comportamiento celular que ocurren al interaccionar las células con la matriz a través de las integrinas, hacen pensar que estos receptores funcionan como transductores de las señales extracelulares. Los dominios intracelulares de las subunidades de las integrinas están conectados a proteínas del citoesqueleto y a rutas de transmisión de señales. Un esquema de las principales proteínas implicadas en dicha transmisión aparece en la figura 7.

El agrupamiento de las integrinas, inducido por la matriz extracelular, y las interacciones intracelulares de las integrinas con el citoesqueleto cooperan para inducir la formación de los sitios de adhesión (contactos focales) y la transmisión de la señal. Estos receptores activan las rutas de transmisión de la señal identificadas inicialmente para factores

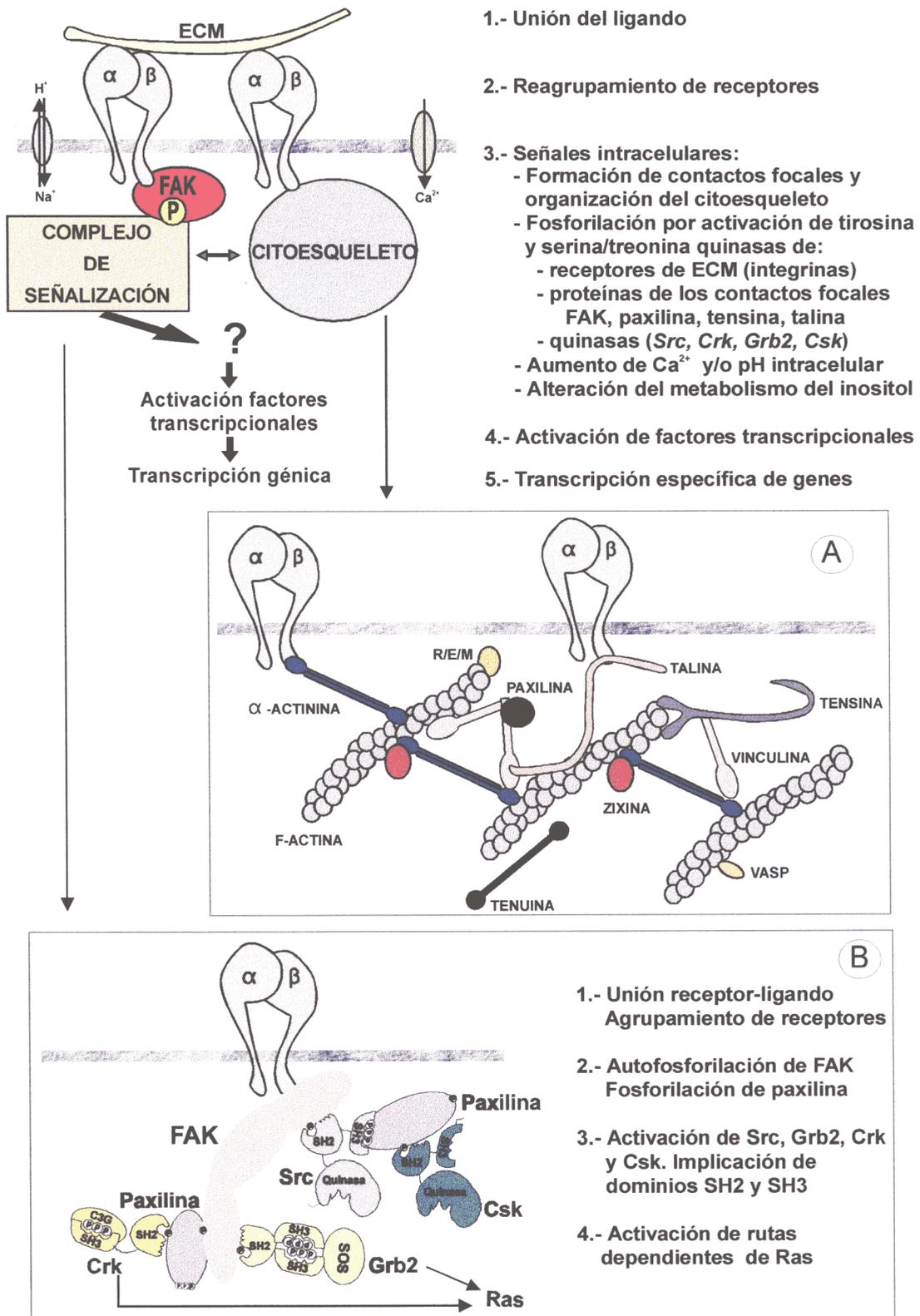


Figura 7.- Transmisión de la señal dependiente de integrinas.

Etapas implicadas en la transmisión de la señal al interior de la célula tras la interacción integrina-ligando. (A) Formación de contactos focales y organización del citoesqueleto. (B) Fosforilación por activación de la proteína pp125^{FAK} o FAK (*Focal Adhesion Kinase*). La autofosforilación de la FAK puede originar el reagrupamiento y la activación de otras tirosina quinasas (*Crk*, *Grb2*, *Src*, *Csk*) y la fosforilación de paxilina.

de crecimiento y citoquinas. Las integrinas inducen señales que incluyen el influjo de Ca^{2+} , intercambio de protones, fosforilación de proteínas, alteraciones en el metabolismo de los fosfoinosítidos, activación de la proteína quinasa MAP (*mitogen-activated protein*), cambios en la expresión génica y estimulación de la respuesta mitogénica (Richardson y Parsons, 1995; Yamada y Miyamoto, 1995; Dedhar y Hanningan, 1996).

El mecanismo por el cual se desarrolla la transmisión de la señal parece implicar al dominio citoplasmático de las integrinas. Ésta se une a una o más quinasas que inician la cascada de señales después de la ocupación de integrinas y/o la agregación. Una proteína tirosina quinasa, la quinasa de adhesión focal o FAK (*Focal Adhesion Kinase*; pp120^{FAK}) se une al dominio citoplasmático de β_1 (Schaller y Parsons, 1994) y se coagrupa con agregados de esta integrina (Miyamoto *et al.*, 1995). Los estudios realizados con proteínas quimeras que contienen sólo el dominio citoplasmático de la integrina β_1 indican que este dominio es suficiente para la fosforilación de FAK (Lukashev *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1994). Otras subunidades β , como β_3 y β_5 , también producen la fosforilación de FAK después de su agrupamiento, pero otras formas de procesamiento alternativo de β_3 no lo hacen, indicando que este efecto es específico de ciertas subunidades β . La FAK fosforila a proteínas del citoesqueleto, como la paxilina e interacciona con la tirosina quinasa src; también están implicadas en la transmisión de la señal otras tirosinas quinasas de la familia src. Un esquema del mecanismo propuesto se recoge en la figura 7. Si se producen los tres efectos, ocupación, agregación y fosforilación de tirosinas, se obtiene un efecto máximo, con la asociación de F-actina y otras proteínas del citoesqueleto (Yamada y Miyamoto, 1995).

1.6. EL CÁNCER DE COLON

Uno de los cánceres más comunes en los países occidentales es el colorrectal, con una alta incidencia y mortalidad, a pesar de los avances en el diagnóstico, las técnicas quirúrgicas y formas de terapia. En España este tipo de cáncer afecta a 20-30 personas de cada 100.000; es la segunda causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón en el hombre y del cáncer de mama en la mujer (Cortés *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta el material biológico y el estudio planteado en esta Memoria, se ha considerado oportuno incluir algunos apuntes sobre los tipos de cáncer colorrectal, y algunas de las alteraciones genéticas descritas en esta patología, que puedan reflejar la complejidad de las alteraciones observadas. Sin embargo, sólo ciertos aspectos de los que a continuación se presentan han sido objeto de este estudio.

La carcinogénesis colorrectal es un proceso complejo, resultado de numerosas alteraciones genéticas e influencias medioambientales, que conducen tanto a mutaciones somáticas como hereditarias. Estas mutaciones dan lugar a la activación de protooncogenes,

que actúan predominantemente, o a la inactivación de genes supresores de tumores. Se han descrito dos formas hereditarias de cáncer de colon con diferente etiología molecular, la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal no-poliposo hereditario, que darían cuenta del 5%-15% de los casos de cáncer de colon. El resto de los casos se consideran esporádicos (Burt *et al.*, 1995; Kinzler y Vogelstein, 1996). Los factores hereditarios determinan la predisposición de cada individuo a desarrollar el cáncer de colon, mientras que la exposición a factores ambientales específicos determinan que los individuos desarrollen adenomas pequeños, grandes o finalmente cáncer de colon (Burt, 1996).

La **poliposis adenomatosa familiar (FAP)** es un síndrome dominante autosómico en el que se produce una pérdida alélica en el cromosoma 5q, afectándose el gen *apc* (*adenomatous polyposis coli*; localizado en el cromosoma 5q21). Se caracteriza por el desarrollo de numerosos tumores poliposos benignos, algunos de los cuales pueden llegar a ser malignos (Kinzler y Vogelstein, 1996). El paso limitante en la iniciación del tumor es la mutación somática que tiene lugar en el alelo de tipo salvaje *apc* heredado del progenitor no afectado (Levoy *et al.*, 1994; Luongo *et al.*, 1994). El gen *apc* codifica a una proteína que media la adhesión celular y participa en el control de la proliferación de las células epiteliales del colon (Rubinfeld *et al.*, 1993). La mutación en este gen hace que se sintetice una proteína truncada, inactiva, y que se incremente la división celular (Caspari *et al.*, 1994). Alteraciones en el gen *apc* también se han descrito en cánceres esporádicos no familiares (Kinzler y Vogelstein, 1996) pero, mientras que en personas con FAP una lesión es heredada y la otra ocurre somáticamente, en personas con tumores esporádicos, ambas ocurren somáticamente (Astrin y Costanzi, 1989).

El **cáncer colorrectal no-poliposo hereditario (HNPCC)** se ha detectado en familias en las que existe una predisposición dominante autosómica al cáncer colorrectal en ausencia de los adenomas o tumores benignos detectados en FAP (Lynch *et al.*, 1996; Kinzler y Vogelstein, 1996). Lynch lo clasificó en dos categorías: de tipo I, específico de sitio, sólo se genera cáncer de colon; de tipo II, donde las personas afectadas desarrollan, además, tumores de mama, endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto renal superior y probablemente en otros sitios (Watson y Lynch, 1993). En una tercera categoría, variante del síndrome de Lynch de tipo II, también desarrollan lesiones malignas y benignas en la piel.

Se ha establecido una relación entre HNPCC y alteraciones en los cromosomas 2p y 3p (Sandkuijl y Bishop, 1993; Lindblom *et al.*, 1993). Parece que los genes implicados participarían directamente en la replicación o en la reparación del DNA, ya que se ha encontrado inestabilidad genética en tumores HNPCC. Los genes *hMSH2* y *hMLH1*, junto con los genes *hPMS1* y *hPMS2*, parecen ser los implicados (Fishel *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994; Nicolaidis *et al.*, 1994).

Los familiares en primer grado de personas afectadas de **cáncer colorrectal esporádico** tienen un mayor riesgo de sufrir este tipo de cáncer que el resto de la población (Lovett, 1976). Esto sugiere que debe existir una predisposición genética al cáncer colorrectal común. No se conocen los genes implicados, pero se podría tratar de mutaciones benignas en los genes responsables de la FAP y HNPCC. Así, se ha descrito una forma atenuada de FAP, donde el gen *apc* se encuentra mutado en el extremo final proximal, en la que se observa un menor número de adenomas, produciéndose el desarrollo de adenomas y cáncer en una edad más avanzada (Spirio *et al.*, 1993).

Los factores medioambientales y, en particular, la dieta desempeñan un importante papel en la formación del cáncer colorrectal (Potter *et al.*, 1993; Giovannucci y Willett, 1994). Algunos de los genes afectados parecen ser los que codifican a sistemas enzimáticos implicados en la detoxificación de carcinógenos y otras sustancias. Existe un fenotipo particular, que está determinado por el locus acetilador (para la detoxificación de arilaminas, presentes en los alimentos precocinados). Individuos con un fenotipo acetilador rápido presentan un riesgo de cáncer colorrectal dos veces superior con respecto al fenotipo lento (Turesky *et al.*, 1991; Kadlubar *et al.*, 1992). También se ha encontrado que un fenotipo carente de glutatión S-transferasa M1 (implicada en catalizar la conjugación de una variedad de carcinógenos y drogas citotóxicas con el glutatión) está asociado con un riesgo incrementado de cáncer colorrectal (Zhong *et al.*, 1993). Otros estudios apuntan a los lípidos como componentes de la dieta críticos para el desarrollo del cáncer colorrectal, lo que justificaría que esta enfermedad se asocie con dietas ricas en carne roja (Giovannucci y Willett, 1994). En este proceso parece estar implicado el gen que codifica a la fosfolipasa A2 (MacPhee *et al.*, 1995).

Alteraciones somáticas en oncogenes

El cáncer surge, en parte, de la acumulación de cambios genéticos en una célula. Estas alteraciones genéticas incluyen la activación de oncogenes celulares a través de una mutación y la inactivación de genes supresores de tumor por mutación y/o delección. Los estudios en tumores colorrectales demuestran que la acumulación progresiva de cambios genéticos en oncogenes y en genes supresores de tumores es paralela a la progresión clínica de tumores colorrectales del epitelio normal a tumores benignos, y más tarde al estado maligno de la enfermedad (Kinzler y Vogelstein, 1996). Un esquema con algunas de las alteraciones cromosómicas más frecuentes detectadas en cáncer colorrectal se recogen en la figura 8. Entre ellas se pueden destacar hipometilación en el DNA, mutaciones en *ras*, sobreexpresión de *c-myc* y *c-src*, pérdida de heterocigosis en el cromosoma 17p (gen *p53*), 18q (gen *dcc*), y 5q (genes *mcc* y *apc*), alteraciones en el cromosoma 2p y en la regulación de la proteína quinasa C (Guillem *et al.*, 1995; Jhanwan y Gerder, 1995).

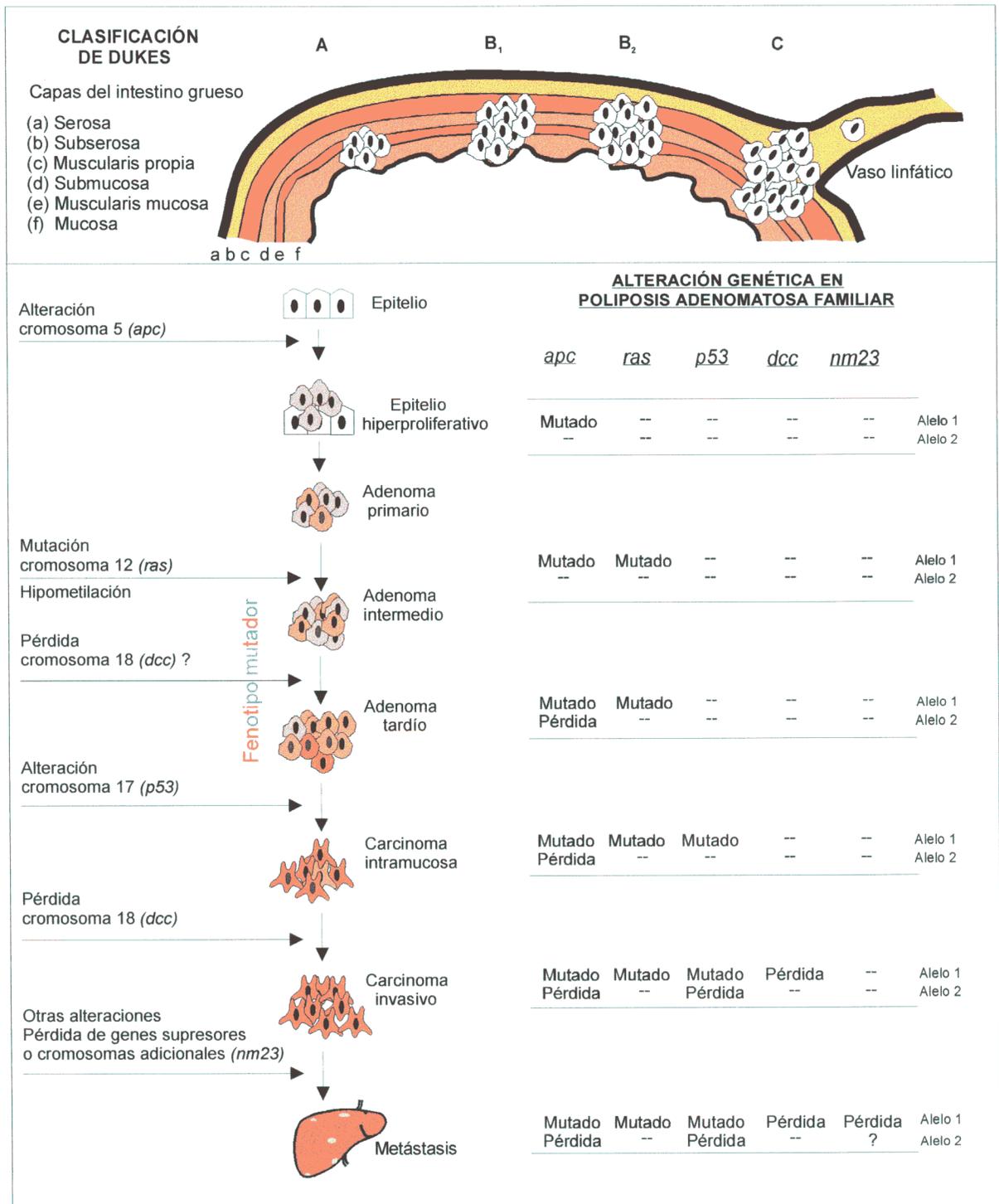


Figura 8.- Progresión del cáncer de colon.

En la parte superior se muestra la progresión del tumor a lo largo de las diferentes capas del intestino grueso y la clasificación de éste en los estados A, B₁, B₂ y C según Dukes. El estado C se subdivide en dos categorías dependiendo de que el tumor alcance sólo el ganglio linfático (C₁) o que alcance el torrente sanguíneo (C₂). En el estado D, los tumores han formado metástasis. En la parte inferior se indican las alteraciones genéticas más importantes asociadas con la progresión del tumor de colon y, en la tabla, el tipo de alteración que tiene lugar en el caso concreto de la poliposis adenomatosa familiar (FAP).

La familia de genes *ras* (*K-ras*, *H-ras* y *N-ras*) y en particular *K-ras* parecen ser los oncogenes más importantes implicados en el cáncer colorrectal. Presentan una alta homología y codifican a una proteína de 21 kDa. De forma similar a G_{sc} , la proteína *ras* une nucleótidos de guanina (GTP) y tiene actividad GTPásica. Esta proteína participa en la transmisión de la señal y está implicada en el control de la proliferación celular y la diferenciación. En cáncer colorrectal, el 90% de las mutaciones se encuentran en el gen *K-ras* y sólo el 10% en el gen *N-ras*. Estas mutaciones están localizadas en los codones 12, 13 y 61, y producen sustituciones de aminoácidos que dan lugar a una inapropiada activación de la transmisión de la señal. Tanto las proteínas mutadas que permanecen activas (ligan GTP pero no mantienen su actividad GTPásica), como la sobreexpresión de la proteína no mutada producen transformación maligna por activación de rutas mitogénicas dependientes de *ras* (Fearon y Vogelstein, 1990; Waldmann y Rabes, 1996). Sin embargo, algunos autores indican que el fenotipo maligno de las células no se correlaciona con la presencia de mutaciones de *K-ras* o con altos niveles de expresión de la proteína ya que, en ambos casos, se mantiene la función de dicha proteína (Buard *et al.*, 1996).

El significado de las mutaciones en el gen *ras* en cáncer colorrectal no se conoce todavía ya que en más del 50% de los cánceres colorrectales esporádicos no se han detectado mutaciones en *K-ras*. Sin embargo, la elevada frecuencia de mutaciones en *K-ras* detectadas en adenomas permiten considerar a esta mutación como una de las modificaciones asociadas a la transformación maligna de adenoma a carcinoma (De Benedetti *et al.*, 1994). *Ras* se sobreexpresa en carcinomas primarios, pero esta sobreexpresión es menor en estados más avanzados y en metástasis, comparados con el tumor primario (Gallick *et al.*, 1985). Esto sugiere que en la carcinogénesis colorrectal, después de un cierto estado de evolución del tumor, no se requiere la activación de *ras*. Dado que se ha detectado una sobreexpresión de ciertos factores vasculares, se ha propuesto que la activación de *ras* puede estar relacionada con un cambio angiogénico en las lesiones tempranas precancerosas (Rak *et al.*, 1995).

De la familia de genes *myc* (*N-myc*, *L-myc* y *c-myc*), el gen *c-myc* está localizado en el cromosoma 8q24 y codifica a una fosfoproteína de 64 kDa. La expresión de *c-myc* varía a lo largo del ciclo celular, incrementándose con la estimulación mitogénica, por lo que se cree que la proteína que codifica es esencial para la proliferación celular. Se induce por factores de crecimiento peptídicos y, cuando se sobreexpresa, puede transformar células en cultivo e inducir tumores en animales (Guillem *et al.*, 1995). La proteína regula la transcripción y también se ha propuesto que puede participar en la replicación del DNA, posiblemente por unión a sitios de iniciación de síntesis de DNA.

En el colon humano normal, la proteína se localiza en la zona proliferativa basal. Sin embargo, en adenomas, ésta se localiza en las criptas. En la mayoría de los cánceres

colorrectales se ha observado una expresión elevada del mRNA de *c-myc* y de la oncoproteína en las etapas iniciales de la carcinogénesis colorrectal. Además, la amplificación de *c-myc*, pero no la sobreexpresión, se ha correlacionado con la progresión metastásica del cáncer colorrectal (Rochlitz *et al.*, 1996). Otros estudios sobre la expresión de *c-myc* en tumores primarios sugieren que esta se produce preferentemente en lesiones del lado izquierdo del colon que en el derecho. La sobreexpresión de N-myc y L-myc también se ha detectado en muchos cánceres colorrectales. Sin embargo, en algunos carcinomas no se han observado estas modificaciones, ni se ha encontrado relación con el estado del tumor o el grado de diferenciación. Por tanto, los datos no demuestran una relación causa-efecto entre producción incrementada del RNA de *c-myc* y el desarrollo de carcinomas de colon.

El producto del gen *c-src* es una tirosina quinasa asociada a la membrana que participa en la transmisión de la señal mitogénica. Esta proteína se activa, de cinco a diez veces, en el 70% de los cánceres colorrectales (Talaminti *et al.*, 1993). El mecanismo de activación no se conoce; no se han observado cambios genéticos y pero parece que pueden estar implicadas modificaciones postraduccionales. Otros miembros de la familia de tirosinas quinasas *src* se expresan en altos niveles en algunas líneas celulares de cáncer colorrectal.

Pérdida de alelos y genes supresores de tumores

En cáncer colorrectal tiene lugar la pérdida de alelos que desenmascaran mutaciones en genes supresores de tumores como *apc*, *mcc*, *p53* y *dcc*. Estos genes codifican a proteínas que regulan negativamente la proliferación celular (Guillem *et al.*, 1995; Jhanwan y Gerder, 1995). De esta manera, la enfermedad somática o esporádica tiene lugar a través de dos alteraciones genéticas sucesivas (mutación y delección) que bloquean la función del gen.

En el cromosoma 5q se han encontrado alteraciones en los genes *apc* y *mcc*. La mutación del gen *apc* (responsable de FAP) aparece en aproximadamente el 30% de los cánceres colorrectales esporádicos familiares. La alteración de estos genes incluye mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, dando lugar a proteínas truncadas. La mutación en uno de los alelos es suficiente para causar hiperproliferación e inestabilidad cromosómica. Sin embargo, esta mutación parece que no es suficiente para producir cáncer (Kinzler y Vogelstein, 1996).

El gen mutado en cáncer colorrectal, o gen *mcc*, codifica a una proteína de 829 aminoácidos con homología de secuencia con la proteína G acoplada al receptor muscarínico, en concreto con la región del receptor necesaria para la activación de la proteína G, por lo que puede participar en el proceso de transmisión de la señal (Jhanwan y Gerder, 1995). Sin embargo, el papel del gen *mcc* en cáncer colorrectal no se ha determinado.

En las células cancerígenas se ha observado una alteración en la regulación de los puntos de control del ciclo celular (momentos en los que se puede producir la reparación del DNA) asociada con la inestabilidad genética y la progresión tumoral. Un importante punto de control del ciclo celular en células de mamíferos está mediado por el **gen supresor de tumores p53** que actúa en la fase G1 y G2/M del ciclo celular (Kastan *et al.*, 1992; Cross *et al.*, 1995). Este gen, localizado en el cromosoma 17p, codifica a una fosfoproteína nuclear de 53 kDa que se une a secuencias específicas de DNA actuando como un factor transcripcional, regulando posiblemente los niveles de expresión de genes implicados en la inhibición del crecimiento celular (Kern *et al.*, 1992). En algunas circunstancias el p53 es también capaz de inducir la muerte celular programada o apoptosis.

Las mutaciones y la pérdida alélica del gen *p53* se han asociado con tumores en una gran variedad de órganos humanos y tanto en cánceres espontáneos como hereditarios. La expresión anormal de *p53* se asocia con un peor pronóstico clínico en pacientes con cáncer colorrectal (Baretton *et al.*, 1996). El gen *p53* mutado codifica a una proteína alterada, con una vida media más larga por lo que se acumula en el núcleo y en el citoplasma de las células transformadas. Una de las funciones asignadas a la proteína p53 es la de impedir la replicación cromosómica en circunstancias específicas, cuando se ha producido un daño en el DNA, evitando la transmisión de errores a la células hijas (Tishler *et al.*, 1993). Sin embargo, para una célula tumoral la pérdida de la función de la proteína p53 puede constituir una ventaja, ya que algunas alteraciones en el DNA favorecerán el crecimiento tumoral. En el 75-80% de los carcinomas de colon se observa la pérdida de ambos alelos, uno a través de delección y el otro por mutación. Se ha propuesto que el producto del gen *p53* puede tanto promover como suprimir los procesos de malignidad, es decir, las mutaciones heterocigóticas en el *p53* pueden ser una ventaja para el control selectivo del crecimiento mediante un efecto dominante negativo. Esto sugiere que mutaciones en un locus normal del *p53* son recesivas al alelo del *p53* salvaje, contribuyendo sólo a la tumorigénesis cuando el alelo salvaje se inactiva.

Además de las alteraciones en los cromosomas 5 y 17, en tumores colorrectales es frecuente la pérdida de genes en el cromosoma 18q. Un ejemplo lo constituye el gen *dcc* que codifica a una proteína que es una molécula de adhesión célula-célula y célula-matriz. Una disminución en la expresión del gen *dcc* daría lugar a una adhesión alterada contribuyendo a incrementar el crecimiento tumoral y la metástasis en tumores colorrectales (Guillem *et al.*, 1995; Jhanwan y Gerder, 1995).

Se ha propuesto un modelo de carcinogénesis colorrectal en multietapas, ya que las mutaciones del gen *ras*, la hipometilación de DNA, la mutación del gen *p53* y las alteraciones en el cromosomas 5q ocurren en un estadio temprano, mientras que delecciones de alelos de los brazos del cromosoma 17p y 18q ocurren normalmente en el último estadio de la

tumorigénesis (Figura 8). Esta secuencia de eventos es similar en enfermedades esporádicas y hereditarias. Este modelo genético de cáncer colorrectal sugiere que en la progresión de células epiteliales de colon normal a carcinoma se acumulan gradualmente múltiples anomalías genéticas. La secuencia de hechos genéticos asociados con iniciación, transformación y progresión de cáncer colorrectal se podría dividir en tres categorías principales: a) una predisposición o cambio genético específico de tejido, b) alteraciones en genes asociados con transformación, y c) alteraciones asociadas con progresión y metástasis.

Inestabilidad genética

Una de las características comunes de las células malignas es la presencia de múltiples mutaciones y de un genoma inestable. La inestabilidad origina numerosas mutaciones que contribuyen a la capacidad de las células tumorales para evitar los mecanismos de control del crecimiento normal, además de la adquisición de un fenotipo agresivo. Basándose en la alta frecuencia de las mutaciones observada en células tumorales humanas, Loeb (1994) ha sugerido que el cáncer se origina por la expresión de un fenotipo mutador, que da lugar a la inestabilidad genética, y que ha sido detectado en el 1% de los carcinomas colorrectales. La inestabilidad de microsatélites se ha encontrado en una gran variedad de tumores, incluyendo el cáncer de colon familiar y ciertos cánceres esporádicos (Thibodeau *et al.*, 1993; Shibata *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 1995; Perucho, 1996). Los microsatélites están constituidos por secuencias de 1 a 6 nucleótidos que se repiten y que son altamente polimórficos (Weber y May, 1989). La inestabilidad aparece como un cambio sustancial en la longitud de las repeticiones (de naturaleza heterogénea) o un cambio menor (normalmente de dos pares de bases) (Thibodeau *et al.*, 1993). Las alteraciones en estas secuencias, dispersas por todo el genoma, sugieren que durante el desarrollo del tumor tienen lugar numerosos errores de replicación, que puede ser reflejo de una función defectuosa en genes de reparación del DNA, y se manifiesta cuando ambas copias de un gen reparador son inactivas. Entre otros genes, se ha implicado a mutaciones de los genes *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2* (Bronner *et al.*, 1994; Loeb, 1994; Nicolaides *et al.*, 1994). Estos genes, además de reparar el DNA defectuoso durante la replicación, pueden detener el ciclo celular en aquellas células en las que el DNA se ha dañado (Boland, 1996). Estos estudios se han realizado principalmente en tumores, existiendo unos pocos estudios en los que se analiza la inestabilidad de microsatélites en líneas celulares tumorales establecidas (Shibata *et al.*, 1994; Farber *et al.*, 1994).

OBJETIVOS

Las células BCS-TC2, procedentes de un adenocarcinoma primario de colon humano, son de origen epitelial y poco diferenciadas (Turnay *et al.*, 1990); mantienen unas características estables a lo largo de su cultivo *in vitro*, que recuerdan las de las células del tumor primario, por lo que constituyen un sistema modelo adecuado para el estudio de carcinomas primarios poco diferenciados. Estas células crecen en monocapa o en multicapa, mostrando heterogeneidad morfológica; expresan citoqueratinas y antígeno de membrana epitelial y tienen una capacidad de síntesis de antígeno carcinoembrionario reducida (Turnay *et al.*, 1990). Su cariotipo se encuentra alterado, aunque el número de cromosomas es normal (46XX, +der(15), +der(16)). Poseen un bajo poder tumorigénico, en ensayos *in vitro* de formación de colonias y en estudios *in vivo* por inyección subcutánea en ratones atímicos.

En los procesos de invasión y metástasis se producen interacciones entre las células transformadas y la matriz extracelular. Se ha planteado la realización de estudios encaminados a determinar la influencia de la matriz en el comportamiento de las células BCS-TC2, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ello se fijaron los siguientes objetivos:

A) *Análisis del efecto que la interacción de las células BCS-TC2 con componentes de la matriz extracelular produce sobre el comportamiento celular. Identificación de los receptores implicados en dicho proceso.*

Estudio de la influencia de la matriz extracelular y de alguno de sus componentes individuales (laminina, fibronectina y colágenos) en procesos como adhesión, extensión y proliferación de las células BCS-TC2. Identificación de las secuencias de adhesión implicadas en estas interacciones. Determinación de los receptores celulares, centrándose principalmente en los receptores de tipo integrina; análisis de los posibles mecanismos de transmisión de la señal al interior celular.

B) *Modificación del fenotipo tumorigénico/metastático de las células BCS-TC2 por su interacción con la matriz extracelular.*

Determinación de la capacidad tumorigénica y metastática de las células BCS-TC2, así como de la influencia de la matriz o de sus componentes individuales en el fenotipo maligno. En los casos en que se produzca inducción de tumores, se plantea la obtención y establecimiento de nuevas sublíneas celulares, y el análisis de las propiedades específicas de estas sublíneas en comparación con la línea celular parental (tumorigenicidad, grado de diferenciación, inestabilidad genética). La disponibilidad de diferentes líneas seleccionadas por interacción de las células BCS-TC2 con componentes de la matriz extracelular puede resultar de utilidad para identificar cambios en parámetros como expresión de receptores implicados en dicha interacción o expresión de metaloproteinasas capaces de degradar la matriz.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

2.1. PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La fibronectina utilizada en estos estudios, de plasma humano, se ha obtenido de los laboratorios ICN-Hubber S.A. La laminina, el matrigel y los colágenos tipo I, IV y V se han aislado según los procedimientos que se describen a continuación. El grado de pureza de las diferentes preparaciones de proteínas se ha comprobado por análisis de aminoácidos y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Turnay, 1989).

2.1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COLÁGENO DE TIPO I

El colágeno de tipo I se aísla de piel fetal bovina. La piel se lava con agua destilada, se congela en aire líquido y se homogeneiza en una trituradora de carne. La extracción y purificación del colágeno de tipo I se realiza de acuerdo al método de Timpl *et al.* (1975), por precipitaciones salinas en medio neutro, como se resume en el Esquema 1.

Esquema 1. Aislamiento y purificación del colágeno de tipo I

- Agitación del homogeneizado durante 2 días en tampón Tris 30 mM, pH 7,4, conteniendo NaCl 0,2 M, EDTA 0,1 M, p-hidroximercuribenzoato 5 mM y PMSF 20 mM. La relación peso de tejido/volumen de tampón es de 1/3.
 - Centrifugación. El sobrenadante se filtra por gasa y se precipita con NaCl sólido hasta una concentración final de esta sal de 2,5 M. Se mantiene en agitación constante durante una noche.
 - El precipitado, obtenido tras la centrifugación, se resuspende en tampón Tris 30 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,2 M, en una relación 1/5 (p/v), manteniéndose en agitación durante 2 horas. Después de una diálisis frente a este mismo tampón, se precipita con NaCl 5 M hasta alcanzar una concentración final de cloruro sódico de 1,7 M. La adición del NaCl se realiza gota a gota durante 1 noche y con agitación constante.
 - Centrifugación y separación del sedimento que contiene colágeno de tipo III. Precipitación salina del sobrenadante con NaCl 5 M hasta una concentración final de 2,5 M.
 - Centrifugación. El precipitado de colágeno de tipo I se resuspende en ácido acético 0,1 M, dializándose en este medio. Esta disolución se liofiliza y el colágeno obtenido se conserva a -20°C.
-

Todas las operaciones se realizan a 4°C, y las centrifugaciones a 27.000g durante 1 hora (en centrífuga Sorvall RC-5B) salvo que se indique lo contrario.

La composición de aminoácidos es coincidente con la descrita por otros autores para esta molécula (Timpl *et al.*, 1975; Kühn, 1983). La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS revela la existencia de diferentes especies moleculares en la preparación: cadenas α (α_1 y α_2), componentes β y componentes γ . El estado nativo de la preparación de colágeno se comprueba por los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano, donde aparece el máximo a 222 nm característico de la estructura en triple hélice del

colágeno nativo. La gelatina se obtiene por desnaturalización del colágeno de tipo I por tratamiento térmico de una disolución de este colágeno, a una concentración de 2 mg/mL, durante 30 minutos a 80°C. La gelatina se liofiliza y se conserva a -20°C.

2.1.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COLÁGENOS DE TIPO IV Y V

Estos colágenos se aíslan de placenta humana la cual lava exhaustivamente con una disolución salina neutra y se trocea. Se trata repetidas veces con acetato sódico 0,4 M y, una vez bien lavado el tejido, se procede a la extracción de los colágenos por precipitaciones salinas fraccionadas y cromatografías, de acuerdo a una modificación del método de Glanville *et al.* (1979) que se resume en el Esquema 2.

Esquema 2. Aislamiento y purificación de colágenos de tipo IV y V

- Agitación durante 2 horas en ácido fórmico 0,5 M en una relación peso de tejido/volumen de 1/3. Digestión con pepsina [relación 1:2000 (p/p); EC 3.4.23.1] durante 16-20 horas con agitación constante.
 - Centrifugación a 7.000g durante 1 hora. Parte del sobrenadante así obtenido se dializa frente a ácido acético 0,1 M y se liofiliza, obteniéndose la fracción denominada "extracto de placenta".
 - Precipitación salina del resto del sobrenadante por adición de NaCl sólido hasta alcanzar una concentración final del 6% en NaCl. Se mantiene en agitación constante durante 1 noche. Tras la centrifugación, el sedimento se resuspende en tampón Tris 30 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,2 M, en una relación 1/5 (p/v), dializándose frente a este mismo tampón. Esta fracción, que contiene los colágenos de tipo I, III, IV y V, se precipita por adición de NaCl 5 M hasta una concentración final de 1,8 M. Centrifugación.
 - El sobrenadante (colágenos de tipo I y tipo V) se precipita entre 3 y 4M de NaCl. El precipitado, conteniendo colágeno de tipo V, se redisuelve en ácido acético, se dializa y se reprecipita al 7% de NaCl. Diálisis frente a ácido acético y liofilización; el colágeno de tipo V se mantiene a -20°C.
 - Redisolución del precipitado en tampón Tris 30 mM, pH 7,4, NaCl 0,2 M, diálisis frente a este mismo tampón y reprecipitación a 1,8 M de NaCl. Redisolución del precipitado en tampón Tris 30 mM, pH 8,6, que contiene urea 2 M y NaCl 0,2 M y diálisis frente a este mismo tampón.
 - Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (2,5 x 10 cm), equilibrada en el tampón de diálisis a 15°C. El material no retenido en la columna se dializa frente a un tampón acetato 40 mM, pH 4,8, que contiene urea 2 M. Cromatografía de intercambio iónico en CM-celulosa (2,5 x 10 cm), equilibrada a 15°C en tampón de diálisis. La muestra se eluye de la columna con un gradiente lineal de NaCl (0-0,2 M) en 1 L de tampón. Se recogen las fracciones correspondientes al colágeno de tipo IV.
 - Diálisis frente a ácido acético 0,1 M; el colágeno de tipo IV se conserva liofilizado a -20°C.
-

Todas las centrifugaciones se realizan a 27.000g y las operaciones se llevan a cabo a 4°C a no ser que se indique expresamente otra temperatura. Después de cada una de las diálisis se realiza una centrifugación para eliminar el material no soluble.

2.1.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAMININA Y DE LOS FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS E1-4 y E8

Las preparaciones de laminina y matrigel se obtienen a partir del sarcoma EHS de ratón. Las células tumorales para la propagación subcutánea fueron proporcionadas por la Dra. Albini del Istituto per la Ricerca sul Cancro (Génova). El tumor, que crece subcutáneamente en ratones C57B1, se extirpa cuando alcanza 2-4 cm de diámetro y se lava con tampón fosfato salino NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4 (PBS). El aislamiento de la laminina se realiza según el método de Timpl *et al.* (1979), y los fragmentos de laminina se obtienen por digestión con elastasa, según el método de Ott *et al.* (1982). En el esquema 3 se recoge el procedimiento empleado.

Esquema 3. Obtención de la laminina y de los fragmentos E1-4 y E8

- Homogeneización del tejido en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 3,4 M, PMSF 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NEM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y EDTA 2 mM. Centrifugación a 10.000g durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante que contiene proteínas celulares y séricas.
 - Extracción en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,5 M e inhibidores de proteasas, en una relación 1/10 (p/v). Se mantiene con agitación constante durante 1 noche. Centrifugación a 23.000g durante 30 minutos, descartándose el sedimento que contiene colágeno de tipo IV.
 - Precipitación salina con NaCl 5 M hasta alcanzar una concentración final de cloruro sódico 1,7 M. Se añade la disolución gota a gota con agitación continua durante 1 noche. Centrifugación a 27.000g durante 1 hora y diálisis del sobrenadante frente a un tampón Tris 50 mM, pH 8,6, urea 2 M y NaCl 0,25 M.
 - Cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa (2,5 x 30 cm), equilibrada en el tampón de diálisis. La laminina (excluida) se dializa frente a un tampón Tris 50 mM, pH 8,6, urea 2 M. Recromatografía en DEAE-celulosa, equilibrada en el tampón de diálisis, eluyéndose la laminina con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,3 M (2 x 600 mL). Concentración por ultrafiltración en Diaflo (membrana Amicon XM 100A) y diálisis frente a tampón Tris 50 mM, pH 7,4, conteniendo CaCl_2 1 M.
 - Cromatografía de penetrabilidad en Biogel A1.5m (3,5 x 150 cm), equilibrada en el tampón de diálisis anterior. La laminina eluye en el volumen de exclusión. Diálisis frente a tampón Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,3 M. Las preparaciones se conservan a 4°C en presencia de inhibidores de enzimas proteolíticas, o bien congeladas a -20°C.
 - La laminina se dializa frente a tampón bicarbonato 50 mM, pH 7,9. Los fragmentos se obtienen por digestión con elastasa (EC 3.4.21.36) a 37°C durante 16 horas a una relación enzima/laminina de 1:100 (p:p), deteniéndose por adición de PMSF. Los productos de la digestión se separan por cromatografía en Agarosa A 1.5m (4 x 140 cm) en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, conteniendo CaCl_2 1M.
 - Diálisis frente al tampón bicarbonato y cromatografía a 4°C en Sepharose-heparina (2,5 x 6 cm) preequilibrada en el tampón de diálisis. El fragmento E1-4 no se retiene y el fragmento E8 se eluye con el tampón bicarbonato que contiene NaCl 0,5 M. Los fragmentos se dializan frente a tampón Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,3 M y se conservan en las mismas condiciones que la laminina intacta.
-

Todas las operaciones se realizan a 4°C.

2.1.4. OBTENCIÓN DE MATRIGEL

Este basamento membranoso reconstituido se obtiene del tumor EHS, siguiendo el método descrito por Kleinman *et al.* (1986) y Fridman *et al.* (1990). El aislamiento del matrigel bajo en factores de crecimiento, del que se eliminan componentes de baja masa molecular, se obtiene siguiendo el método descrito por Vukicevic *et al.* (1992b). En el esquema 4 se recogen todas las etapas del procedimiento de preparación de los dos tipos de matrigel. En la figura 9 se muestra una electroforesis de preparaciones de laminina y de estos dos tipos de matrigel.

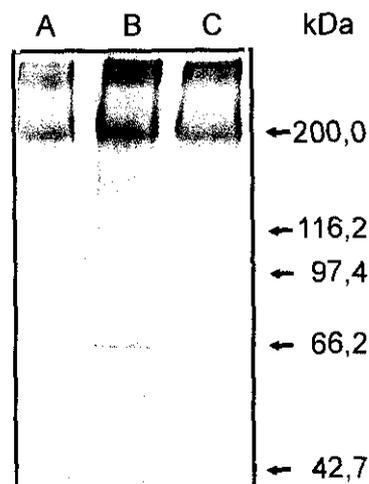
Esquema 4. Obtención de matrigel y matrigel bajo en factores de crecimiento

- Homogeneización del tejido en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 3,4 M, PMSF 50 µg/mL y NEM 50µg/mL. Centrifugación a 10.000g durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante que contiene proteínas celulares y séricas.
- Extracción en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene urea 2 M, manteniéndose en agitación constante durante 1 noche. Centrifugación a 23.000g durante 20 minutos. Se repite la extracción con el sedimento, en idénticas condiciones; el sobrenadante de la segunda centrifugación se añade al de la primera extracción.
- Diálisis frente a tampón A (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) estéril, que contiene cloroformo al 0,5%, durante 2 horas. Diálisis frente a tampón A estéril durante 20 horas, seguida de diálisis frente a medio de cultivo DMEM durante 8 horas. El Matrigel se recoge en condiciones estériles y se conserva a -20°C.
- Para la preparación del matrigel bajo en factores de crecimiento, tras la homogeneización y extracción, se realiza una precipitación salina adicionando sulfato amónico hasta alcanzar una concentración final del 20% en esta sal. Se mantiene en agitación constante durante 1 noche.
- Centrifugación a 23.000g durante 20 minutos, descartándose el sobrenadante. El sedimento se resuspende en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 150 mM. Se repite la precipitación con sulfato amónico en las condiciones antes indicadas; el sedimento se resuspende de nuevo en el tampón Tris 50 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl. A continuación se procede, de igual forma a la descrita para la obtención del matrigel completo, a realizar las diálisis frente a tampón A y medio DMEM, conservándose este matrigel en las mismas condiciones.

Todas las operaciones se realizan a 4°C

Figura 9.- Análisis electroforético de laminina, matrigel y matrigel bajo en factores de crecimiento.

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% en presencia de SDS de (A) laminina, (B) matrigel y (C) matrigel bajo en factores de crecimiento. En la parte de la derecha de la figura se indica la posición de los marcadores utilizados.



2.2. TÉCNICAS GENERALES DE CULTIVO CELULAR

2.2.1. CULTIVO CELULAR Y SUBCULTIVOS

Todas las operaciones que se describen a continuación se realizan en condiciones estériles, en cámara de flujo laminar (BV-30/70; Telstar), y empleando material y productos estériles.

Las células se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), que contiene glucosa 4,5 g/L, suplementado con suero fetal bovino al 5% (v/v), penicilina 50 U/mL, estreptomina 50 µg/mL y L-glutamina 300 µg/mL (medio completo). Los cultivos se mantienen a 37°C en una atmósfera compuesta por un 95% de aire y un 5% CO₂ (incubador Nuair, modelo IR, autoflow). El medio de cultivo se cambia rutinariamente cada dos o tres días. Las células se subcultivan cuando su densidad por superficie de cultivo es lo suficientemente elevada o cuando las células han alcanzado la confluencia, ocupando casi toda la superficie útil de cultivo.

Los subcultivos se realizan liberando las células de la superficie de crecimiento con una disolución de tripsina (EC 3.4.21.4) al 0,05% (p/v) y EDTA al 0,02% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS), después de lavar la capa celular con este mismo tampón. El cultivo celular se mantiene a 37°C, controlándose el proceso de separación por observación en un microscopio de óptica invertida (Nikon TMS). Una vez liberadas las células del soporte, se añade medio de cultivo completo con el fin de inactivar a la tripsina. De esta manera, se evitan los posibles daños celulares que una exposición excesiva a la enzima podría originar, degradando proteínas de la membrana celular.

La suspensión celular obtenida se centrifuga a 800g durante 10 minutos en una centrífuga Christ Laborfuge I (Heraeus) y el sedimento se resuspende en el volumen apropiado de medio de cultivo completo. Las células se siembran en nuevos frascos de cultivo para su propagación, o bien se utilizan en los distintos tipos de ensayos. El recuento celular se efectúa mediante el empleo de un hemocitómetro (cámara de Neubauer, Brand). La suspensión celular homogénea se deposita en ambas cámaras del hemocitómetro con una pipeta Pasteur. A continuación se procede al conteo del número de células al microscopio, calculándose mediante las conversiones pertinentes el número de células por mililitro de la suspensión original.

Para determinar la viabilidad celular se emplea el test de exclusión del azul Tripán. Una alícuota de la suspensión celular, obtenida por tripsinización, se centrifuga a 800g durante 5 minutos. El precipitado se resuspende en 1 mL de una disolución tamponada de azul Tripán [10 µL de azul Tripán al 0,4% (p/v), en 10 mL de tampón fosfato salino, pH 7,4], y se

mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos, procediéndose al recuento celular. Las células teñidas de azul son células no viables. La viabilidad se expresa como el porcentaje de células viables (no teñidas) con respecto al número total de células. Para comprobar la viabilidad a largo plazo se realizan estudios de adhesión y extensión celular así como cinéticas de proliferación celular. Estos ensayos se describirán posteriormente.

2.2.2. CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

Para la conservación del cultivo celular, las células se tripsinizan, se recogen por centrifugación a 800g durante 10 minutos y se resuspenden en medio de cultivo que contiene suero fetal bovino al 20% (v/v). La suspensión celular se transfiere a viales esteriles de polipropileno, de 2 mL de capacidad, añadiéndose dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final del 10% (v/v). Las muestras se congelan disminuyendo la temperatura paulatinamente a una velocidad de 1°C/min. Este proceso se lleva a cabo hasta alcanzar -80°C. Posteriormente se transfieren a un contenedor con aire líquido (-180°C) donde las células se almacenan durante períodos prolongados de tiempo.

El proceso de descongelación se realiza sumergiendo el vial en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelado, se transfiere el contenido de los mismos a un tubo de centrifuga con 10 mL de medio de cultivo para diluir la concentración de DMSO. Posteriormente, las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en medio de cultivo completo a la densidad requerida para su siembra.

2.2.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS A PARTIR DE EXPLANTES

Una pequeña porción de tejido tumoral se coloca en una placa Petri, se lava exhaustivamente con PBS estéril, y se trocea con un bisturí, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 2 mm³. Éstos se depositan en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie, incubándose a 37°C durante 10 minutos para permitir la adhesión de los fragmentos de tejido a la superficie de cultivo. A continuación, se añade medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino al 10% y suplementado con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y L-glutamina (300 µg/mL), procurando no despegar los explantes de tejido de la superficie de la botella. Los cultivos de explantes se incuban a 37°C en una atmósfera 95% aire: 5% CO₂. La salida de células a partir de los explantes se sigue por observación en un microscopio de óptica invertida.

En determinadas ocasiones se han realizado también digestiones enzimáticas del tejido tumoral por tratamiento con colagenasa bacteriana de *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.24.3;

colagenasa de tipo II, Sigma). La mezcla de digestión contiene: colagenasa a una concentración de 250 U/mL y 270 U/mL de desoxirribonucleasa I (DNasa I) de páncreas bovino (EC 3.1.21.1; Boehringer Mannheim), en medio de cultivo. Las muestras se mantienen sin agitación durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, la suspensión resultante se centrifuga suavemente y el sedimento celular se resuspende en medio de cultivo completo y se incuba en frascos de cultivo en las condiciones habituales.

En cada caso se observa la evolución del cultivo y se cambia el medio de cultivo en el momento en el que se observan desechos celulares o tisulares, o cambios en el pH del medio. Cuando se obtienen células, estas se mantienen y se subcultivan según los procedimientos habituales.

2.3. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN CELULAR

2.3.1 ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR Y DE INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN

Con el fin de estudiar la influencia de la matriz extracelular en el comportamiento celular, se recubren las placas de cultivo con matrices extracelulares preformadas o con componentes individuales de la misma, como colágenos de tipo I, tipo IV o tipo V, fibronectina, laminina o con diferentes péptidos sintéticos cuya secuencia contiene las secuencias activas de reconocimiento celular. La preparación de los sustratos se realiza, en cada caso, según se describe a continuación.

Componentes de la matriz extracelular

Las proteínas de la matriz extracelular se disuelven a la concentración requerida para cada ensayo (2-10 µg/mL) en PBS que contiene kanamicina (50 µg/mL) (PBS/kanamicina). Se depositan 100 µL de estas disoluciones en placas de 96 pocillos (0,32 cm² de superficie/pocillo), incubándose 18 horas a 4°C. Después de lavar tres veces las placas con PBS/kanamicina, los sitios de unión de proteína no saturados se recubren empleando una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5% (p/v) en el mismo tampón, incubándose 2 horas a 37°C. Por último, las placas se vuelven a lavar con tampón y se utilizan inmediatamente. Las disoluciones de colágeno de tipo I y de tipo IV se preparan a partir de una disolución en ácido acético 0,1 M a una concentración de 2 mg/mL. Esta disolución debe mantenerse a 4°C para evitar la formación de geles. En todos los casos, como control se emplean células sembradas en pocillos saturados sólo con albúmina.

Péptidos sintéticos

Cuando el sustrato con el cual se saturan las placas es un péptido se emplea otro

método de recubrimiento. Se prepara una disolución del péptido a la concentración adecuada en agua o en ácido acético al 20% (v/v) (Tashiro *et al.*, 1989; Iwamoto *et al.*, 1996). Se utilizan placas de 24 pocillos de 2 cm² de superficie, depositándose 300 µL en cada pocillo, llevándose a sequedad en la cámara de flujo laminar vertical. Tras este proceso, los pocillos se lavan tres veces con PBS/kanamicina y se procede de igual forma a la descrita en el caso de utilizar componentes de la matriz.

Los péptidos correspondientes a secuencias funcionalmente activas de la laminina, los que contienen la secuencia de reconocimiento celular -RGD- y el péptido control GRGESP, fueron sintetizados por el Dr. Andreu en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona. Las secuencias de los péptidos utilizados, en su forma amida, son: GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-NH₂), GRGESP (Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro-NH₂) YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂) lineal y cíclico, CDPGYIGSR (Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂), IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val-NH₂), IKVAVS (Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-NH₂) y CIKVAVS (Cys-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-NH₂). La pureza de los péptidos es, en todos los casos, superior al 95%.

Matrices extracelulares preformadas

Con el fin de obtener las matrices extracelulares preformadas, se siembran fibroblastos o células BCS-TC2 en placas de cultivo, manteniéndose el cultivo hasta 4-5 días después de haber alcanzado la confluencia. Estos cultivos se lavan tres veces con PBS a temperatura ambiente y a continuación se tratan tres veces, durante 10 minutos y a 0°C, con un tampón Tris 10 mM, pH 8,0, que contiene PMSF 1 mM y desoxicolato sódico al 0.5%. A este tratamiento le siguen tres lavados, de 5 minutos a 0°C, con un tampón Tris 2 mM, pH 8,0, PMSF 1 mM. De este modo se consigue eliminar completamente todo el material celular dejando la matriz extracelular biosintetizada intacta (Hedman *et al.*, 1979). Estas matrices se conservan a 4°C en tampón PBS/kanamicina.

Ensayo de adhesión celular

Se emplean placas de 96 pocillos saturadas con la proteína objeto de estudio. Las células se recogen por tripsinización de los cultivos correspondientes, se centrifugan y resuspenden en medio de cultivo completo. Se mantienen en suspensión en este medio al menos durante 30 minutos a 37°C para permitir la reconstitución de la membrana plasmática tras el proceso de tripsinización. Las células se centrifugan y resuspenden en medio libre de suero a una densidad de 1-1,2 x 10⁶ células/mL, y se depositan 100 µL de la suspensión celular en cada pocillo. Transcurrido el tiempo adecuado se determina el número de células adheridas mediante el método colorimétrico descrito por Busk *et al.* (1992). Después de retirar el medio de cultivo, la monocapa celular se lava tres veces con PBS, para eliminar las células

no adheridas. Las células adheridas se fijan con una mezcla fría acetona:metanol (1:1; v/v) durante 10 minutos a 4°C y se lavan tres veces con agua destilada. A continuación, las células se tiñen durante 30 minutos a temperatura ambiente con violeta cristal al 0,5% (p/v) en metanol al 20% (v/v), añadiendo 80 µL/pocillo. Posteriormente, se lava con agua destilada para retirar el colorante no fijado en las células. El colorante se solubiliza mediante la adición de 100 µL de SDS al 0,5% (p/v) en agua destilada. Después de incubar 15-30 minutos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (Titertek Uniskan II, Cultek). Los resultados se expresan en unidades de absorbancia con respecto al blanco, considerando como tal la absorbancia de pocillos preparados en idénticas condiciones pero en ausencia de células. En cada caso se resta el control de adhesión, absorbancia de células adheridas inespecíficamente a pocillos recubiertos con BSA.

Ensayos de adhesión celular en presencia de cationes divalentes

Se emplean placas de 96 pocillos saturadas con el sustrato objeto de estudio. Las células se recogen por tripsinización, se resuspenden en medio de cultivo completo y se dejan recuperar en este medio durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo las células se centrifugan, se lavan dos veces con PBS que contiene EDTA 1 mM y se resuspenden en un tampón carente de cationes divalentes [Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, KCl 5 mM, Glutamina 2 mM, Glucosa 1,8 mM, BSA 1% (p/v)], a una densidad celular de $1-1,2 \times 10^6$ células/mL. El ensayo se inicia por adición a cada pocillo de 100 µL de la suspensión celular en el tampón previamente indicado que contiene el correspondiente catión divalente a una concentración final 2mM. Las placas se incuban a 37°C durante 30 minutos, tras los cuales se determina el número de células adheridas mediante el método colorimétrico descrito en el apartado anterior.

Ensayos de inhibición de la adhesión celular

Estos ensayos se realizan de manera similar a los ensayos de adhesión celular. Sin embargo, en este caso, antes de sembrar las células sobre los diferentes sustratos, éstas se preincuban con diferentes anticuerpos, o con el correspondiente agente o péptido, a las diluciones adecuadas en DMEM libre de suero, durante 45 minutos a 37°C y con agitación suave. Posteriormente las células se siembran a una densidad de $1,2 \times 10^5$ células por pocillo y se dejan adherir durante 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se determina el número de células unidas mediante el ensayo colorimétrico descrito anteriormente. Los resultados se expresan en porcentaje, considerando como 100% de adhesión la debida a las células unidas a cada uno de los sustratos en ausencia del agente.

2.3.2. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Curvas de proliferación celular

Para este ensayo se utilizan placas de 4 pocillos de 2 cm² de superficie de crecimiento, saturadas con 300 µL de disoluciones de los diferentes sustratos, en PBS/kanamicina a una concentración de 10µg/mL. Las células se obtienen por tripsinización de cultivos casi confluentes, en las condiciones ya mencionadas en apartados anteriores. Estas células se recogen por centrifugación a 800g durante 5 minutos y se resuspenden en el medio de cultivo completo con suero fetal bovino al 10% (v/v), a una densidad de 3 x 10⁴ células/mL. A continuación, a cada pocillo de la placa se le añade 1mL de la suspensión celular correspondiente y se incuba a 37°C bajo una atmósfera de aire:CO₂ (95%:5%). El medio de cultivo se cambia rutinariamente cada 2 días. A diferentes intervalos de tiempo, normalmente cada 24 horas, se procede a la determinación del número de células presentes en los pocillos mediante el método colorimétrico del violeta cristal.

Las curvas de proliferación celular se obtienen representando la absorbancia obtenida para cada pocillo frente al tiempo transcurrido desde la siembra. Estas curvas presentan tres fases bien definidas: fase de latencia, fase de crecimiento logarítmico y fase estacionaria. Suponiendo que en la fase de crecimiento logarítmico todas las células presentes en cultivo se están dividiendo y lo hacen a la misma velocidad, su número se puede ajustar a la siguiente expresión: $N = N_0 \times 2^{kt}$ (N_0 , número de células iniciales; N , número de células a t horas; k , constante de regresión; $n = kt$, número de generaciones). De esta expresión y de la pendiente de la curva de proliferación en la fase de crecimiento logarítmico (logaritmo del número de células frente al tiempo) se puede deducir el tiempo medio de generación ($T = 1/k$) a partir de la expresión: $T = \log 2/\text{pendiente}$

Las densidades de saturación se determinan cuando el número de células se mantiene constante durante 3-4 días. Sin embargo, cuando los cultivos no presentan inhibición por contacto, este parámetro es más difícil de determinar. Por ello, para determinar la densidad de saturación se siembran células a distinta densidad celular y se mantienen los cultivos de forma ininterrumpida durante 2-3 semanas (Kimball y Brattain, 1980).

Efecto de los componentes de la matriz extracelular sobre la capacidad mitogénica de las células

Las células se siembran en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 5x10⁴ células por pocillo, en medio completo. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se retira el medio, se lava la monocapa celular con medio libre de suero, y se añaden 200 µL/pocillo de medio con suero al 0,5% y se deja incubar a 37°C. A las 24 horas, se retira el medio y se añade medio libre de suero que contiene [metil-³H]timidina (0,9 µCi/pocillo; 35 Ci/mmol, 1

$\mu\text{Ci/mL}$, Amersham) y la correspondiente proteína a estudiar, a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, o sin proteína en los pocillos control. Las células se incuban durante 18 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo, se lavan las células tres veces con PBS y se lisan con 0,1% de SDS (p/v) en NaOH 0,1 N. La radiactividad presente en cada uno de los pocillos se determina en un contador de centelleo líquido (Beckman LS3801).

2.3.3. CITOMETRÍA DE FLUJO

Cultivos confluentes se tripsinizan y las células se dejan recuperar 30 minutos a 37°C en presencia de medio DMEM completo. Transcurrido este tiempo se lavan con PBS y se prepara una suspensión celular a la densidad adecuada en PBS con azida sódica al 0,02% (p/v) y BSA al 0,1% (p/v) (tampón PBS/BSA). Alícuotas de 1×10^6 células se incuban con 100 μL del primer anticuerpo, a la dilución correspondiente en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan tres veces con el tampón PBS/BSA, recogándose por centrifugación a 800g en una centrífuga refrigerada a 4°C (Medifriger, Selecta). Posteriormente se incuban con 100 μL del segundo anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución 1:100 en PBS, durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de tres lavados con tampón PBS/BSA, las células se conservan en 100 μL de PBS/BSA guardándose las muestras a 4°C hasta su valoración. Antes de realizar las medidas se añade yoduro de propidio hasta una concentración final de 25 $\mu\text{g/mL}$, para determinar el número de células viables. Como valores control se toma la fluorescencia intrínseca de las células y la debida al segundo anticuerpo unido de manera inespecífica a las células en ausencia del primer anticuerpo.

Las medidas se realizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) del Centro de Citometría de Flujo y Confocal de la Universidad Complutense de Madrid, y los datos son procesados en un ordenador HP310.

2.3.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los estudios de microscopía electrónica se han realizado utilizando diferentes aparatos y microscopios del Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru de la Universidad Complutense de Madrid.

Microscopía electrónica de transmisión

Las células se siembran en botellas de cultivo y se incuban hasta que alcanzan la confluencia, momento en el cual se retira el medio de cultivo y se lava la capa celular con tampón fosfato salino. Las células se fijan *in situ* con una disolución de glutaraldehído al 1% (v/v) en tampón fosfato 0,13 M, pH 7,4, durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras varios

lavados con tampón fosfato salino, las células se recogen con una espátula de goma, en el mismo tampón, y se centrifugan a 800g durante 5 minutos. A continuación, el sedimento celular se fija en tetróxido de osmio al 1% (p/v) en agua destilada durante 30 minutos. La deshidratación de las preparaciones se lleva a cabo por tratamiento con disoluciones de acetona de concentraciones crecientes (30% -100% v/v). Posteriormente, se realiza su inclusión en Epon 812 mediante la resuspensión de las muestras en concentraciones crecientes de acetona:Epon (2:1, 1:1, 1:2) y, en la última etapa, Epon al 100%, realizándose todo este proceso en la oscuridad. La última preparación se mantiene una noche a temperatura ambiente. El sedimento celular se transfiere a cápsulas, añadiendo Epon 812 al 100% hasta completar el volumen. Los bloques se forman por polimerización de la resina a 70°C durante 2-3 días. Las muestras se tallan y, posteriormente, se cortan en un microtomo con cuchilla de vidrio para obtener cortes semifinos de 1 µm de espesor. Estas secciones se tiñen con azul de toluidina y se observan al microscopio óptico para seleccionar las zonas donde se realizarán los cortes ultrafinos mediante un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung), de un grosor de 80 nm. Los cortes se colocan sobre rejillas (trama 200) tapizadas con Formvar disuelto en cloroformo al 0,16% (v/v).

Las secciones ultrafinas se contrastan con una disolución al 3% (p/v) de acetato de uranilo en etanol al 50% (v/v) durante 15 minutos. Tras lavar con agua destilada, las rejillas se dejan secar al aire y se tiñen con citrato de plomo durante 7 minutos. Las muestras se observan en un microscopio electrónico Zeiss 902.

Microscopía electrónica de barrido

Para visualizar las células por microscopía electrónica de barrido, los cultivos celulares se dejan crecer hasta que las monocapas se encuentran casi confluentes. En este momento, se retira el medio de cultivo y se lavan con PBS. A continuación, las células se fijan por tratamiento con glutaraldehído al 2,5% (v/v) en el mismo tampón, durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, las preparaciones se deshidratan por tratamientos sucesivos con disoluciones de etanol cada vez más concentradas (20, 40, 60, 80 y 100%). Las muestras se terminan de secar llevándolas al punto crítico (Balzers, modelo CPD030) y se metalizan con oro (metalizadora Balzers, modelo SCD004). Las preparaciones se visualizan en un microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-6400.

2.3.5. VALORACIÓN DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO

La capacidad para sintetizar CEA se ha analizado valorando los niveles de esta proteína tanto en el medio condicionado por las células como en la capa celular, como se describe en Noguchi *et al.*, (1979). Para ello, se siembran 4×10^4 células por cm^2 de superficie de

crecimiento en medio DMEM suplementado al 10% (v/v) con suero fetal bovino. Transcurridas 24 horas desde la siembra, se cambia el medio por otro que contiene un 2% (v/v) de suero fetal bovino cambiándose el medio cada dos días. Los niveles de CEA se determinan 7 días después de la siembra. El medio de cultivo condicionado por las células se centrifuga y se liofiliza, guardándose a -20°C hasta el momento de realizar el ensayo, para lo que se resuspende previamente en 1 mL de PBS. Un control, sólo con medio, se procesa paralelamente a estas muestras. Por otro lado, las monocapas celulares se raspan y las células se lavan dos veces con PBS, manteniéndose a -80°C hasta su utilización. Las células así conservadas se resuspenden en 0,5 mL de PBS y se lisan mediante dos ciclos de sonicación de 30 minutos a 4°C en un baño de sonicación (Branson 1200) alternados con un proceso de congelación-descongelación de las muestras en nitrógeno líquido. Paralelamente, después de su tripsinización, se determina el número de células de cultivos mantenidos en las mismas condiciones. Además, se realiza una valoración de proteínas por el método de Bradford, centrifugando previamente las células y lisándolas en 1 mL de NaOH 0,3 N. Los niveles de CEA se determinan por inmunodetección (ELISA), empleando reactivos comercializados por Roche. Los datos se expresan en ng CEA/mg proteína total y en ng CEA/célula.

2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES

2.4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y AUTORADIOGRAFÍA

Preparación del gel

Para la formación de los geles, normalmente de 0,75 ó 1 mm de grosor, se emplea un sistema de electroforesis mini-Protean II (BioRad). Se parte de una disolución de acrilamida al 30% (p/v) con una relación de ésta a bisacrilamida de 30:1. El gel separador se prepara a la concentración de acrilamida requerida, en un tampón Tris 0,4 M, pH 8,8, conteniendo SDS al 0,1% (p/v). La polimerización se inicia por adición de persulfato amónico al 0,045% (p/v) y TEMED al 0,075% (v/v), ambas concentraciones finales. El gel concentrante se forma empleando una disolución de acrilamida al 4% (p/v) en un tampón Tris 120 mM, pH 6,8, con SDS al 0,1% (p/v). La polimerización se desencadena por la adición de persulfato amónico al 0,03% (p/v) y TEMED al 0,2% (v/v), introduciéndose previamente un molde de metacrilato que dará forma a los pocillos de aplicación.

Preparación de las muestras

A las muestras se les añade el tampón de aplicación [Tris 65 mM, pH 6,8, conteniendo SDS al 3% (p/v), glicerol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,02% (p/v)]. El azul de

bromofenol se añade como indicador de la migración del frente de la electroforesis. Antes de su aplicación, las muestras se desnaturalizan por calentamiento a 90°C durante 5 minutos. Las muestras reducidas se preparan del mismo modo pero con tampón de aplicación que contiene β -mercaptoetanol al 5% (v/v).

Electroforesis y detección de las bandas de proteína

Las muestras se aplican en los pocillos del gel y la electroforesis se desarrolla a temperatura ambiente en un tampón Tris 25 mM, pH 8,3, glicocola 0,2 M, conteniendo SDS al 0,1% (p/v), manteniendo una intensidad constante de 25 mA/gel (fuente de tensión BioRad 1000/500). La electroforesis se detiene cuando la banda de azul de bromofenol llega al final del gel. Posteriormente, los geles se tiñen con una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (5:1:5; v/v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El desteñido del gel se realiza por lavados con ácido acético al 7,5% (v/v) y metanol al 20% (v/v).

Autorradiografía

Para visualizar las bandas de proteína marcadas radiactivamente con tritio, tras la electroforesis, las proteínas se fijan incubando el gel con isopropanol:ácido acético:agua (25:10:65; v/v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incuba, con el reactivo *Amplify* (Amersham), 30 minutos a temperatura ambiente. Los geles se secan sobre papel Whatman en un secador de geles LKB (Farmacia). Por último se procede a la detección por autorradiografía, colocándose sobre el gel una película fotográfica *Hyperfilm* (Amersham) en cámara oscura y manteniéndose a -80°C durante un período de tiempo dependiente de la radiactividad de la muestra. La película fotográfica se revela posteriormente en una procesadora de sobremesa Agfa Curix 60.

2.4.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA E INMUNODETECCIÓN

Preparación de las muestras

La monocapa celular se lava una vez con PBS y se raspa recogiendo las células en este mismo tampón. Las células se centrifugan 10 minutos a 800g y se resuspenden en 50 μ L del tampón de extracción (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, NaCl 140 mM, Triton X-100 al 2% (v/v), PMSF 1mM y NEM 1 mM). Esta suspensión celular se homogeneiza mediante 7-8 pases a través de una aguja de 0,5x16 mm y se centrifuga 15 minutos a 13.000g, recogiendo el sobrenadante. Después de determinar la concentración de proteína, se toma el volumen deseado al que se adicionan 0,3 volúmenes del tampón de aplicación de

electroforesis concentrado 3 veces.

Electroforesis y transferencia

Tras el desarrollo de la electroforesis en las condiciones anteriormente descritas, los geles, así como las membranas de nitrocelulosa (Hybond C; Amersham) y las láminas de papel Whatman 3M, se equilibran durante 15 minutos en tampón de transferencia [Tris 48 mM, pH 9,5, glicocola 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) y metanol al 20% (v/v)].

El gel se pone en contacto con la membrana de nitrocelulosa y el conjunto se sitúa entre dos capas de papel Whatman 3M. Se aplica una intensidad de corriente de 60-70 mA/gel durante 1-2 horas, empleando un sistema de transferencia LKB 2117. El proceso de transferencia se puede evaluar mediante la comprobación visual de la transferencia de proteínas patrones preteñidas con azul de Coomassie.

Inmunodetección por anticuerpos

Finalizada la transferencia, la membrana se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas con tampón Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM (tampón TBS) que contiene leche en polvo deslipidizada al 5% (p/v). A continuación se incuba durante 18 horas a 4°C, con el anticuerpo correspondiente diluido en tampón TBS que contiene Tween-20 al 0,05% (v/v) (TBS/Tween-20). Posteriormente la membrana se lava exhaustivamente con TBS/Tween-20. La incubación con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo o de ratón, ambos obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa se lleva a cabo, a la dilución adecuada, durante una hora a temperatura ambiente en TBS/Tween-20. Tras el lavado, en condiciones idénticas a las realizadas después de la incubación con el primer anticuerpo, el revelado se realiza utilizando el *kit* comercial de ECL (Amersham) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H₂O₂ catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (*Hyperfilm*-ECL; Amersham) a la membrana permite la detección de las bandas reconocidas por el anticuerpo, tras el revelado de la película manualmente o en una procesadora de sobremesa Agfa Curix 60.

2.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La valoración de proteínas se realiza de acuerdo al método de Bradford (1976). El reactivo contiene azul de Coomassie G-250 al 0,01% (p/v) en etanol al 4,75% (v/v) y ácido fosfórico al 8,5% (v/v). Este método permite valorar cantidades de proteína comprendidas entre 1 y 10 µg (100 µL de muestra más 1 mL de reactivo), determinándose la absorción a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7. La medida de absorción se puede realizar

2 minutos después de realizada la mezcla y es estable hasta 1 hora después. Las rectas de calibrado se realizan tomando albúmina de suero bovino (Fracción V, Sigma) como patrón.

Los espectros de absorción UV se realizan en la región UV-visible (longitudes de onda comprendidas entre 340 y 240 nm) en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico con una velocidad de barrido de 120nm/min en un espectrofotómetro Beckman DU-7. La concentración de BSA se determina a partir de la absorbancia a 280 nm de los espectros y considerando un ϵ_{280} de 0,66 mL.mg⁻¹.cm⁻¹.

2.4.4. ANÁLISIS DE RNAs POR TRANSFERENCIA A MEMBRANAS (NORTHERN-BLOT)

Aislamiento de RNA

El RNA se extrae en tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo en medio ácido de acuerdo a una modificación del método AGPC descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Las monocapas de cultivos casi confluentes se lavan con PBS estéril y las células se recogen por raspado y centrifugación. Después de un lavado con PBS se hacen alícuotas de 5x10⁶ células e inmediatamente se añaden 500 μ L de la disolución de extracción [tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, pH 7,0, sarcosinato 0,5% (p/v), β -mercaptoetanol 0,1 M]. La preparación se homogeneiza por pases sucesivos a través de una aguja de 0,5 x 16 mm, y se añaden sucesivamente, y con agitación, 50 μ L de acetato sódico 2 M, pH 4,0, 500 μ L de fenol saturado en agua y, finalmente, 100 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1; v/v). La suspensión final se agita durante 10 segundos dejándose reposar en hielo durante 15 minutos. La fase acuosa, que contiene el RNA, se separa de la fase orgánica por centrifugación a 13.000g durante 20 minutos a 4°C.

Sobre la fase acuosa se añaden 500 μ L de isopropanol, manteniéndose 1 hora a -20°C. El precipitado de RNA, obtenido por centrifugación a 13.000g durante 20 minutos a 4°C, se redisuelve en 300 μ L de tampón de extracción y se reprecipita. Se resuspende en etanol al 75% (v/v) frío (y libre de RNAsas), se mantiene 10 minutos a 4°C, se centrifuga y se seca a vacío. Éste se redisuelve, manteniéndose a 65 °C durante 10 minutos, en 50 μ L de SDS al 0,5% (p/v) tratado con DEPC al 0,1%; el material no soluble se elimina por centrifugación. La concentración de RNA se determina registrando el espectro de absorción ultravioleta de una dilución 1:500 de la preparación en agua destilada. Una unidad de absorción a 260 nm corresponde a 40 μ g/mL de RNA y, la relación A_{260}/A_{280} debe ser de alrededor de 2,0. La ausencia de degradación en la preparación de RNA se analiza por electroforesis, como se describe posteriormente, pero con geles de menor tamaño. La relación entre las bandas correspondientes al RNA 28S y 18S debe ser aproximadamente 2.

Electroforesis y transferencia

La electroforesis se realiza en geles de agarosa al 1% en presencia de formaldehído. Para un gel de dimensiones 18x15 cm, se calienta una suspensión 1,5 g de agarosa (Ultra Pure; Gibco BRL) en 111 mL de agua ultrapura y 15 mL de tampón de electroforesis MOPS 0,2 M, acetato sódico 50 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM, autoclavado hasta que se funde la agarosa y queda una disolución homogénea. Ésta se deja enfriar hasta 60°C y se le añaden 24 mL de formaldehído al 37% (v/v). La mezcla se deposita en una cubeta con un molde de metacrilato para dar forma a los pocillos de aplicación al solidificar. En cada pocillo se aplican 10-15 µg de RNA total en tampón de aplicación [MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, formamida al 50% (v/v), formaldehído al 6% (v/v), glicerol al 0,05% (v/v), azul de bromofenol al 0,02% (p/v) y bromuro de etidio 0,1 mg/mL]. En todos los geles se incluye un patrón con fragmentos de RNA de tamaño conocido. Las muestras se incuban 10 minutos a 65°C y, tras enfriarlas en hielo, se centrifugan y se aplican en los pocillos del gel de agarosa. El tampón de electroforesis empleado es: MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM. La electroforesis se desarrolla a 80-100 V hasta que el azul de bromofenol alcanza la distancia deseada. Después de la electroforesis, el gel se lava con agua destilada para eliminar el formaldehído y se observa en un transiluminador equipado con una lámpara UV que emite a 312 nm (Fluo-Link, TFL-20.M).

Para la transferencia, el gel se sumerge durante 10 minutos en NaOH 50 mM y se coloca sobre una membrana de nylon (*Hybond N*; Amersham) previamente empapada en tampón de transferencia (SSC 10 veces concentrado; tampón SSC: citrato sódico 15 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM) que se encuentra sobre una lámina de papel Whatman 3M. En la parte superior del aparato de transferencia a vacío (Bio-Rad, modelo 785) se coloca tampón de transferencia que cubra completamente el gel, y el sistema se somete a vacío (13 mm Hg) durante 90 minutos. La membrana se sumerge después de la transferencia en tampón 2xSSC durante 5 minutos y se deja secar entre papeles de filtro. El RNA transferido a la membrana de nylon se fija a ésta por entrecruzamiento bajo luz ultravioleta (0,3 J/cm²). Las membranas se conservan en una bolsa hermética a -20°C hasta su hibridación.

Hibridación y marcaje radiactivo de las sondas

Las membranas se prehibridan durante 6 horas a 42°C en un incubador rotatorio (Amersham) en 5 mL de una disolución de prehibridación que contiene: formamida al 50% (v/v), SDS al 0,5% (p/v), 5xSSC, disolución de Denhardt [Ficoll 0,02%, albúmina de suero bovino 0,02% (p/v) y polivinilpirrolidona 0,02%] 5 veces concentrada, y 0,1 mg/mL de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado.

Los fragmentos de DNA empleados como sonda se purifican tras digestión de los plásmidos correspondientes con las enzimas de restricción requeridas en cada caso. Los

fragmentos se purifican en geles de agarosa cortando las bandas correspondientes a los fragmentos y purificando el DNA mediante el *kit* comercial "*Gene Clean*" (Bio 101 Inc.). Una vez purificado el DNA sonda, éste se marca mediante *random priming* siguiendo el protocolo del *kit* comercial de marcaje de DNA "*Ready-to-go*" de Pharmacia. El DNA marcado con 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3.000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), aproximadamente 25 ng con una actividad específica mayor de 10^9 dpm/ μg , se purifica en una columna de Sephadex G-50. El DNA así obtenido se desnaturaliza y se añade directamente a la mezcla de prehibridación. La hibridación se realiza a 42°C durante 16-18 horas. Tras ello, las membranas se lavan dos veces con 2xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente dos veces con SDS al 0,1% (p/v) en 2xSSC durante 30 minutos a 55°C y, por último, se someten a un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente en SDS al 0,1% (p/v) en 0,1xSSC (sólo cuando las sondas y el mRNA tienen un grado de homología muy elevado). Las membranas se analizan mediante autorradiografía empleando una película fotográfica. En todos los casos se empleó una sonda para el mRNA de la β -actina para normalizar los resultados.

Las sondas empleadas frente a las metaloproteinasas MMP-2, MMP-7 y MMP-9, así como la de β -actina son del laboratorio de la Dra. A. Fabra (Instituto de Investigación Oncológica, Hospital Duran i Reynals, Hospitalet de Llobregat), donde se han realizado estos análisis. La sonda empleada frente a la proteína de unión a laminina de 67 kDa, cedida por el Dr. J.E. Riese (Pharmacia UpJohn, Madrid), es un oligonucleótido complementario a los nucleótidos +230 a +259, según la secuencia del cDNA descrito por Rao *et al.* (1989).

2.4.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Las muestras, previamente secadas a vacío, se hidrolizan en 100 μL de HCl azeótropo tridestilado 5,7 N que contiene fenol al 0,1% (p/v) y norleucina (17pmol/ μL) como estándar interno. Las hidrólisis se realizan en tubos Pyrex, cerrados a vacío, a 110°C durante al menos 18 horas. Posteriormente se abren los tubos y las muestras se llevan a sequedad, se lavan dos veces con 100 μL de agua destilada y se secan. Los hidrolizados se disuelven en 50 μL del tampón de aplicación y se trasvasan a tubos de teflón. Después de centrifugación en una microfuga Beckman, se aplican entre 5 y 30 μL de las mismas en un analizador automático Beckman 6300 conectado a un módulo de interfase analógica System Gold. El sistema dispone de un integrador automático que permite calcular la concentración de cada aminoácido en el hidrolizado. Conocida la composición de aminoácidos de la proteína, y teniendo en cuenta el estándar interno de norleucina, se estima la concentración de proteína de la disolución inicial.

2.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.5.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEINASAS

La presencia de actividades degradativas de componentes de la matriz extracelular se analiza tanto en los medios condicionados por los cultivos celulares, como en los tumores y medios condicionados por éstos.

Obtención de medios condicionados

Las células se siembran en frascos de 75 cm² de superficie en medio completo. Cuando los cultivos alcanzan un estado semiconfluyente, se retira el medio y, para eliminar los restos de suero, se lava la monocapa celular con medio de cultivo libre de suero pero conteniendo glutamina y antibióticos a las concentraciones habituales. En estas condiciones se incuban las células durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se elimina el medio y se añaden 8-10 mL del mismo medio fresco y se incuba a 37°C durante 24 horas. Finalmente, el medio condicionado se recoge y centrifuga a 800g durante 10 minutos para eliminar células que pudieran encontrarse en suspensión. El sobrenadante se conserva a -80°C hasta su utilización. Tras la eliminación del medio, las células se utilizan para la obtención de extractos celulares.

En el caso de los tumores, 0,2 g de tumor se incuban durante 4 horas a 37°C con 6 mL de medio libre de suero que contiene glutamina y, para evitar contaminaciones, antibióticos al doble de la concentración habitual. Tras este período, se retira este medio y se añade medio nuevo en las mismas condiciones que el anterior y se incuba a 37°C durante 24 horas. El medio condicionado se separa por filtración con gasa y se conserva a -80°C.

Los medios condicionados se concentran por filtración utilizando filtros Centriplus-10 o Centriplus-30 (Amicon), con un poro promedio que excluye proteínas de masa molecular mayor de 10 ó 30 kDa, respectivamente. La concentración de proteína de estos medios condicionados se determina por el método de Bradford. Estos medios condicionados se utilizan para detectar la actividad de MMPs mediante zimogramas, o para analizar la presencia de estas enzimas mediante inmunotransferencia.

Preparación de extractos celulares

Para evaluar la actividad de MMP asociada a la membrana, se procede a la obtención de extractos celulares a partir de los cultivos utilizados para la obtención de los medios condicionados. La monocapa celular se lava con Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, a temperatura ambiente. A continuación, se añade Triton X-114 al 1,5% (v/v) en Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM (1 mL por cada 30 cm² de superficie de cultivo) y se recogen las células raspando la monocapa con una espátula de teflón. El extracto obtenido se centrifuga

a 10.000g a 4°C durante 2 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf y se incuba a 37°C durante 2-5 minutos para permitir la separación de fases. Tras ello, se centrifuga a 3.000g y se recoge la fracción del detergente. En el caso de que aparezca precipitado se repite de nuevo la centrifugación. A la fracción del detergente recogida se le añade 1 mL de Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150mM, CaCl₂ 1mM y se congela a -80°C hasta su utilización.

Gelatinograma

Los gelatinogramas se realizan según el método descrito por Heussen y Dowdle (1980). Una vez conocida la concentración de proteína de cada muestra, se toma el volumen necesario de la misma y se añaden 0,5 volúmenes de tampón de aplicación de muestras de electroforesis 3 veces concentrado. En cada pocillo de la electroforesis se aplican entre 5 y 40 µg de proteína procedente de los medios condicionados concentrados. A diferencia de lo descrito con anterioridad para la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, para llevar a cabo el gelatinograma las muestras no se desnaturalizan térmicamente y la electroforesis se lleva a cabo siempre en condiciones no reductoras para permitir la posterior renaturalización de las actividades gelatinolíticas. Se emplean geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS al 0,1% (p/v), que contienen gelatina al 0,1% (p/v). Tras el desarrollo de la electroforesis a 4°C, los geles se lavan dos veces, durante 30 minutos, con tampón Tris 50 mM, pH 7,4, que contiene Triton X-100 al 2,5% (v/v), para eliminar el SDS presente en el gel. Posteriormente se realizan dos lavados sucesivos de 10 minutos con tampón Tris 50 mM, pH 7,4. A continuación el gel se incuba durante 72 horas con tampón Tris 50mM, pH 7,5, NaCl 0,15M, CaCl₂ 10mM, Triton X-100 0,1% (v/v), NaN₃ 0,02% (p/v), en el cual la actividad de gelatinasa es máxima.

Los geles se tiñen con una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (5:1:5; v/v/v) durante 3 horas a temperatura ambiente. El desteñido del gel se realiza por repetidos lavados en ácido acético al 7,5% (v/v). La actividad gelatinolítica se detecta por la tinción negativa debido a la degradación de la gelatina presente en aquellas zonas del gel donde se localizan las metaloproteinasas.

2.5.2. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA

La valoración de fosfatasa alcalina se determina mediante el protocolo propuesto por Schroy *et al.* (1994). Las células tripsinizadas se siembran en placas de cultivo de 20 cm² en DMEM con suero al 5%, a una concentración de 3,5 x 10⁵ células por placa. Las células se incuban a 37°C cambiando el medio de manera rutinaria todos los días. A distintos tiempos, el medio de cultivo se retira, se lava la monocapa con PBS y se recogen las células en 200 µL

de tampón Tris 2 mM, pH 7,2, que contiene manitol 50 mM. La muestra se homogeneiza pasando la suspensión celular a través de una aguja de 0,5 x 16 mm y se conserva a 4°C hasta su valoración. La actividad de fosfatasa alcalina se determina con reactivos comerciales (Sigma Diagnostics, ALP 10), utilizando p-nitrofenolfosfato como sustrato. Una concentración fija de sustrato (1 mL de la solución comercial) se preincuba a 37°C durante 5 minutos en un espectrofotómetro termostatzado (Uvikon 930, Kontron) antes de añadir 20 µL de la muestra y medirse la absorbancia a 405 nm. El incremento en la absorbancia a 405 nm debido a la formación de p-nitrofenol es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, tomándose la pendiente entre 1 y 5 minutos de incubación. Como control se considera la absorción de 1 mL de la solución comercial en presencia de 20 µL de agua destilada en vez de la muestra. La actividad de la fosfatasa alcalina se expresa en miliunidades por miligramo de proteína total (mU/mg). La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto a 37°C.

2.5.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE 5'-NUCLEOTIDASA

Se utiliza el método radiactivo descrito por Gentry y Olsson (1975). Las medidas se realizan en tampón Tris 50 mM, pH 7,4, conteniendo MgCl₂ 10 mM y NaCl 120 mM (tampón de ensayo). Al pH al que se realiza el ensayo, las fosfatasas inespecíficas, ácidas y alcalinas, no son activas (Sun *et al.*, 1982). El ensayo estándar contiene AMP 0,1 mM y 0,05 µCi de sustrato marcado, [2-³H]adenosina-5'-monofosfato (1µCi/µL; 15 Ci/mmol; Amersham), en un volumen final de 500 µL de tampón de ensayo. La mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos bajo agitación constante, deteniéndose posteriormente la reacción por adición de 100 µL de una disolución de ZnSO₄ 0,3 M seguido de 100 µL de una disolución de Ba(OH)₂ 0,3 M. A continuación se centrifuga a 13.000g durante 15 minutos en una microfuga (Hettich Mikroliter), midiéndose la radiactividad de una alícuota de 400 µL del sobrenadante en un contador de centelleo líquido (Beckman LS3801). Todos los ensayos se realizan rutinariamente por duplicado o triplicado, corrigiéndose los valores de actividad con blancos de hidrólisis no enzimática. Estos controles se obtienen en idénticas condiciones a las indicadas anteriormente pero en ausencia de la muestra valorada. La actividad de 5'-nucleotidasa se expresa en unidades (cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de sustrato por minuto) o bien en nanomoles de AMP hidrolizados durante 15 minutos a 37°C, calculándose siempre en el tramo donde la hidrólisis de AMP se incrementa de forma lineal con el número de células utilizadas en el ensayo (Olmo *et al.*, 1992).

Actividad de 5'-nucleotidasa en células en suspensión

Las células se recogen por tripsinización y la suspensión así obtenida se centrifuga a

800 g durante 5 minutos. El sedimento se resuspende en medio de cultivo completo manteniéndose las células en suspensión durante 30 minutos a 37°C para su recuperación. Tras esta incubación, se lavan dos veces con el tampón de ensayo y se resuspenden en el volumen adecuado del mismo tampón, realizándose las diluciones pertinentes y procediéndose al ensayo de actividad en las condiciones anteriormente mencionadas. Durante la incubación las células se agitan suavemente en un agitador de balanceo.

2.6. ESTUDIOS GENÉTICOS

Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Benítez del Departamento de Genética Humana de la Fundación Jiménez Díaz.

2.6.1. DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO

Las células se siembran en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie en medio de cultivo completo y se dejan crecer durante 4-5 días para que se encuentren en la fase de crecimiento exponencial. En este momento, se les cambia el medio de cultivo por otro que contiene Colchicina a 0,06 µg/mL (Gibco) y se incuba durante 2-4 horas a 37°C. Las células se recogen por tripsinización, se centrifugan y resuspenden en un medio hipotónico de KCl al 0,56%, manteniéndose en estas condiciones 30 minutos a 30°C. Las células se vuelven a sedimentar por centrifugación y se fijan en metanol:ácido acético glacial (3:1, v/v). Las muestras se extienden sobre portaobjetos lavados con metanol y se dejan secar al aire. Algunos portaobjetos se tiñen con una disolución de Giemsa al 2,5% (Gibco) para proceder al conteo de los cromosomas; el resto se emplea para la determinación del cariotipo, por bandeo QFQ y GTG (Casperson *et al.*, 1970; Seabright, 1971). Se analizan varias metafases por cada línea celular y en diferentes pasajes de tripsinización.

2.6.2. AISLAMIENTO DE DNA

Las células se siembran en frascos de cultivo de 150 cm² y se dejan crecer en las condiciones habituales hasta alcanzar una densidad celular próxima a la confluencia. Las células se tripsinizan, se recogen en medio completo y se lavan con PBS. El sedimento celular se puede congelar a -80°C o se puede proceder al aislamiento del DNA de forma inmediata. Para aislar el DNA, el sedimento celular se lava con suero fisiológico y se centrifuga 2 minutos a 13.000 g, eliminando el sobrenadante, repitiéndose este proceso tres veces. A continuación se añade sobre la muestra Nonidet P-40 0,1% (v/v), se agita y se centrifuga 2 minutos a 13.000 g. El sedimento se incuba en 500 µL de tampón de digestión de proteínas [EDTA 25mM, pH 8,0, NaCl 100mM, SDS 0,5% (p/v) y 200 µg/mL de proteinasa K] a 42°C durante toda la noche o a 55-60°C durante 3 horas. Las proteínas y lípidos presentes se

eliminan añadiendo a la muestra fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v). La mezcla se agita y se centrifuga 2 minutos a 13.000g, para separar la fase orgánica de la acuosa. Sobre la fase acuosa, que contiene el DNA, se repite el proceso de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. A continuación, para eliminar el fenol, se añade cloroformo:alcohol isoamílico (24:1; v/v), se agita y se centrifuga 2 minutos a 13.000g recuperándose de nuevo la fase acuosa. La precipitación del DNA se realiza con NaCl 0,2 M y dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA se hidrata en etanol frío al 70% (v/v) y se resuspende en tampón Tris 1mM, pH 8,0, conteniendo 0,1 mM de EDTA. La concentración de DNA se determina a partir de la medida de la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro, considerando que una unidad de $A_{260\text{nm}}$ corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA.

2.6.3. INESTABILIDAD GENÉTICA

Las células se tripsinizan, se lavan con PBS y se guardan a -80°C . El DNA se extrae de las células tripsinizadas según el método descrito anteriormente y se amplifica por PCR para varios marcadores de microsatélites. Las distintas regiones de microsatélites examinadas fueron RHO (Weber *et al.*, 1989), D6s105 (Weber *et al.*, 1991), DMD-45 (Clemens *et al.*, 1991), D2S123 (Weissenbach *et al.*, 1992), D2S119 y HD (Reiss *et al.*, 1993), D4S95 (Allitto *et al.*, 1991), D4S111 (Scott *et al.*, 1992), DMD44 (Clemens *et al.*, 1991) y D4S127 (Taylor *et al.*, 1992). Los análisis por PCR se realizan usando 100-200 ng de DNA genómico en un volumen de 20 μL de la siguiente mezcla de reacción: Tris 10mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, 240 μM de cada deoxinucleótido trifosfato, 12,5 pmoles de cada cebador y 0,5-1 unidades de Taq polimerasa (Boehringer). Las reacciones de amplificación standard se realizan en las siguientes condiciones: treinta ciclos de 60 segundos a 94°C , 60 segundos a 55°C , y 90 segundos a 72°C , seguido por una extensión de 5 min a 72°C . Después de la amplificación, 5 μL de las muestras se desnaturalizan en formamida al 95% y se realiza una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6-9%, de acuerdo al tamaño de los fragmentos. Los geles se tiñen con bromuro de etidio y se fotografían bajo luz UV con una cámara Polaroid o, después de la electroforesis, los geles marcados radiactivamente se secan y exponen a películas fotográficas (Kodak) durante 4-12 horas. La mayoría de los experimentos se realizan con reacciones de PCR que contienen 1-2 μCi de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3.000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), pero la tinción con bromuro de etidio muestra unos resultados similares.

2.6.4. ANALISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *p53* Y *MSH2*

Para detectar posibles mutaciones en el gen *p53* se lleva a cabo el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) en el exon 8 de este gen. La amplificación del DNA se realiza por la reacción en cadena de la polimerasa, usando 100 ng de DNA en 10 μL de la mezcla de reacción que contiene: Tris 10mM (pH 8,3), KCl 50 mM,

MgCl₂ 1,5 mM, deoxinucleótidos trifosfato 200 μM y 10 pmoles de cada cebador (Kocialkowski *et al.*, 1995), 1 unidad de Taq polimerasa (Boehringer) y 1 μCi de α³²P-dCTP (3.000 Ci/mmol; 10 μCi/μl). Las reacciones de amplificación consisten en 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización, 1 minuto a 62°C para el alineamiento, y 1 minuto de extensión a 72°C, usando para ello un sistema de PCR Perkin-Elmer. Los productos de PCR se diluyen con una disolución de formamida al 95% (v/v), EDTA 20 mM, xilencianol al 0,05% (p/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v). Tras la desnaturalización, las muestras se aplican en geles de poliacrilamida al 6-8% en condiciones no desnaturalizantes, con glicerol al 10% (v/v), y se desarrolla la electroforesis a 10 W durante 11-18 horas. El gel se seca sobre papel de filtro y se expone a una película de autorradiografía a temperatura ambiente o a 4°C durante 1-6 horas.

La secuenciación se realiza usando los mismos cebadores empleados para el análisis de SSCP. Las reacciones de secuenciación se desarrollan según el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) usando el *kit* comercial "Sequenase" (USB, USA). Los productos se someten a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. Todas las mutaciones se confirman secuenciando la cadena complementaria.

Para detectar mutaciones en el gen *MSH2*, se amplifican por PCR las secuencias que codifican a los nucleótidos 2020-2225 del cDNA y las regiones del DNA genómico que contienen a las uniones intron/exon utilizando los primers 16324 y 16340 (Fishel *et al.*, 1993). Los productos de PCR se analizan por polimorfismo conformacional de cadena sencilla usando métodos standard (Orita *et al.*, 1989).

2.7. DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO INTEGRINA

2.7.1. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS HETERODÍMEROS DE INTEGRINAS

Marcaje de la superficie celular con D-[6-³H]-Glucosamina

Las células, sembradas en frascos de cultivo de 165 cm² de superficie, se incuban en las condiciones habituales hasta que el cultivo alcanza un estado semiconfluyente. A continuación, las células se incuban durante 48 horas a 37°C en medio RPMI con bajo contenido en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 5% (v/v), penicilina 50 U/mL, estreptomycin 50 μg/mL, L-glutamina 300 μg/mL y D-[6-³H]Glucosamina (6 μCi/mL; 31 Ci/mmol). Transcurrido este período se retira el medio, y la monocapa celular se lava con PBS. Las células se raspan y se recogen por centrifugación a 800g durante 10 minutos.

Marcaje de la superficie celular con Sulfo-NHS-biotina

Las células se recogen por tripsinización, se lavan tres veces con PBS, centrifugándose 10 minutos a 800g después de cada lavado. Tras el tercer lavado con PBS, el sedimento

celular se resuspende en tampón Hepes 0,1 M, pH 8,0, y se centrifuga de nuevo en las condiciones anteriores. El sedimento obtenido se resuspende en 5 mL de tampón Hepes 0,1M, pH 8, que contiene sulfo-NHS-biotina a una concentración de 0,1 mg/mL y se deja incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. De esta manera se favorece la unión de la biotina a los residuos de lisina de las proteínas. Tras la incubación, se elimina el exceso de biotina lavando varias veces con medio de cultivo.

Inmunoprecipitación de las integrinas

Todas las etapas descritas a continuación se realizan a 4°C. El sedimento celular, marcado con D-[6-³H(N)]-Glucosamina o con biotina, se extrae con 1 mL de tampón de lisis (Tris 10mM, pH 7,4, NaCl 0,14M, Triton X-100 al 2%, NEM 2mM y PMSF 2mM), durante 6 horas y con agitación. Transcurrido este tiempo, la muestra se sonica durante 5 minutos a 4°C, con sonicador de vástago (MSE), y se centrifuga a 13.000g durante 15 minutos para eliminar el material no solubilizado. El extracto celular se clarifica incubando con 100 µL de Sepharose-4B (equilibrada en tampón de lisis) durante 1 hora con agitación, tras lo cual la muestra se centrifuga a 13.000g durante 15 minutos. El sobrenadante se clarifica de nuevo y se centrifuga en las condiciones anteriores. Alícuotas de 250 µL del extracto de proteínas clarificado, se incuban durante 20 horas con 100 µL del anticuerpo anti-integrina correspondiente. Transcurrido este tiempo, la muestra se incuba durante 90 minutos con 2 µL de un segundo anticuerpo frente al anticuerpo anti-integrina, para favorecer el reconocimiento del inmunoprecipitado por la proteína A-Sepharose. A continuación, la muestra se incuba con 50 µL de Proteína A-Sepharose (equilibrada en el tampón de lisis), durante 2 horas y con agitación, para favorecer la unión del inmunoprecipitado a la Proteína A. La muestra se centrifuga a 13.000g durante 15 minutos, y el precipitado se lava tres veces con tampón de lisis que contiene Triton al 1%. Tras la última centrifugación se añaden 30 µL de tampón de aplicación carente de agente reductor al precipitado, y la muestra se congela a -20°C hasta su aplicación en electroforesis.

Tras la electroforesis, la detección de las integrinas se realiza por autorradiografía o por detección de proteínas biotiniladas. En este último caso, tras la electroforesis se realiza la transferencia a membranas de nitrocelulosa. La membrana se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con tampón B [Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, Tween-20 al 0,2% (v/v)] que contiene leche en polvo deslipidizada al 5% (p/v). A continuación, se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con Avidina-peroxidasa (BioRad) diluida 1:1000 en tampón B conteniendo leche deslipidizada al 0,1% (p/v). Posteriormente la membrana se lava varias veces con tampón B y, finalmente, se efectúa un último lavado con este mismo tampón pero en ausencia de Tween-20. La detección de las bandas se realiza utilizando el *kit* comercial de ECL, revelándose la película fotográfica en una procesadora de sobremesa Agfa Curix 60.

2.7.2. CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD EN SEPHAROSE 4B

Anclaje de las proteínas de la matriz a Sepharose 4B

Como soporte para las cromatografías de afinidad se emplea Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) a la que se une covalentemente laminina, fibronectina o colágeno de tipo I. Para la unión del ligando a la Sepharose 4B, 20 mg de cada una de las proteínas se dializan frente al tampón de anclaje (bicarbonato 0,1M, pH 8,3, NaCl 0,5 M, en el caso de fibronectina y colágeno, y bicarbonato 0,1M, pH 7,3, que contiene NaCl 0,5M y EDTA 10mM, para la laminina). El gel se prepara por lavados con HCl 1mM (200 mL/g de gel utilizado), y un último lavado con el tampón de anclaje. La disolución de proteína se añade al gel rápidamente ya que los grupos activados de la resina son inestables a este pH. La mezcla se mantiene con agitación continua suave durante 24 horas a 4°C. La proteína no unida covalentemente se elimina por filtración y lavados con tampón de anclaje. El gel se resuspende en tampón Tris 0,1 M, pH 8,3, manteniéndose en este tampón durante 2 horas a temperatura ambiente para eliminar los grupos activos residuales. Finalmente se realizan 3 lavados alternos con tampón acetato 0,1 M, pH 4,0, que contiene NaCl 0,5 M, y con tampón Tris 100 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M. La resina se conserva a 4°C en este último tampón. En estas condiciones, prácticamente toda la proteína se une a la resina, como se comprueba por análisis de aminoácidos de la proteína no anclada a la Sepharose 4B. La concentración final de cada una de las proteínas es de aproximadamente 2mg de proteína/mL de Sepharose 4B.

Cromatografías de afinidad

La purificación de receptores de tipo integrina se realiza mediante cromatografía de afinidad en columnas de Sepharose-laminina, Sepharose-fibronectina y Sepharose-colágeno tipo I (de 2mL de lecho), equilibradas en tampón Tris 50 mM, pH 7,3, conteniendo NaCl 0,15 M, PMSF 1mM, NEM 1mM, MnCl₂ 1mM y n-octil-β-D-glucopiranosido 25 mM (tampón de equilibrado). Todas las etapas de estas cromatografías se llevan a cabo a temperatura ambiente.

El sedimento celular, marcado con sulfo-NHS-biotina como se ha descrito anteriormente, se extrae con 1 mL del tampón de equilibrado que contiene n-octil-β-D-glucopiranosido 50 mM, durante 5-18 horas a 4°C con agitación. Posteriormente, se centrifuga a 13.000g durante 15 minutos a 4°C para eliminar el material no solubilizado. La muestra se carga en la columna, haciéndola pasar a través de ella entre 5 y 10 veces para permitir la unión de las integrinas al ligando anclado. Posteriormente, la columna se lava con 5 mL del tampón de equilibrado y se recogen alícuotas de 200 μL que contendrán principalmente proteínas que se unen de manera muy débil al ligando. Las proteínas retenidas se eluyen mediante el tampón de equilibrado de la columna (5 mL) pero sin MnCl₂ 1mM y conteniendo EDTA 10 mM, recogiendo fracciones de 200 μL que contendrán las integrinas que se han

unido específicamente al ligando anclado a la resina. Por último, la columna se lava con tampón de equilibrado que contiene NaCl 1 M, eluyéndose el resto de proteínas que hayan podido quedar ancladas a la columna. El perfil de elución de la cromatografía se registra midiendo la absorbancia a 280 nm y se seleccionan las fracciones a analizar.

Las muestras procedentes de la cromatografía de afinidad se dializan exhaustivamente frente a ácido acético 0,1 M. Se añaden 20 μ L de tampón de aplicación y se liofilizan. Se resuspenden en 20 μ L de agua destilada y se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% tras lo cual se procede a su identificación con Avidina-peroxidasa, como se ha descrito anteriormente. Si las muestras eluidas de la cromatografía se van a someter a inmunoprecipitación, éstas se concentran previamente por centrifugación a 4°C utilizando filtros Ultracent-30 Unisep (BioRad) con un poro promedio que excluye proteínas de masa molecular mayor de 30 kDa. La muestra concentrada se dializa frente al tampón de equilibrado de la columna para eliminar el exceso de n-octil- β -D-glucopiranosido y se inmunoprecipita con el anticuerpo correspondiente como se ha indicado anteriormente. El inmunoprecipitado se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% y posterior revelado con Avidina-peroxidasa.

2.7.3. LOCALIZACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE RECEPTORES DE TIPO INTEGRINA

Cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro se incuban con 300 μ L de disoluciones de laminina, fibronectina, colágeno de tipo I o colágeno de tipo IV a 10 μ g/mL durante toda la noche a 4°C. A continuación se lavan con PBS y se incuban durante 2 horas a 37°C con PBS conteniendo BSA al 0,5% (p/v). Transcurrido este tiempo, se lavan los cubreobjetos con PBS y las células se siembran en medio libre de suero, incubándose durante 24 horas a 37°C. A continuación, las células se lavan con PBS y se fijan por inmersión durante 10 minutos en etanol a -20°C. Después de lavar con PBS, las preparaciones se incuban 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con anticuerpos anti- β_1 ALEX1/4 (dilución 1:10 en PBS) o anti-fosfotirosina (dilución 1:40 en PBS). El anticuerpo no unido se elimina por repetidos lavados con tampón, tras lo cual las células se incuban durante 45 minutos con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (Chemicon) (dilución 1:20 en PBS), en cámara húmeda y en la oscuridad. Tras lavar con PBS y deshidratar con etanol, las preparaciones se montan con moviol y se observan al microscopio invertido de fluorescencia Nikon Diaphot-TMD, utilizando como fuente una lámpara de mercurio (Nikon). Las fotografías se realizan con un sistema Nikon H-III.

2.7.4. INMUNOFLUORESCENCIA DE MICROTÚBULOS Y MICROFILAMENTOS

Las células se siembran sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro saturados con los diferentes componentes de la matriz extracelular, y se incuban durante 72 horas a 37°C en las condiciones habituales. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos se lavan con un tampón PIPES 100 mM, pH 6,8, EGTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM (tampón PEM) al que se le añade polietilenglicol (PEG) al 4% (v/v). Seguidamente, las células se permeabilizan con tampón PEM que contiene Triton X-100 al 0,5% (v/v) durante 90 segundos. Se vuelven a lavar las células con el tampón PEM/PEG, tras lo cual se fijan con paraformaldehído al 3,7% (v/v) y DMSO al 1% (v/v) en tampón PEM, durante 30 minutos. Una vez fijadas, se lavan con PBS y se procede a la tinción de los componentes del citoesqueleto.

La primera etapa es la incubación durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, con un anticuerpo policlonal antitubulina α y β (dilución 1:20 en PBS). Tras la incubación se lava con PBS y se añade el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (dilución 1:20), y se incuba a 37°C durante 45 minutos, en cámara húmeda y en la oscuridad. Por último, las preparaciones se lavan con PBS y las muestras se montan como se ha indicado anteriormente o bien se procede a la tinción de los microfilamentos de actina.

Para realizar un doble marcaje de tubulina y actina, antes del montaje de las preparaciones, éstas se incuban con una disolución de faloidina-rodamina (Molecular Probes; dilución 1:20) en condiciones idénticas a las descritas para el anticuerpo anti-antitubulina. La faloidina se une específicamente a la actina y la rodamina proporciona una fluorescencia de color rojo.

2.7.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINAS

Placas de cultivo de 60 cm² de superficie se tratan con 10 mL de laminina, fibronectina, colágeno tipo I y polilisina, a 10µg/mL, de la misma manera que se ha descrito para el ensayo de adhesión. Las células se tripsinizan, recogen y dejan recuperar en medio completo, durante 30 minutos a 37°C, tras lo cual se centrifugan y resuspenden, a la concentración requerida, en medio libre de suero que contiene BSA al 0,1% (p/v). Se siembran 8x10⁶ células por placa y se dejan adherir a 37°C durante diferentes tiempos. A 15 minutos, 30 minutos, 1, 4 y 24 horas, se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa celular 2 veces con tampón de lavado (tampón PBS o TBS que contiene Na₃VO₄ 2mM, NaF 10mM, EDTA 2mM, PMSF 1mM y NEM 1mM). Las células se recogen raspando la monocapa con una espátula de goma, tras lo cual se centrifugan y el sedimento celular se extrae con tampón de extracción [Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 0,15M, Triton X-100 al 2% (v/v), EDTA 2mM, PMSF 1mM, NEM 1mM] que contiene los inhibidores específicos de

fosfatasas Na_3VO_4 2mM y NaF 10mM. Esta suspensión celular se homogeneiza mediante 7-8 pases a través de una aguja de 0,5x16 mm y se centrifuga 1-2 minutos a 13.000g, recogiendo el sobrenadante. Una vez determinada la concentración de proteína, se toman 50µg de proteína y se adiciona tampón de muestras de electroforesis concentrado 3 veces que contiene β-mercaptoetanol. Las muestras se desnaturalizan y se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas fosforiladas en tirosina se detectan utilizando anticuerpos antifosfotirosina (PY20 dilución 1:1000). La transferencia e inmunodetección se lleva a cabo en las condiciones descritas anteriormente, añadiendo en todas las etapas de incubación y lavados Na_3VO_4 2mM.

Ensayos de agrupamiento de integrinas

Se siembran 6×10^6 células en medio de cultivo completo en placas de 60 cm² y se incuban durante 2 días en las condiciones habituales. A continuación, las células se lavan tres veces con medio frío y se incuban con el anticuerpo anti-β₁ (LIA1/2, dilución 1:20 en medio con 100µM de Na_3VO_4) durante 30 minutos a 4°C. El exceso de anticuerpo se elimina lavando las células con medio DMEM frío libre de suero, tras lo cual se incuban con un anticuerpo anti-IgG de ratón, a 37°C durante diferentes tiempos (5, 15, 30 ó 60 minutos). Esta incubación permite el agrupamiento de integrinas, tomándose como control la fosforilación de proteínas en ausencia del segundo anticuerpo. Terminada la incubación, se lava la monocapa celular 2 veces con tampón de lavado (tampón PBS o TBS que contiene Na_3VO_4 2mM, NaF 10mM, EDTA 2mM, PMSF 1mM y NEM 1mM). Las células se recogen y se procesan para detectar las proteínas fosforiladas, como se recoge en el apartado anterior.

2.7.6. DETECCIÓN DE NIVELES DE CALCIO INTRACELULAR

Preparación de la sonda Calcium Green

Para la detección del calcio intracelular se emplea la sonda Calcium GreenTM-1,AM y el detergente no iónico Pluronic F-127 (ambos de Molecular Probes Europe BV), para solubilizar la sonda en medio acuoso. Se toman 1 µL de Calcium GreenTM-1,AM de una disolución 4 mM en DMSO (p/v) y 1 µL de Pluronic F-127 [al 20% (p/v) en DMSO] y se lleva a un volumen final de 1 mL con tampón sonda: Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, 5 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 5 mM glucosa, 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 y 0,1% BSA (p/v). La mezcla se sonica en un sonicador de baño durante 10 minutos.

Marcaje de las células

Las células tripsinizadas se resuspenden en medio DMEM completo con suero al 5% (v/v) y se dejan recuperar a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este período, las células

se centrifugan durante 10 minutos a 800 g y se lavan con PBS, para eliminar el medio con suero. Alícuotas de 10×10^6 células se resuspenden en 1 mL de tampón sonda, conteniendo 4 μM de Calcium GreenTM-1,AM y 0,2 mg/mL de Pluronic F-127, y se incuban 1 hora a temperatura ambiente.

Medida del calcio intracelular tras la interacción de las células con diferentes sustratos

Se toman alícuotas de 5×10^5 células en tampón sonda al que se añade fibronectina o laminina a diferentes concentraciones finales, e inmediatamente y a diferentes tiempos (de 1 a 10 minutos) se mide la fluorescencia emitida al interaccionar la sonda con el calcio intracelular. Antes de realizar las medidas se añaden 50 μL de yoduro de propidio a 0,005 % (p/v), para determinar el número de células viables. Como valor control se toma la fluorescencia basal en ausencia de laminina o fibronectina. Las medidas se realizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) del Centro de Citometría de Flujo y Confocal de la Universidad Complutense de Madrid y los datos son analizados en un ordenador HP310.

2.8. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.8.1. ESTUDIOS DE TUMORIGENICIDAD

Las células, mantenidas en las condiciones habituales, se recogen por tripsinización, se centrifugan y se dejan recuperar durante al menos una hora a 37°C en medio de cultivo completo. Posteriormente se lavan con PBS y se resuspenden a la densidad celular requerida en DMEM libre de suero o en PBS. Estas suspensiones celulares (0,2 mL) se inyectan subcutáneamente, solas o en presencia del factor a estudiar, en ratones machos genéticamente atímicos (BALBc, nu/nu) de 8 semanas de edad (IFFA-CREDO). Los ratones se mantienen en un ambiente y condiciones estériles en el animalario de la Universidad Complutense. La evolución de los posibles tumores se sigue diariamente para determinar cuando los tumores comienzan a ser visibles y, a partir de entonces, el tamaño del tumor se mide semanalmente. El período de latencia se estima como el número de días necesario para obtener tumores con 0,2-0,3 mm de diámetro. El tamaño del tumor se calcula midiendo con un calibre las dimensiones de la masa tumoral (la media de los dos diámetros del tumor) a varios tiempos tras la inyección. A los tiempos indicados, los ratones se sacrifican, los tumores se extraen en condiciones asépticas y se utilizan en diferentes experimentos. En cada uno de los ensayos se utilizan 4 ratones por grupo, y cada experimento se realiza, al menos, por duplicado. Para descartar la posible influencia de la localización donde se realice la inoculación, ésta se lleva a cabo en la región lumbar del ratón, de forma indistinta en la parte anterior o posterior y a ambos lados, izquierdo y derecho.

En la figura 10 se esquematiza el proceso seguido para la obtención de las diferentes sublíneas tras la inyección subcutánea en ratones atímicos, así como los nombres asignados a cada una de ellas.

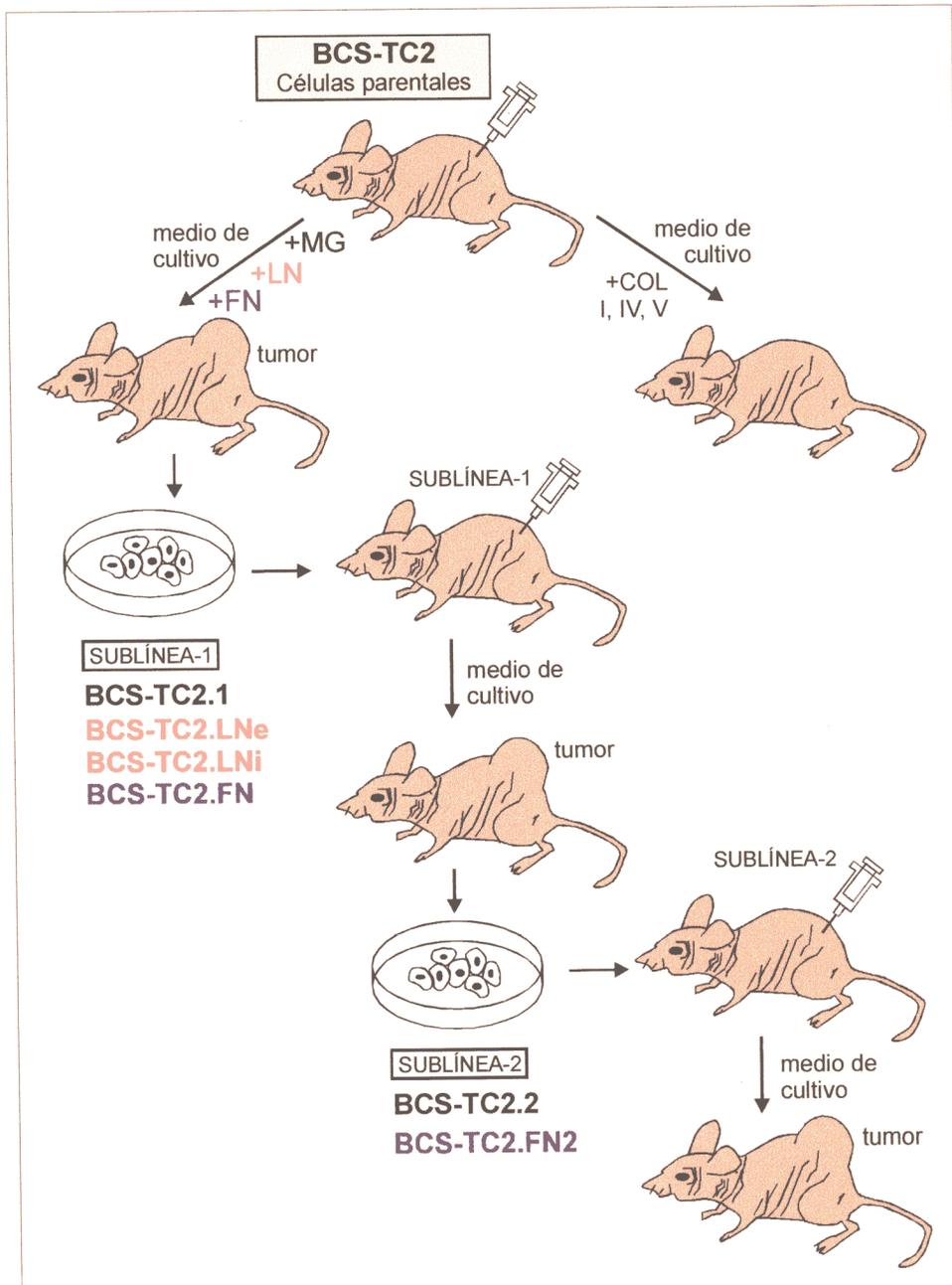


Figura 10.- Proceso de obtención de sublíneas por inyección subcutánea de células en ratones atímicos.

Cuando se observa la formación de un tumor subcutáneo, éste se extrae en condiciones estériles y se procede a la obtención de células que se propagan en cultivo. Una vez establecido y estabilizado el cultivo, las células se utilizan en distintos ensayos. Para cada una de las sublíneas se determina la tumorigenicidad por inyección subcutánea en ratones atímicos. En el esquema se indican las diferentes sublíneas establecidas a partir de tumores obtenidos por coinyección de las células parentales con componentes de la matriz. Cada uno de los factores utilizados y las células obtenidas se muestran en un color.

2.8.2. ESTUDIOS DE METÁSTASIS

Las células se recogen por centrifugación y se dejan recuperar durante una hora a 37°C en medio completo. Posteriormente se lavan con PBS y se resuspenden a la densidad celular requerida en DMEM libre de suero o en PBS. La suspensión celular (50 μ L), a la concentración celular deseada, se inyecta, sola o en presencia del factor a estudiar, en el bazo de ratones atímicos de 8 semanas mantenidos en las condiciones indicadas en el apartado anterior. Para ello, una vez localizado el bazo visualmente a través de la piel, se realiza un corte en la región ventro-dorsal exponiendo el bazo. Para evitar posibles hemorragias, la inyección de las células se realiza con una aguja de 0,5 x 16 mm en la parte distal del bazo. A continuación, esta región se lava con etanol para eliminar las células que puedan haber quedado en la superficie del bazo y evitar así que pasen a la cavidad peritoneal. Finalmente, el bazo se vuelve a introducir en la cavidad peritoneal y se procede a la sutura del corte con un aplicador de grapas (Clay Adams).

La evolución de los ratones se sigue semanalmente para determinar cuándo se observa algún indicio de posibles metástasis. Al finalizar el experimento, los ratones se sacrifican y, por observación visual, se analiza la existencia de metástasis en hígado o pulmón, así como la aparición de tumores en otros órganos. En la figura 11 se representa el procedimiento seguido para la obtención de las sublíneas metastáticas, así como los nombres asignados a ellas.

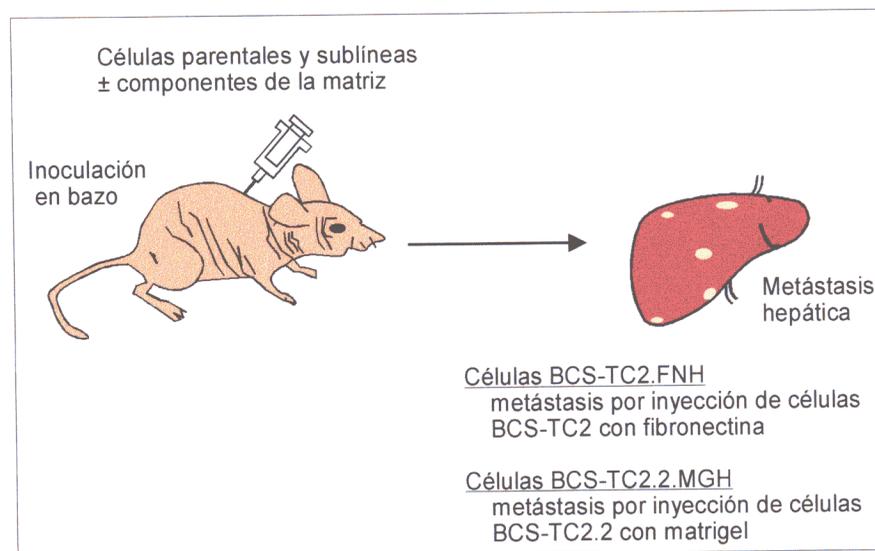


Figura 11.- Esquema de la obtención de sublíneas metastáticas.

Células parentales o diferentes sublíneas tumorigénicas se inyectan en el bazo de ratones atímicos, solas o en presencia de componentes de la matriz extracelular y se observa la formación de focos metastáticos. Sólo en dos casos, indicados en la figura, se ha conseguido el establecimiento y estabilización de células en cultivo procedentes de metástasis hepática.

2.8.3. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Se emplean secciones de tejido, previamente fijado en formaldehído al 10% en PBS, y rutinariamente procesado para su inclusión en parafina (deshidrataciones con alcohol a concentraciones crecientes y finalmente benceno. Se preparan cortes de 4 μm de grosor en un microtomo, y las secciones se recogen sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma). Las secciones rehidratadas en alcoholes seriados y PBS se tratan con H_2O_2 al 1,2% en metanol absoluto, con el fin de inhibir a la peroxidasa endógena, y se tiñen de acuerdo al método de la avidina-biotina-peroxidasa. Para realizar la inmunodetección de ciertos antígenos, las secciones se incuban durante 1 hora a 37°C con el primer anticuerpo (MIB-1, CEA, LCA, AE1 o AE3) a la dilución adecuada. Tras este período, se lava con PBS y se incuban las muestras con el segundo anticuerpo obtenido en cabra, frente a anticuerpos de ratón, conjugado con peroxidasa (Pierce), durante 45 minutos a 37°C. Después de lavar con PBS, las secciones se tiñen usando diaminobenzidina (DAB) y se contrastan con hematoxilina. Finalmente, todas las preparaciones se deshidratan en alcoholes seriados, se tratan con xilol y se montan con DePX (Serva). Algunas secciones se tiñen con eosina/hematoxilina para su examen histológico.

2.9. ANTICUERPOS UTILIZADOS

Los distintos anticuerpos secundarios utilizados en los distintos ensayos descritos en la Memoria han sido:

- * anticuerpos anti-IgG de ratón obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa, de PIERCE
- * anticuerpos anti-IgG (H+L) de conejo obtenidos en cabra y marcados con peroxidasa, de BIORAD
- * anticuerpos anti-IgG de ratón o de rata obtenidos en cabra y conjugados con isotiocianato de fluoresceína, de CHEMICON.
- * anticuerpos anti-IgG de ratón o de rata obtenidos en conejo, de Sigma

En el siguiente cuadro se recogen los anticuerpos primarios utilizados en los distintos ensayos. Se indica si son anticuerpos monoclonales o policlonales y si se ha utilizado medio de cultivo de hibridomas, fluido ascítico, etc. En algunos casos dichos anticuerpos son comerciales, en otros han sido cedidos amablemente por diferentes grupos de investigación.

Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Origen
TS2/7	Integrina α_1	Medio de hibridoma	Dr. Sánchez-Madrid
5E8D9	Integrina α_1	Medio de hibridoma	Dr. Cabañas
TEA1/41	Integrina α_2	Medio de hibridoma	Dr. Sánchez-Madrid
P1E6	Integrina α_2	Fluido ascítico	Chemicon
P1B5	Integrina α_3	Fluido ascítico	Chemicon
HP2/1	Integrina α_4	Medio de hibridoma	Dr. Sánchez-Madrid
BIIG2	Integrina α_5	Medio de hibridoma	Dra. Damsky
Mab1986	Integrina α_5	Fluido ascítico	Chemicon
GoH3	Integrina α_6	Medio de hibridoma	Dr. Sonnenberg
LIA1/2 ALEX1/4 TS2/16	Integrina β_1	Medio de hibridoma	Dr. Sánchez-Madrid
AIIB2	Integrina β_1	Medio de hibridoma	Dra. Damsky
3E1	Integrina β_4	Fluido ascítico	Chemicon
	5'-nucleotidasa	Suero de conejo	Obtenido en el laboratorio
MLUC5 MLUC6	Proteína unión a laminina	Medio de hibridoma	Dra. Ménard
PT-66	Fosfotirosina	Fluido ascítico	Sigma Immunochemicals
PY20	Fosfotirosina	Fluido ascítico	ICN Biomedicals
	Matrilisina	Suero de conejo	Dra. Mira
MIB-1	Antígeno nuclear Ki-67	Medio de hibridoma	Immunotech
CE J063	Antígeno carcinoembrionario	Medio de hibridoma	Immunotech
AE1 AE3	Citoqueratinas	Medio de hibridoma	Signet
LCA	Antígeno común leucocitario	Medio de hibridoma	Signet

Dr. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid); Dr. Cabañas (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UCM); Dra. Damsky (Escuela de Odontología, Universidad de California, San Francisco); Dr. Sonnenberg (Blood Transfusion Service, Amsterdam, Holanda); Dra. Ménard (Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italia); Dra. Emilia Mira (Farmacia UpJohn, Madrid).

**RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN**

3.1. EFECTO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR SOBRE EL COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS BCS-TC2

En el organismo las células se encuentran en contacto con la matriz extracelular, de manera que cada uno de los componentes de la ECM puede desempeñar una función importante en la regulación del comportamiento celular. Como ya se ha comentado en la Introducción, en procesos tumorales las interacciones entre las células transformadas y la matriz se encuentran alteradas. Por ello, para comprender como tienen lugar estos procesos, es fundamental el estudio de las interacciones célula tumoral-matriz extracelular. Inicialmente el estudio se ha centrado en analizar el efecto que la interacción con distintos componentes de la matriz ejerce sobre el comportamiento *in vitro* de las células BCS-TC2.

3.1.1. EFECTO SOBRE LA ADHESIÓN CELULAR

En las células que *in vitro* crecen adheridas a una superficie hay que tener en cuenta la sucesión de dos procesos claves. Inicialmente se produce la adhesión de la célula a la superficie de cultivo, tras lo cual tiene lugar la extensión celular, originándose una serie de cambios metabólicos requeridos para el inicio de la proliferación celular. Las células BCS-TC2 se adhieren poco al plástico en condiciones normales de cultivo, requiriéndose varias horas para adherirse a este sustrato. Sin embargo, cuando se tripsinizan y resiembran en la misma botella de cultivo, tanto la adhesión como la extensión tienen lugar más rápidamente. Estas observaciones sugieren que el comportamiento de las células BCS-TC2 se modifica por la presencia de una matriz extracelular preformada, o bien por alguno de sus componentes o por factores séricos.

Efecto de matrices extracelulares

Como se ha comentado, la matriz extracelular se puede clasificar en dos tipos, el tejido conectivo intersticial (colágeno de tipo I, fibronectina, etc.) y los basamentos membranosos (colágeno de tipo IV, laminina, etc.). Por este motivo, se ha estudiado la capacidad que presentan las células BCS-TC2 de interaccionar con ambos tipos de matrices, así como con los principales componentes moleculares de las mismas.

El control de adhesión es el número de células adheridas a una superficie de cultivo tapizada con albúmina de suero bovino (BSA); 10 horas después de la siembra se adhiere sólo un 30% de las células BCS-TC2 (Figura 12). Sin embargo, se produce un considerable incremento de la adhesión celular cuando las células se siembran sobre matrices extracelulares producidas por las propias células (tc-ECM) o por fibroblastos humanos (f-ECM), sobre un gel de colágeno tipo I o sobre una matriz artificial formada con un extracto de placenta humana. Así, 3 horas después de la siembra, aproximadamente el 70%

de las células se adhiere a las diferentes matrices, mientras que sólo un 20% lo hace sobre BSA. Es de destacar la alta capacidad de adhesión de las células BCS-TC2 a la matriz intersticial (f-ECM), ya que las células de origen epitelial normalmente se adhieren mejor a las matrices que han sido secretadas por células endoteliales o epiteliales (tipo basamento membranoso, como la tc-ECM).

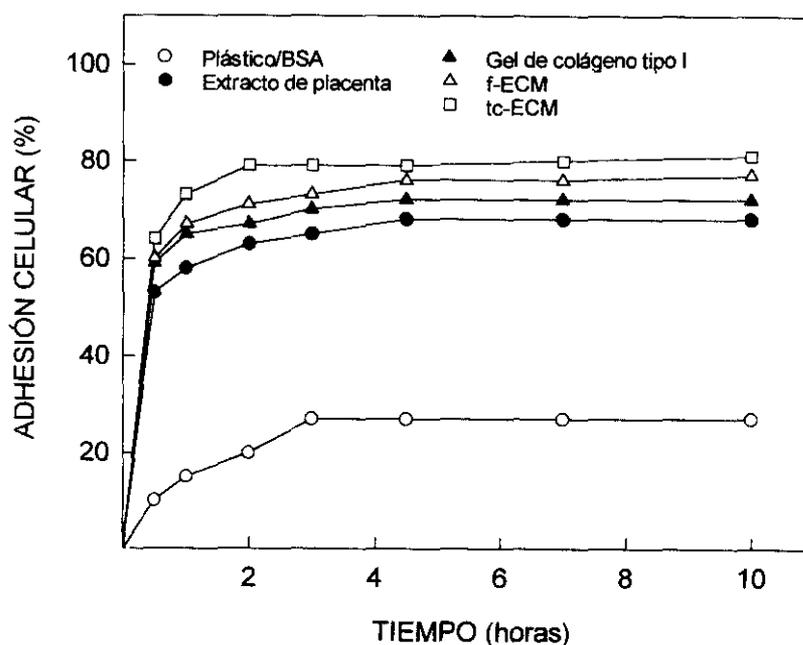


Figura 12.- Cinéticas de adhesión de las células BCS-TC2 a matrices extracelulares.

Las cinéticas de adhesión se realizan como se detalla en Materiales y Métodos. Las células se dejan adherir sobre los sustratos y a diferentes tiempos se determina el número de células adheridas por tinción con violeta cristal. Los resultados se expresan como el porcentaje de células adheridas respecto del número total de células sembradas y son la media de, al menos, tres experimentos independientes realizados con determinaciones para cada dato por cuadruplicado. El error experimental es inferior al 10% en todos los casos. f-ECM (matriz secretada por fibroblastos), tc-ECM (matriz secretada por las células BCS-TC2).

Efecto de componentes de la matriz extracelular

Puesto que las células BCS-TC2 son capaces de adherirse a ambos tipos de matrices, se procedió a determinar la adhesión celular a las proteínas mayoritarias que las componen. Se analizó la adhesión a laminina, fibronectina, colágeno de tipo I y colágeno de tipo IV saturando las superficies de cultivo con disoluciones de las proteínas en un rango de concentraciones comprendido entre 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A estas concentraciones estas proteínas son capaces de mediar la adhesión tanto de células normales como de células transformadas (Aumailley *et al.*, 1990b; Dedhar y Saulnier, 1990). Los resultados obtenidos, que se

recogen en la figura 13, indican que la saturación se alcanza a concentraciones comprendidas entre 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$, y que la adhesión celular sobre ambos tipos de colágenos es superior a la obtenida sobre las glicoproteínas fibronectina y laminina. Sin embargo, no se ha determinado la cantidad de proteína efectiva adherida a los pocillos, por lo que la diferencia observada podría deberse a una mejor saturación de la superficie de adhesión por éstas proteínas.

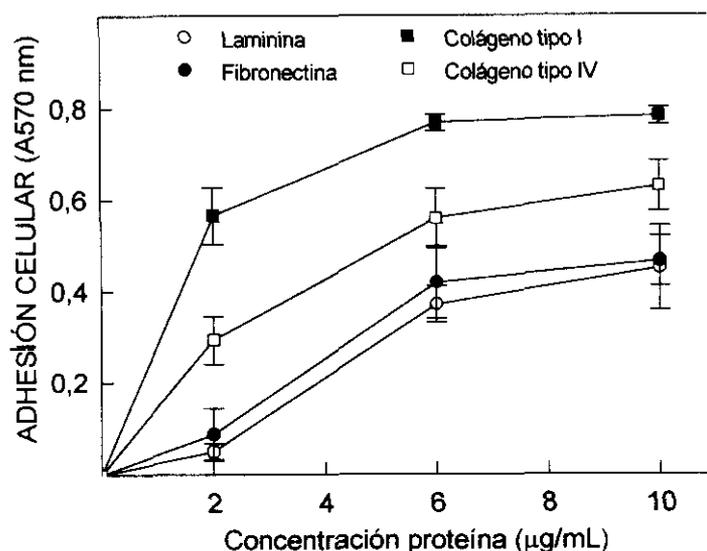


Figura 13.- Adhesión de las células BCS-TC2 a distintos componentes de la matriz extracelular.

Los experimentos de adhesión se llevan a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células se dejan adherir durante 30 minutos sobre pocillos recubiertos con los sustratos, valorándose el número de células adheridas por tinción con violeta cristal. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm restando la absorbancia debida al control (células adheridas sobre BSA) y proceden de, al menos, tres experimentos independientes realizados con determinaciones para cada punto por cuadruplicado.

Las cinéticas de adhesión (Figura 14) indican que cuando las células se siembran sobre colágeno de tipo I o de tipo IV, éstas se adhieren rápidamente y se incrementa notablemente el porcentaje de adhesión respecto al BSA. Sin embargo, no se observa ningún efecto cuando la superficie se satura con colágeno de tipo V (Figura 14A), lo que indica que los efectos observados sobre la adhesión de las células BCS-TC2 son específicos de determinadas proteínas de la ECM. Además, se requiere que el colágeno se encuentre en la conformación nativa (triple hélice), puesto que las células BCS-TC2 no se adhieren a gelatina (colágeno de tipo I desnaturalizado).

Como se observa en la figura 14A, las células BCS-TC2 se adhieren más lentamente a las proteínas que a las matrices extracelulares, siendo también menor el número de células adheridas. Así, después de 3 horas, un 50 y un 55% de células se han adherido a colágeno de tipo IV y de tipo I, respectivamente, mientras que aproximadamente un 70% de las células lo hacen sobre las matrices f-ECM y tc-ECM (Figura 12). Este incremento en la adhesión, considerando la gran variedad de proteínas que constituyen las matrices, puede ser el resultado de la participación de otros componentes minoritarios de las mismas que podrían ser reconocidos por las células, o bien que la estructura tridimensional que adquieren las matrices pueda mimetizar mejor el entorno de las células *in vivo*. Al comparar los datos de adhesión de las células sobre colágeno de tipo I formando un gel (Figura 12) o una película (Figura 14A) se pone de manifiesto el requerimiento de una estructura tridimensional adecuada del sustrato en la adhesión celular.

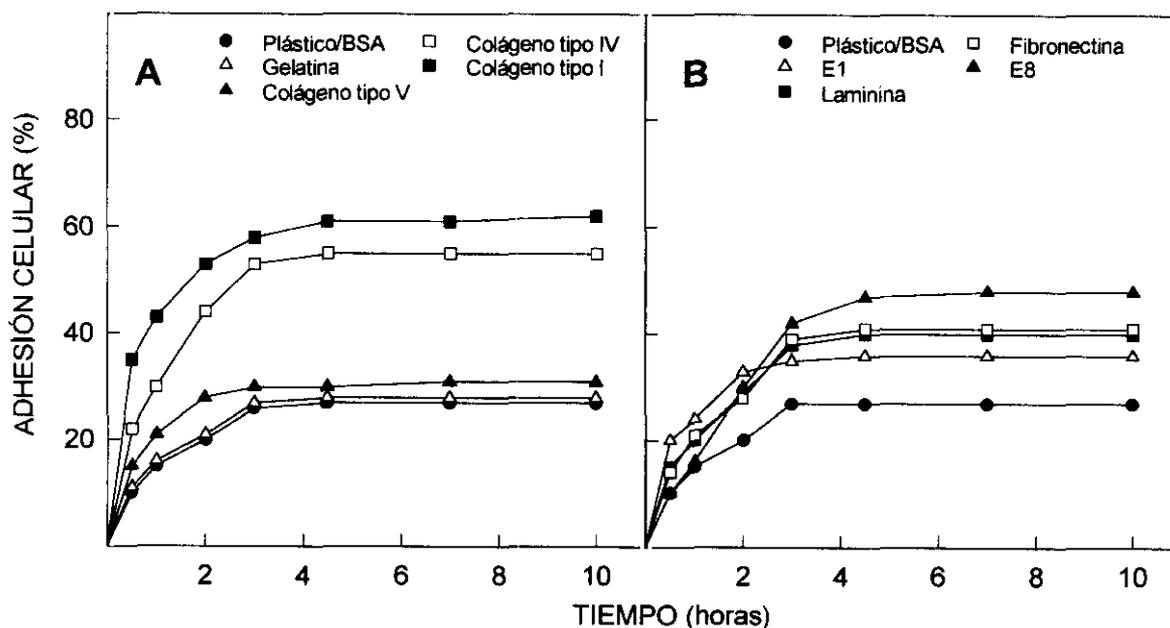


Figura 14.- Cinéticas de adhesión de las células BCS-TC2 sobre componentes de la ECM.

Los experimentos de adhesión se llevan a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Se ensaya la adhesión a diferentes tiempos sobre superficies saturadas con $10\mu\text{g/mL}$ de diferentes tipos de colágeno (A) o fibronectina, laminina y sus fragmentos (B). Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto del número total de células sembradas, realizándose, al menos, tres experimentos independientes con determinaciones para cada punto por cuadruplicado. El error es inferior al 10%.

Las cinéticas de adhesión de las células sobre las glicoproteínas laminina y fibronectina son prácticamente coincidentes, siendo más lentas que las obtenidas sobre colágenos (Figura 14). Después de 3 horas, el 35% de las células se han adherido a laminina y fibronectina, mientras que el 50 y 55% lo han hecho sobre colágeno tipo IV y

tipo I, respectivamente. Además se requiere una mayor concentración de laminina o fibronectina, para observar los mismos niveles de adhesión celular (Figura 13). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, no se puede descartar que el efecto de ambos tipos de colágeno pudiera ser debido a que éstos se adhieran con mayor eficacia que laminina y fibronectina a la superficie de plástico.

Los resultados obtenidos de la adhesión de las células BCS-TC2 sobre la matriz sintetizada por fibroblastos y el gel de colágeno tipo I (Figura 12) están de acuerdo con las propiedades adhesivas observadas en estas células, sobre colágeno de tipo I y fibronectina de la matriz intersticial. Sin embargo, las células epiteliales normalmente interaccionan con las proteínas de los basamentos membranosos, como laminina y colágeno de tipo IV, pero no con fibronectina y colágeno de tipo I (Terranova *et al.*, 1986). No obstante, la especificidad de las células de origen epitelial o mesenquimal para unirse a laminina o fibronectina, respectivamente, no es absoluta. Así, los hepatocitos, los fibroblastos, los mioblastos y algunas células tumorales presentan capacidad para adherirse a ambas glicoproteínas (Couchman *et al.*, 1983). Esta adhesión anormal podría estar relacionada con los procesos de migración e invasión de las células epiteliales transformadas a través del tejido conectivo intersticial (Liotta *et al.*, 1991). En este sentido algunos autores han sugerido que el fenotipo anormal de células LoVo (adenocarcinoma de colon), capaces de adherirse a colágeno tipo IV, laminina y fibronectina, puede ser debido a la dediferenciación celular inducida por la transformación maligna (Aznavoorian *et al.*, 1990). Por otro lado se han descrito células de adenocarcinoma de colon, SW620 y Caco-2, que se adhieren a colágeno de tipo I (Turowski *et al.*, 1994). Además, algunas líneas celulares tumorales pierden su capacidad de adhesión a fibronectina después de la transformación maligna. Por ejemplo, las células HT-29, de carcinoma de colon, no se unen a fibronectina, pero sí lo hacen a laminina y colágeno (Varner *et al.*, 1995). Un comportamiento similar lo presentan las células ClonA, también procedentes de un adenocarcinoma de colon, que se adhieren a laminina y colágeno I, pero muy poco a fibronectina (Lotz *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992). Por tanto, el comportamiento observado, reconocimiento de constituyentes tanto de basamentos membranosos como de matriz intersticial, es probablemente una característica específica para cada tipo de célula y puede ser importante durante la progresión tumoral y la metástasis.

El proceso de adhesión tiene lugar a través de receptores de la superficie celular que reconocen a las proteínas de la ECM. La laminina presenta varias regiones activas implicadas en los mecanismos de adhesión celular. El tratamiento proteolítico de la laminina con elastasa permite obtener dos fragmentos de la proteína, E1-4 y E8, conteniendo cada uno de éstos regiones activas (Figura 3). El efecto de estos fragmentos sobre la adhesión celular indica que ambos favorecen la adhesión de las células BCS-TC2, prácticamente del

mismo modo que lo hace la laminina intacta (Figura 14B). Se ha descrito que una glicoproteína de 67-70 kDa (Castronovo, 1993; Sobel, 1993) y otros receptores de la familia de las integrinas reconocen el fragmento E1-4 (Kramer *et al.*, 1993; Pfaff *et al.*, 1994; Underwood *et al.*, 1995). Además, distintas secuencias del fragmento E8 son reconocidas por diferentes receptores de tipo integrina (Aumailley *et al.*, 1987; Hynes, 1992; Kramer *et al.*, 1993). Por lo tanto, los resultados obtenidos plantean la posibilidad de que las células BCS-TC2 expresen receptores de tipo integrina así como la glicoproteína de 67 kDa. Este hecho resulta de gran interés puesto que sólo algunas líneas celulares presentan capacidad para reconocer ambos fragmentos de la molécula de laminina. Así por ejemplo, las células ClonA se adhieren al fragmento E8, mientras que las células OVCAR, de carcinoma de ovario humano, se adhieren a los fragmentos P1 y E8 (Lee *et al.*, 1992).

Efecto de péptidos

Teniendo en cuenta que los receptores celulares interactúan con proteínas de la matriz extracelular a través de secuencias específicas, se procedió a determinar las secuencias de reconocimiento implicadas en la adhesión de las células BCS-TC2 a estas glicoproteínas de la matriz. Para este estudio se utilizan péptidos sintéticos que mimetizan los dominios de unión a receptores.

Se estudió el efecto, sobre la adhesión celular, de péptidos que contienen las secuencias -YIGSR- e -IKVAV-, ambas presentes en la molécula de laminina. El péptido YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), secuencia localizada en el brazo corto de la cadena β de la proteína, promueve la adhesión y la migración celular (Graf *et al.*, 1987a,b; Yamamura *et al.*, 1993). El péptido IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val), secuencia localizada en la cadena α al final del brazo largo de la laminina, también promueve la adhesión celular (Tashiro *et al.*, 1989; Yamamura *et al.*, 1993). Además, se ha estudiado el efecto de péptidos que contienen la secuencia -RGD- (Arg-Gly-Asp), secuencia mínima de reconocimiento presente en muchas proteínas de la matriz, que es reconocida por distintos tipos de integrinas (Ruoslahti, 1996).

La secuencia -YIGSR-, parece no ser activa en la laminina intacta, sino que es un sitio oculto que se puede activar por proteólisis durante la remodelación tisular y la invasión de las células tumorales. Ninguno de los péptidos estudiados que contienen esta secuencia ejercen un efecto significativo sobre la adhesión de las células BCS-TC2 (Figura 15A), lo que permitiría concluir que el péptido YIGSR no favorece la adhesión de las células BCS-TC2. Sin embargo, se ha descrito que la secuencia reconocida por el receptor de 67 kDa de alta afinidad para la laminina es -YIGSR- (Graf *et al.*, 1987a,b). Considerando que se

ha puesto de manifiesto la presencia de este receptor en las células BCS-TC2 (López-Conejo *et al.*, 1996) no es posible descartar, por tanto, la participación de esta secuencia peptídica en el reconocimiento célula-laminina.

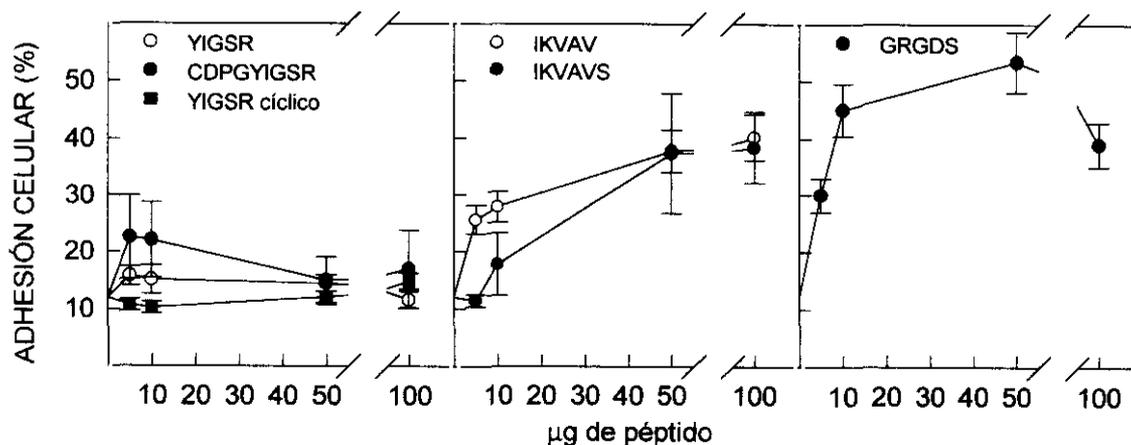


Figura 15.- Adhesión de células BCS-TC2 a distintos péptidos sintéticos.

Las células se siembran en pocillos saturados con diferentes concentraciones de los péptidos indicados. Transcurridos 30 minutos se evalúa la adhesión celular, como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas, respecto del número total de células sembradas, y proceden de, al menos, tres experimentos realizados con determinaciones para cada dato por cuadruplicado. La adhesión celular sobre BSA es del 12%.

Algunos trabajos indican que la secuencia -YIGSR- puede ser de reconocimiento conformacional, lo que justificaría la incapacidad que este péptido presenta para mediar en la adhesión de ciertos tipos de células, a menos que se incremente su tamaño, se utilice en su forma polimerizada o cíclica, o se ancle a ovoalbúmina o polietilenglicol (Sweeney *et al.*, 1991). Sin embargo, como se recoge en la figura 15, ni al incrementar el tamaño del péptido lineal, ni con el péptido cíclico se produce un mayor efecto sobre la adhesión de las células BCS-TC2. Por tanto, estas células parecen no reconocer esta secuencia, al menos en la conformación que adoptan los péptidos estudiados. Este hecho indicaría que, puesto que las células presentan capacidad para unirse al fragmento E1-4 de la laminina, lo harían en una secuencia diferente. En el fragmento E1-4 se encuentran también otras secuencias activas de la laminina como las secuencias -RGD- (Aumailley *et al.*, 1990b; Tashiro *et al.*, 1991), o -YGYGDALR- (Underwood *et al.*, 1995). Por tanto, la adhesión que presentan las células al fragmento E1-4 podría ser un reflejo de su capacidad de reconocimiento de alguna de estas secuencias.

Como se observa en la figura 15B, los péptidos IKVAV e IKVAVS favorecen la adhesión de las células BCS-TC2, siendo este efecto dependiente de la cantidad de péptido utilizada como sustrato. El mismo comportamiento se ha observado en células de melanoma (Yamamura *et al.*, 1993). Este resultado sugiere que las células BCS-TC2 se podrían unir a la laminina, en concreto al fragmento E8, a través de esta secuencia.

El péptido GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) favorece la adhesión de las células BCS-TC2 (Figura 15C). El efecto es dependiente de la concentración de péptido utilizada, consiguiéndose para 50µg de péptido la máxima adhesión celular, superior al 50%, respecto del 12% de adhesión obtenida sobre BSA (Figura 15C). A la mayor concentración estudiada (100µg de péptido) se observa una disminución de la adhesión que puede ser debida a la parcial solubilización del péptido adherido al plástico, produciéndose una competencia en la adhesión celular entre el péptido adherido y libre. La secuencia -RGD- es clave en la interacción célula-fibronectina (Akiyama *et al.*, 1995b), y puede ser sitio de reconocimiento del colágeno de tipo I (Dedhar *et al.*, 1987). También en la cadena α de la laminina se ha localizado dicha secuencia, y ésta es activa en la adhesión y migración celular (Tashiro *et al.*, 1991). No obstante, la secuencia -RGD-, tanto en laminina como en colágeno, puede estar oculta en la estructura nativa o en una conformación inadecuada, y ser funcional sólo tras la degradación de la matriz (Sonnabend *et al.*, 1990a; Davis, 1992). Los resultados sugieren que las células BCS-TC2 deben expresar receptores de tipo integrina capaces de reconocer a la secuencia -RGD- mediando, por tanto, en la interacción de las células BCS-TC2 con la matriz.

Inhibición de la adhesión celular por péptidos

Dado que las células BCS-TC2 son capaces de adherirse a péptidos que contienen las secuencias -RGD- e -IKVAV- (Figura 15), se procedió a estudiar la implicación de las mismas en el reconocimiento de componentes de la matriz extracelular. Para ello, se realizaron ensayos de inhibición de la adhesión a componentes de la ECM utilizando diferentes péptidos sintéticos.

Como ya se ha comentado, el tripéptido RGD representa la secuencia mínima de reconocimiento de diferentes proteínas adhesivas, como fibronectina y vitronectina, y podría ser responsable del reconocimiento del colágeno de tipo I y de la laminina en ciertos casos (como en procesos de remodelación o de degradación de la matriz). Para comprobar la implicación de esta secuencia en la unión de las células BCS-TC2 a la ECM, se realizaron ensayos de inhibición de la adhesión a los diferentes sustratos incubando previamente las células con los péptidos GRGDSP y GRGESP (como péptido control). Los resultados de estos experimentos se recogen en la figura 16.

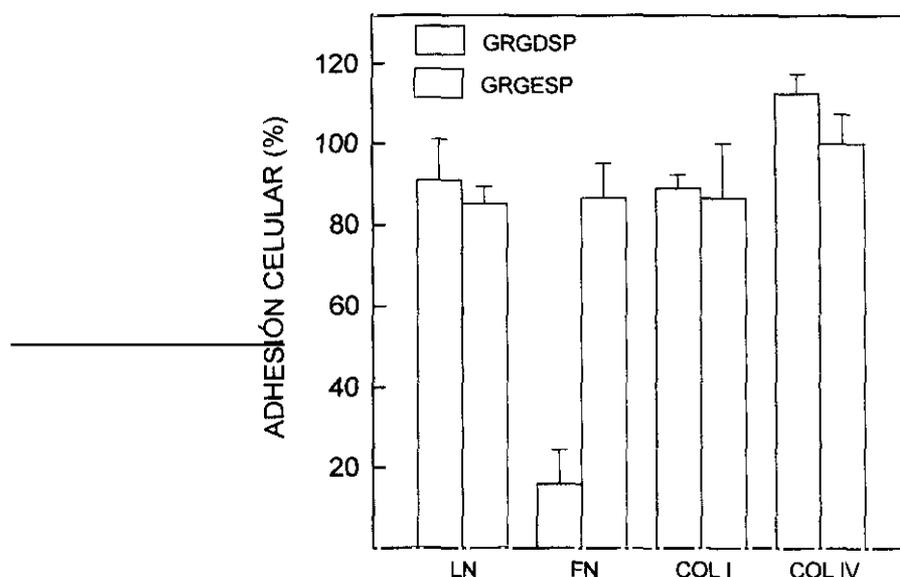


Figura 16.- Inhibición de la adhesión celular a componentes de la ECM por el péptido GRGDSP y GRGESP.

Las células se preincubaban durante 45 minutos a 37°C con 0,5 mg/mL de péptido y se dejan adherir durante 30 minutos sobre superficies saturadas con LN, FN, Col I y Col IV (10 µg/mL). Las células adheridas se valoran como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas, considerando como 100% la adhesión a cada sustrato en ausencia de péptido. En todos los casos se realizan cuatro experimentos con determinaciones por cuadruplicado.

La adhesión de las células BCS-TC2 a colágeno tipo I y tipo IV no se bloquea por el péptido GRGDSP (Figura 16). Estos resultados sugieren que la interacción de las células con estas proteínas tiene lugar a través de otras secuencias de reconocimiento diferentes de -RGD-. En este sentido, aunque algunos autores afirman que las células se unen a colágeno tipo I a través de la secuencia -RGD- (Dedhar *et al.*, 1987), también otras secuencias presentes en las moléculas de colágeno podrían participar en la unión a distintas integrinas, entre ellas las secuencias -FYFDLR- o -DGEA- (Staa *et al.*, 1991; Underwood *et al.*, 1995). La secuencia -RGD- parece que no está expuesta en la superficie de la triple hélice del colágeno de tipo I y probablemente no sea accesible a los receptores. Además hay que considerar que, en diferentes tipos de células, la adhesión a colágeno mediada por la integrina $\alpha_2\beta_1$ no se inhibe por péptidos lineales que contienen la secuencia -RGD-. Sin embargo, se ha descrito que péptidos cíclicos con la secuencia -RGD- pueden inhibir la unión de la integrina $\alpha_2\beta_1$ a este colágeno (Cardarelli *et al.*, 1992). Por lo tanto no es posible descartar que la utilización de un péptido cíclico inhibiera la adhesión celular sobre colágeno de tipo I.

Como se puede apreciar, la adhesión a fibronectina se reduce en más de un 80% por el péptido GRGDSP, mientras que el péptido control GRGESP no produce ningún efecto (Figura 16). Por tanto, se estudió el efecto de diferentes concentraciones del péptido sobre la adhesión a fibronectina (Figura 17). La adhesión se inhibe un 40% a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptido GRGDSP y en casi un 90% cuando la concentración se eleva a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 17). El péptido control GRGESP no produce un efecto significativo sobre la adhesión a este sustrato.

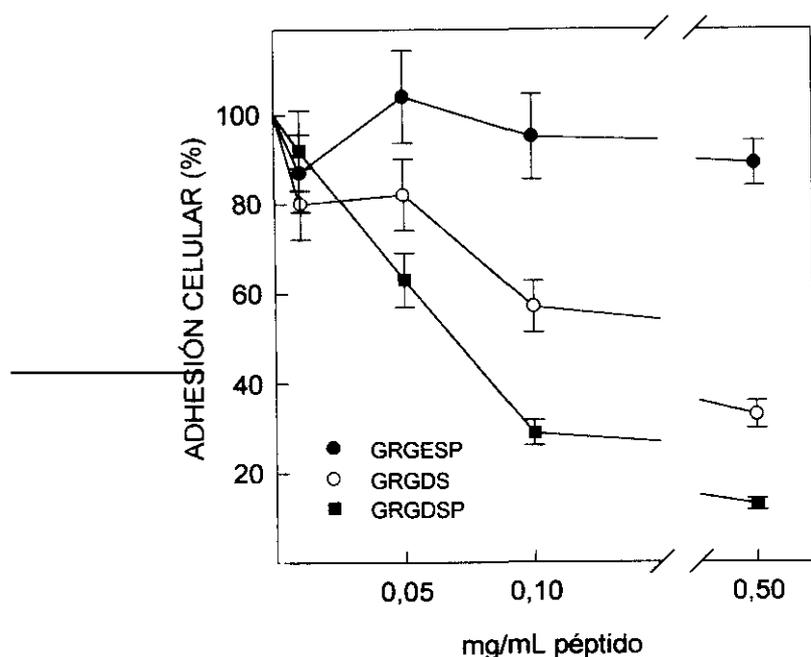


Figura 17.- Inhibición de la adhesión celular a fibronectina por péptidos RGD.

Las células se preincubaron durante 45 minutos a 37°C con las cantidades indicadas de los péptidos y se dejan adherir durante 30 minutos a superficies saturadas con fibronectina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células adheridas se valoran como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas considerando como 100% la adhesión a fibronectina en ausencia de péptido.

En células SW-480, de adenocarcinoma de colon humano, la adhesión a fibronectina, mediada por $\alpha_{11b}\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$, también se inhibe por el péptido RGDS, aunque se requiere una concentración menor de péptido para conseguir el mismo porcentaje de inhibición (Chiang *et al.*, 1994). Por tanto, las células BCS-TC2 interaccionan con fibronectina a través de la secuencia -RGD-. Este resultado sugiere que, probablemente, la integrina $\alpha_5\beta_1$ pueda ser uno de los receptores de fibronectina en estas células, ya que dicha integrina interacciona con la fibronectina a través del dominio de unión a células RGD/PHSRN (Akiyama *et al.*, 1995b).

Los estudios de inhibición también parecen indicar que la interacción célula-laminina es independiente de RGD (Figura 16), como también ocurre en otras líneas celulares

(Gehlsen *et al.*, 1989; Hynes, 1992). En otros casos, sin embargo, se ha demostrado que el péptido GRGDS es un potente inhibidor de la adhesión celular al fragmento P1 de la laminina, pero no bloquea la adhesión al fragmento E8 (Aumailley *et al.*, 1990a,b), implicándose a la integrina $\alpha_6\beta_1$ en la unión al sitio RGD en el brazo corto de la cadena α_1 de la laminina (Tashiro *et al.*, 1991). Esto sugiere que los receptores expresados por las células BCS-TC2 implicados en la adhesión a laminina no interaccionan con el sitio RGD de la proteína.

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó el efecto de diferentes péptidos adhesivos, contenidos en la molécula de laminina, sobre la adhesión a esta proteína (Figura 18). El péptido CIKVAVS inhibe la adhesión a laminina, incluso a concentraciones muy bajas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), consiguiéndose una inhibición casi total para 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptido. Sin embargo, utilizando diferentes péptidos que contienen la secuencia -YIGSR- sólo se consigue una inhibición de aproximadamente el 30% en el caso del péptido de mayor tamaño o del cíclico. Distintos estudios indican que este péptido no bloquea la adhesión a ninguno de los fragmentos de laminina (Aumailley *et al.*, 1990a), al contrario que otros autores que encuentran inhibición (Graf *et al.*, 1987b; Yudoh *et al.*, 1996). Por tanto, la adhesión células BCS-TC2-laminina, parece tener lugar principalmente por reconocimiento del sitio CIKVAVS presente en el brazo largo de la cadena α_1 de la molécula de laminina.

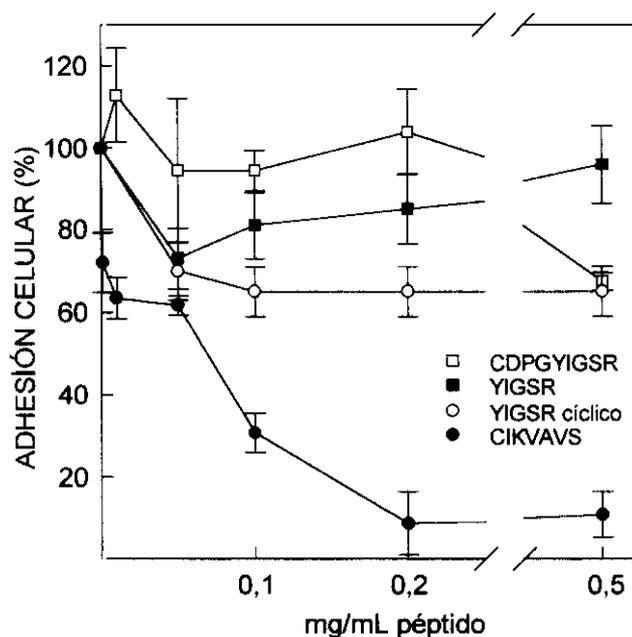


Figura 18.- Inhibición de la adhesión celular a laminina por péptidos.

Las células se preincubaban durante 45 minutos a 37°C con las cantidades indicadas de los péptidos. A continuación se dejan adherir a laminina durante 30 minutos y las células adheridas se valoran como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas, considerando como 100% la adhesión a laminina en ausencia de péptido.

3.1.2. EFECTO SOBRE LA EXTENSIÓN CELULAR

Comprobado el efecto de la ECM sobre la adhesión celular, se procedió a estudiar el efecto de matrices y proteínas de la matriz sobre la extensión de las células BCS-TC2. De las células adheridas, solamente un 5-10% empiezan a extenderse sobre plástico siete horas después de la siembra (Figura 19A). En la figura 19B y C se puede observar, comparándolas con el control sobre plástico, que tanto el número de células adheridas como el grado de extensión celular se incrementa cuando las células BCS-TC2 se siembran sobre matrices preformadas.

Como se observa en la figura 19, sobre los componentes individuales de la matriz estudiados se produce extensión celular. Sobre los colágenos se observan células poligonales y bipolares (Figura 19D y E), mientras que sobre fibronectina las células adquieren una morfología bipolar (Figura 19F). Sobre laminina también se observan células con diferente morfología. Aproximadamente un 20% de las células adheridas están bien extendidas presentando una morfología bipolar y poligonal, mientras que el resto forma agregados (Figura 19) que pueden ser el resultado de interacciones célula-célula mediadas por la laminina.

En las células de adenocarcinoma de mama MCF-7 también se ha descrito un efecto contrario de laminina y fibronectina ya que inducen agrupamiento celular y extensión, respectivamente (Noël *et al.*, 1988). Este comportamiento podría ser un reflejo de la heterogeneidad celular observada en tumores primarios, con la presencia de subpoblaciones celulares que responden de forma distinta a factores de la matriz (Aznavorian *et al.*, 1990). Al analizar la cinética de extensión se observa que las células se extienden más rápidamente sobre laminina y fibronectina que sobre los colágenos estudiados.

Además, se analizó el efecto de los fragmentos E1-4 y E8 de la laminina sobre la extensión celular. El fragmento E1-4 induce principalmente interacciones célula-célula, observándose grandes agregados en la monocapa con apariencia poligonal redondeada (Figura 19H). Este comportamiento se debe probablemente a que el fragmento E1-4, constituido por los tres brazos cortos de la laminina, contiene diferentes dominios reconocidos por distintos receptores celulares, que podrían ser los responsables de la agregación celular. Sin embargo, el fragmento E8 induce la extensión más que la agregación celular (Figura 19I).

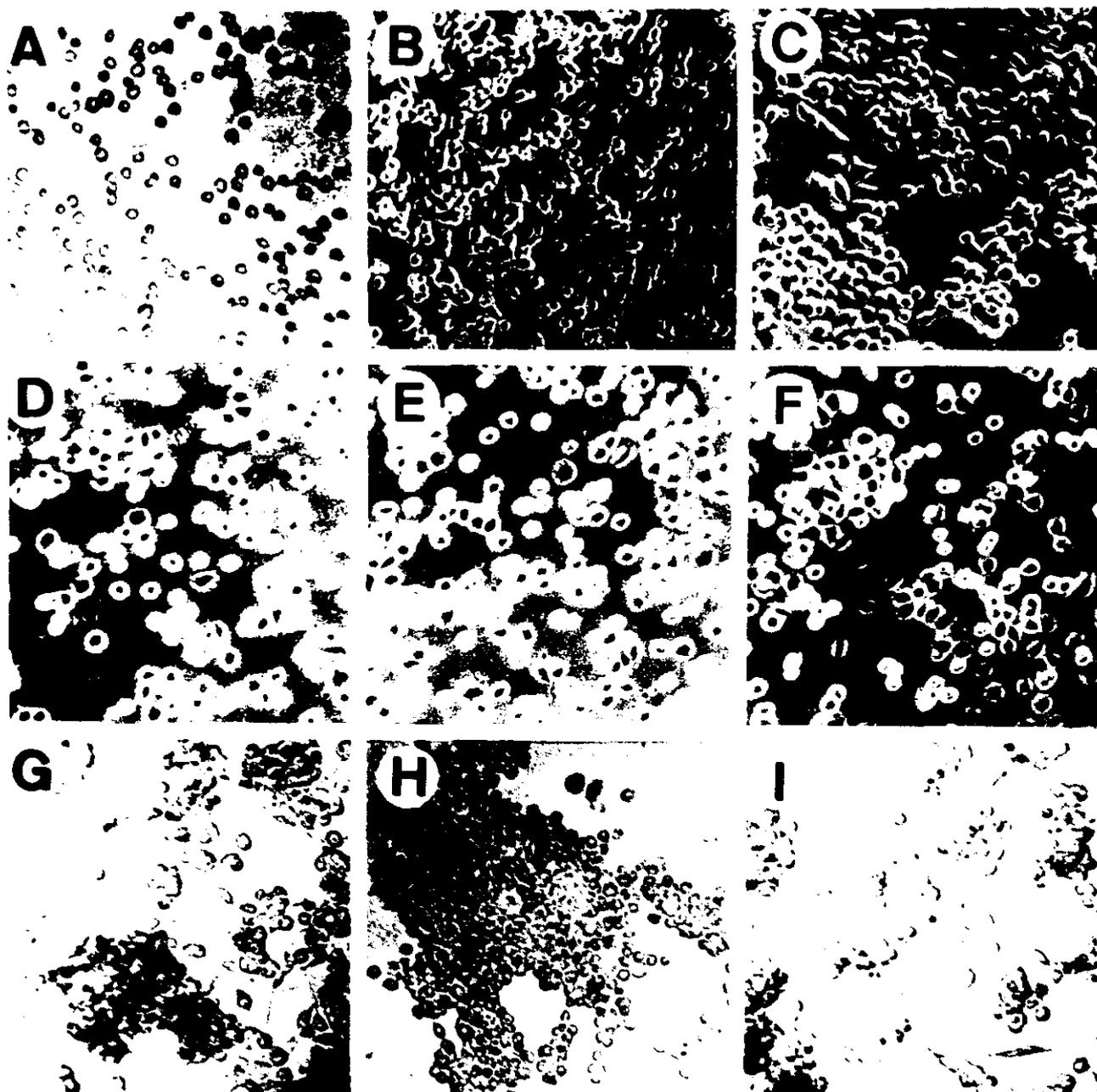


Figura 19.- Extensión de células BCS-TC2 sobre matrices extracelulares y proteínas de la matriz.

La extensión celular se visualiza por microscopía de contraste de fase tras 7 horas de adhesión sobre plástico (A), matriz preformada por las propias células (B), o por fibroblastos (C), colágeno tipo I (D), colágeno de tipo IV (E), fibronectina (F), laminina (G), y los fragmentos de laminina E1-4 (H) y E8 (I). (x10).

3.1.3. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El estudio del efecto de los componentes de la ECM sobre la proliferación de las células BCS-TC2 se ha abordado bajo dos perspectivas diferentes: a) determinación de los parámetros cinéticos a partir de las correspondientes curvas de proliferación obtenidas tras la siembra de las células sobre las distintas proteínas de la matriz y, b) evaluación del posible efecto mitogénico inducido por los componentes de la matriz tras su adición al medio de cultivo como factor soluble.

Los resultados relativos a la determinación de los parámetros característicos de las curvas de proliferación se recogen en la tabla VII, y muestran que no todos los sustratos que promueven la adhesión y la extensión incrementan la proliferación celular. La fase de latencia se acorta y se observa una disminución en el tiempo de duplicación medio cuando las células crecen tanto sobre las matrices creadas por ellas mismas como por las preformadas por fibroblastos, respecto al resto de sustratos. La reducción del tiempo de latencia se podría relacionar con el incremento de la adhesión y extensión celular observado sobre estas matrices. La disminución en el tiempo de duplicación medio se podría deber a la presencia en las matrices de factores de crecimiento.

Tabla VII. Parámetros de proliferación de las células BCS-TC2 creciendo sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Fase latencia (Días)	Tiempo duplicación medio (Horas)	Densidad de saturación celular (Células/cm ²)x10 ⁻⁵
Plástico/BSA	2	39	6,0
f-ECM	1	28	7,2
tc-ECM	1	27	7,4
Gel colágeno I	2	38	7,3
Extracto placenta	2	37	6,9
Colágenos ^a	2	38	6,1
Laminina	2	32	7,2
Fibronectina	1	29	7,4

Los parámetros cinéticos se obtienen de la fase logarítmica y estacionaria de las curvas de proliferación como se indica en Materiales y Métodos. ^aNo se observan diferencias significativas entre colágenos de tipo I, IV, V y gelatina. Los datos proceden de tres experimentos independientes con determinaciones por triplicado para cada dato. El error experimental es inferior al 7% en todos los casos.

Sin embargo, los geles de colágeno y los extractos de placenta no influyen en los parámetros de proliferación de las células BCS-TC2, a pesar de que estos sustratos incrementan la adhesión. Un resultado similar se ha descrito para las células HT-29

creciendo en geles de colágeno de tipo I (East *et al.*, 1992). Este comportamiento podría deberse a la falta de rigidez mecánica de los geles, necesaria para soportar la extensión celular. Sin embargo, cuando las células se siembran sobre una película de colágeno tampoco se observa ninguna variación en los parámetros de proliferación respecto de los obtenidos sobre plástico.

En las células sembradas sobre fibronectina se produce una disminución en la fase de latencia, probablemente debida a la capacidad de esta proteína para inducir la extensión de las células BCS-TC2 de una manera más rápida que los otros sustratos. Además tanto la fibronectina como la laminina originan una disminución en el tiempo de duplicación medio. La interacción célula-laminina y célula-fibronectina, mediada por integrinas, origina señales al interior celular que contribuyen al control de la expresión génica, la regulación de la diferenciación y el crecimiento celular (Lafrenie y Yamada, 1996). Además, se ha descrito que la fibronectina estimula la proliferación celular (Akiyama *et al.*, 1995a,b) y que la unión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ a la fibronectina promueve a la proliferación de las células transformadas (Varner *et al.*, 1995).

Dado que la interacción de las células con componentes de la matriz a través de receptores de tipo integrina origina la activación de rutas mitógenicas en el interior celular (Yamada y Miyamoto, 1995), en un segundo tipo de estudio se ha analizado si los componentes de la ECM ejercen efectos mitogénicos sobre las células BCS-TC2. La incorporación de metil- ^3H -timidina al DNA, medida de la síntesis de DNA, se utiliza para evaluar el crecimiento celular y la respuesta mitogénica a diferentes factores. Por ello, se valoró la incorporación de metil- ^3H -timidina en presencia de las proteínas de la matriz en forma soluble, una vez que las células están totalmente adheridas y extendidas a la superficie de cultivo. Los resultados obtenidos indican que laminina, fibronectina y colágenos de tipo I y IV incrementan la capacidad mitogénica de las células. Como se observa en la figura 20, la incorporación de metil- ^3H -timidina se activa por laminina y fibronectina respecto del control. En células de melanoma humano la fibronectina, o fragmentos de ésta conteniendo la secuencia -RGD-, estimulan la síntesis de DNA pero sólo en líneas celulares que expresan la integrina $\alpha_5\beta_1$. Los dos tipos de colágeno estudiados producen un mayor efecto mitogénico sobre las células BCS-TC2 que el ejercido por laminina y fibronectina, siendo similar al producido por suero fetal bovino (FCS) al 5%. La fibronectina soluble interacciona con su receptor, la integrina $\alpha_5\beta_1$, pero requiere altas concentraciones, no fisiológicas (5-10 mg/mL) (Yamada y Kennedy, 1984). Por tanto, es probable que la concentración fisiológica utilizada en el ensayo (20 $\mu\text{g/mL}$), no sea lo suficientemente alta como para observar un efecto mitogénico muy acusado. Un hecho similar puede tener lugar en el caso de la laminina. La mayor incorporación de metil- ^3H -timidina tiene lugar cuando las células se cultivan con FCS al 10%, efecto que se debe a

que se aportan factores necesarios para inducir la síntesis de DNA, como por ejemplo, factores de crecimiento.

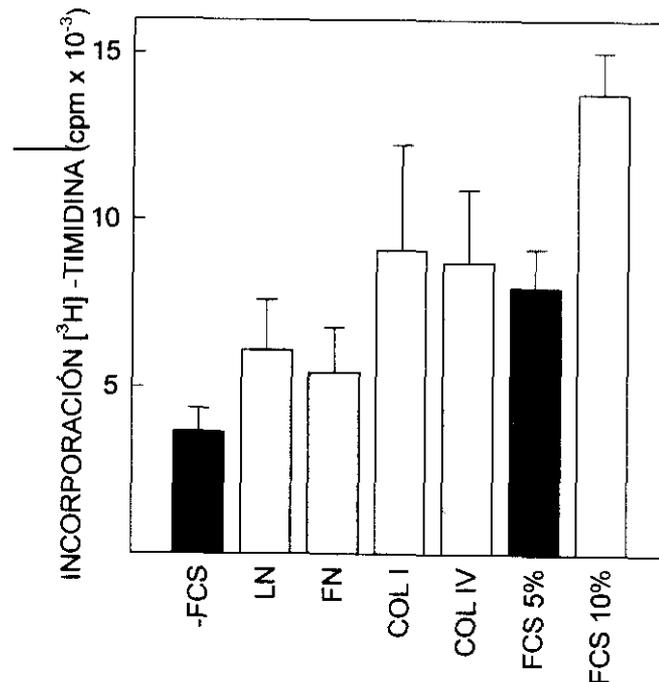


Figura 20.- Efecto mitogénico de proteínas de la matriz extracelular sobre las células BCS-TC2.

Las células se siembran y cultivan durante 24 horas en DMEM que contiene FCS al 5%. Transcurrido este tiempo, se cambia el medio de cultivo y se mantienen durante 24 horas con DMEM suplementado con FCS al 0,5%. Posteriormente las células se incuban en medio, libre de suero fetal bovino, suplementado con el correspondiente factor a una concentración de 20µg/mL o con diferentes concentraciones de FCS, en presencia de metil-³H-timidina. Transcurridas 24 horas, se determina la incorporación de metil-³H-timidina por las células, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son la media de tres experimentos en los que se realizan determinaciones por cuadruplicado.

3.2. RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CÉLULAS BCS-TC2-MATRIZ EXTRACELULAR

3.2.1. EXPRESIÓN DE INTEGRINAS

Los principales receptores celulares que reconocen a ligandos de la matriz extracelular son los de tipo integrina. Por tanto, inicialmente se realizaron estudios de citometría de flujo para determinar si estos receptores se expresan en las células BCS-TC2.

Utilizando anticuerpos específicos frente a diversas cadenas de integrinas, se ha comprobado que las células BCS-TC2 expresan las subunidades de integrinas α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , β_1 y β_4 . La subunidad α_4 no se expresa en esta línea celular (Figura 21).

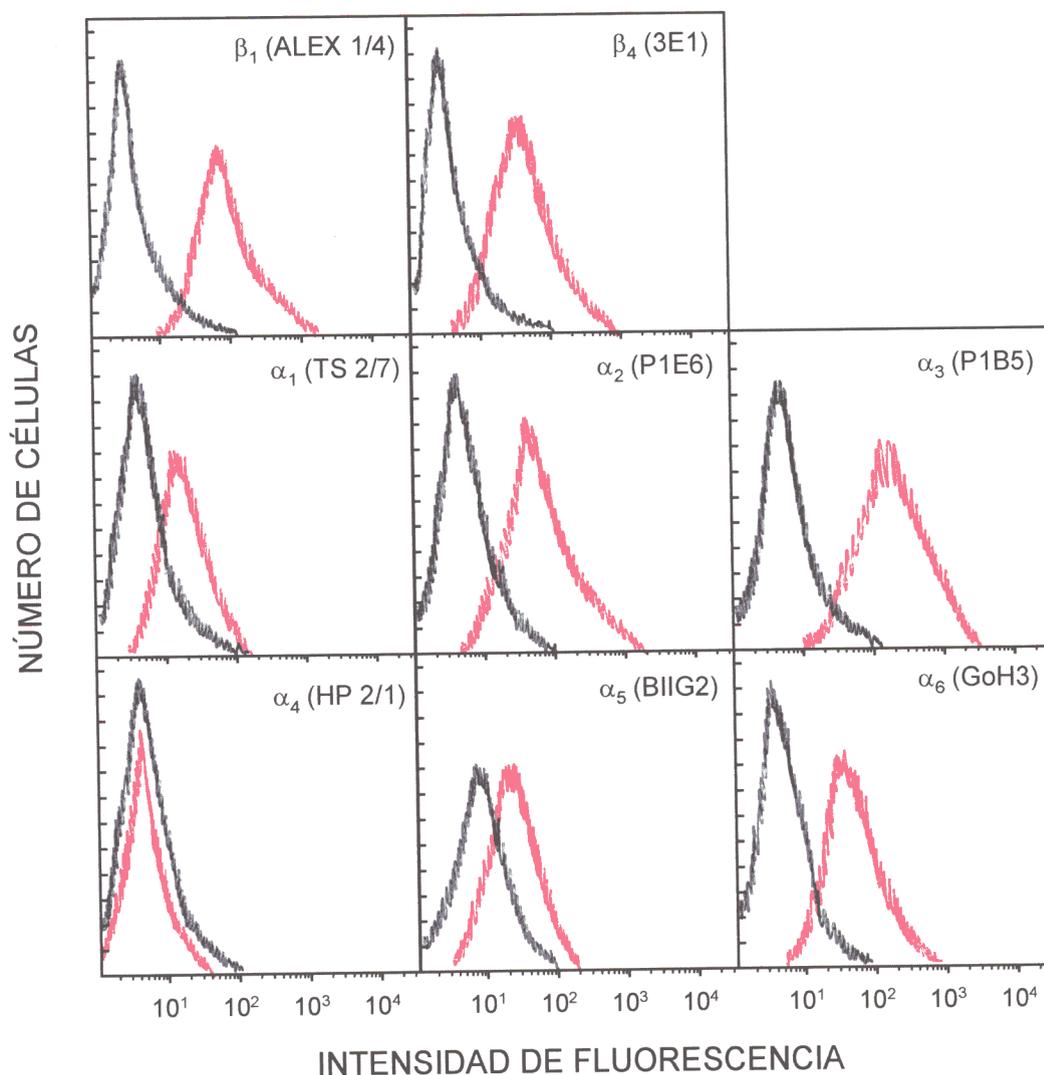


Figura 21.- Expresión de diferentes subunidades de integrinas determinada por citometría de flujo.

Las células, mantenidas en condiciones estandar de cultivo se tripsinizan y se procesan para citometría de flujo como se detalla en Materiales y Métodos. Como primer anticuerpo se utilizan anti- α_1 (TS2/7), anti- α_2 (P1E6), anti- α_3 (P1B5), anti- α_5 (BIIG2) y anti- β_1 (ALEX1/4) (dilución 1:100), anti- α_4 (HP2/1) y anti- α_6 (GoH3) (dilución 1:50) y anti- β_4 (3E1) (dilución 1:1000). Como segundo anticuerpo se emplea anti-IgG de rata o de ratón marcado con FITC a una dilución 1:100. En la figura se representa la intensidad de fluorescencia obtenida para el control (en negro), o para las células tratadas con los diferentes anticuerpos (en rojo).

Teniendo en cuenta que en estos experimentos de citometría de flujo se han empleado concentraciones saturantes de anticuerpos, se observa que el 100% de las células expresan las subunidades de las integrinas β_1 , α_2 , α_3 y α_6 , así como que los niveles de expresión de α_1 y α_5 son considerablemente inferiores. Además, en estas células también se ha detectado la subunidad β_4 , aunque los niveles de expresión son inferiores a los de la subunidad β_1 . Estas subunidades de integrinas también se expresan en otras líneas celulares

de carcinoma de colon (HT-29, SW480, SW620 y COLO 205), con la excepción de las células HT-29 y SW620 que no expresan las cadenas α_5 y α_1 , respectivamente. Los carcinomas *in situ* no expresan la subunidad α_5 , lo que puede estar indicando que esta subunidad sólo se expresa en células de carcinoma de colon cuando éstas se ven expuestas a fibronectina. Sin embargo, como ya se ha mencionado, las células HT-29 *in vitro* no expresan dicha subunidad. La expresión de integrinas que reconocen a laminina y colágeno se observa en las células de carcinomas colorrectales, tanto *in vivo* como en líneas celulares en cultivo. En ninguna de estas células se ha detectado la subunidad α_4 (Koretz *et al.*, 1994).

Una vez conocidas las subunidades de integrinas expresadas por las células, se procedió a determinar de qué manera estas subunidades se asocian para constituir los heterodímeros $\alpha\beta$. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de extractos celulares marcados con ^3H -glucosamina o con biotina.

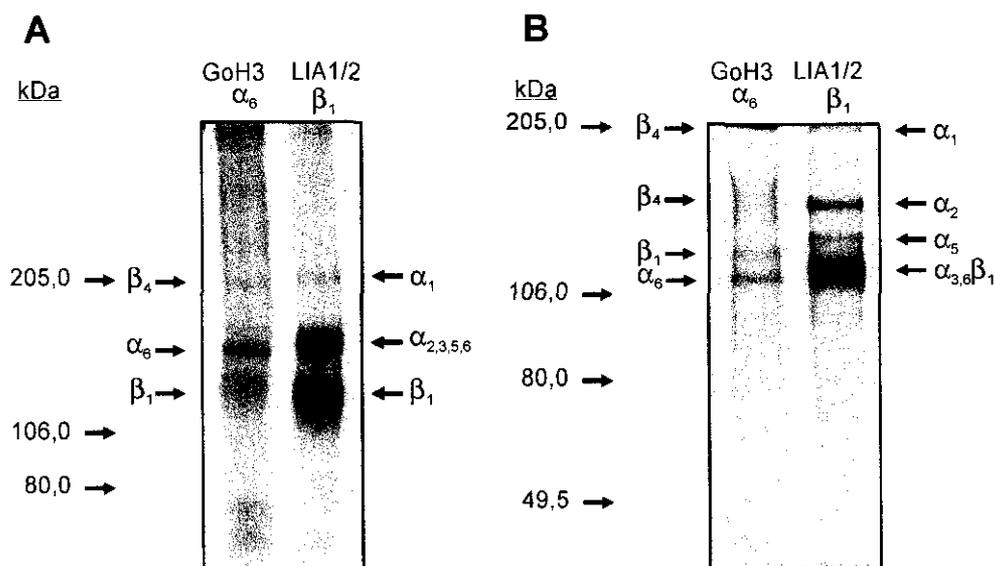


Figura 22.- Inmunoprecipitación de las integrinas expresadas en las células BCS-TC2.

Las células se marcan con ^3H -glucosamina y los extractos celulares obtenidos se inmunoprecipitan con anti- α_6 (GoH3) y anti- β_1 (LIA1/2) como se indica en Materiales y Métodos. Análisis por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras (A), y por PAGE-SDS al 7% en condiciones reductoras (B).

El análisis de los inmunoprecipitados, tras la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, muestra que el anticuerpo GoH3, que reconoce a la subunidad α_6 , inmunoprecipita tres proteínas de 200, 150 y 125 kDa (Figura 22A).

Considerando que la inmunoprecipitación se ha realizado con un anticuerpo frente a la subunidad α_6 así como las movilidades electroforéticas de las bandas de proteína obtenidas, éstas podrían corresponder a las subunidades β_4 , α_6 y β_1 , respectivamente (Hemler *et al.*, 1989; Sonnenberg *et al.*, 1990b; Nista *et al.*, 1996). Si se analiza el inmunoprecipitado en condiciones reductoras (Figura 22B) se aprecian dos bandas proteicas de 200 y 150 kDa que se podrían asignar a la subunidad β_4 y a un fragmento proteolítico de ésta. El dominio citoplasmático de β_4 es susceptible de degradación proteolítica, originándose fragmentos de dicha subunidad capaces de asociarse a la subunidad α_6 (Hemler *et al.*, 1989; Kajiji *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Giancotti *et al.*, 1992). Se observan además otras bandas de 130 y 120 kDa debidas a las subunidades β_1 y α_6 , respectivamente. Por tanto, los resultados sugieren que en las células BCS-TC2 la subunidad α_6 probablemente se asocia con ambas subunidades β formando los heterodímeros $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$. En la figura 22A se puede observar que la banda de proteína correspondiente a la subunidad β_4 presenta una intensidad más débil que la β_1 , lo que puede ser un reflejo de que las células expresan menor cantidad de $\alpha_6\beta_4$ que de $\alpha_6\beta_1$.

La integrina $\alpha_6\beta_1$ se expresa en una gran variedad de células, entre ellas células epiteliales y endoteliales, donde muestra una distribución polarizada en la superficie basolateral (Sonnenberg, 1990b; Hogervorst *et al.*, 1993; Terpe *et al.*, 1994). Las células de carcinoma de colon difieren en la expresión de las integrinas $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$. Por ejemplo, las células ClonA expresan la integrina $\alpha_6\beta_4$ y las células RKO expresan $\alpha_6\beta_1$ (Lee *et al.*, 1992), mientras que las células LoVo expresan ambas (Daèmi *et al.*, 1995). Se cree que la diferente expresión de los heterodímeros puede estar relacionada con la disponibilidad de la subunidad β_4 , de modo que cuando β_4 está en exceso se forma únicamente $\alpha_6\beta_4$, mientras que si β_4 está limitada se expresan tanto $\alpha_6\beta_4$ como $\alpha_6\beta_1$. Este comportamiento también se ha atribuido a diferencias estructurales, presencia de isoformas, en las subunidades β_4 y α_6 lo que origina diferentes patrones de asociación (Lee *et al.*, 1992).

Tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- β_1 (LIA1/2) y el análisis por PAGE-SDS en condiciones no reductoras, aparecen tres bandas de proteínas de masas moleculares 210, 150 y 120 kDa. Estas podrían corresponder a las subunidades de integrinas α_1 , $\alpha_{2,3,5}$ y/o α_6 , y β_1 , respectivamente (Figura 22A) (Giancotti *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1993; Nista *et al.*, 1996). Si la electroforesis se realiza en condiciones reductoras, se detecta una banda próxima a los 200 kDa, posiblemente debida a la subunidad α_1 . Además, se produce un desdoblamiento de la banda de proteína de 150 kDa detectada en condiciones no reductoras, en dos bandas diferentes, que por su masa molecular (150 y 130 kDa) podrían ser a las integrinas α_2 y α_5 respectivamente, y una banda muy ancha de mayor movilidad electroforética (125-130 kDa) que correspondería a

las subunidades α_3 , α_6 y β_1 (Figura 22B) (Staquet *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992; Bartolazzi *et al.*, 1993).

En la figura 22 se observa que α_1 aparece como una banda tenue, probablemente debida a bajos niveles de expresión. Sin embargo, se visualiza una banda muy intensa correspondiente a la subunidad β_1 (Figura 22A). En este caso, la intensidad de la banda se puede atribuir a un alto nivel de dicha subunidad (Figura 21). Además, hay que considerar que, en tejidos procedentes de cáncer colorrectal humano, el precursor pre- β_1 (sin glicosilar) podría asociarse con su correspondiente subunidad α . De esta manera, por inmunoprecipitación se podría detectar tanto la forma β_1 madura (N-glicosilación), como la forma precursora, de menor masa molecular (Fujita *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995). En la figura 22B, también aparece una banda ancha e intensa de 125-130 kDa, correspondiente a la subunidad β_1 aunque en este caso también contribuyen las subunidades α_3 y α_6 .

Estos resultados sugieren que, en las células BCS-TC2, la subunidad β_1 se asocia con α_1 , α_2 , α_3 , α_5 y α_6 . Para confirmar este aspecto, se realizaron inmunoprecipitaciones de extractos celulares con anticuerpos específicos frente a las subunidades α de las integrinas seguidos de análisis por PAGE-SDS en condiciones no reductoras. En la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- α_1 (TS2/7) se observan dos bandas de proteínas de 200 y 110-120 kDa correspondientes a la subunidades α_1 y β_1 (Figura 23A). La inmunoprecipitación de los lisados con anti- α_2 , anti- α_3 y anti- α_5 da lugar a un patrón idéntico que consiste en la subunidad común β_1 de masa molecular 110-120 kDa, asociada con las bandas específicas de 150-160 kDa correspondientes a α_2 , α_3 y α_5 , respectivamente (Figura 23B). De todos estos datos se puede concluir que los heterodímeros de integrinas presentes en la superficie de las células BCS-TC2 son $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$.

La integrina $\alpha_3\beta_1$ se ha descrito prácticamente en todas las líneas celulares que crecen en cultivo adheridas al sustrato (Hemler, 1990). Se ha postulado que su expresión se debe a una adaptación de las células a las condiciones de cultivo, ya que se expresan integrinas que reconocen a factores séricos. Esta molécula es capaz de actuar como receptor para fibronectina, vitronectina, laminina y colágenos, y también participa en procesos de adhesión célula-célula (Larjava *et al.*, 1990; Elices *et al.*, 1991). El heterodímero $\alpha_2\beta_1$ actúa habitualmente como receptor de colágenos (Santoro *et al.*, 1991; Cardarelli *et al.*, 1992), aunque algunas líneas celulares, entre ellas las células ClonA, utilizan $\alpha_2\beta_1$ como receptor de laminina (Lotz *et al.*, 1990). La integrina $\alpha_1\beta_1$ es receptor para colágeno y laminina (Hynes, 1992). La integrina $\alpha_5\beta_1$ es un receptor de fibronectina cuya expresión frecuentemente se reduce en células tumorales, habiéndose descrito una correlación entre esta baja expresión y la transformación maligna (Varner *et al.*, 1992; Witkowski *et al.*, 1993).

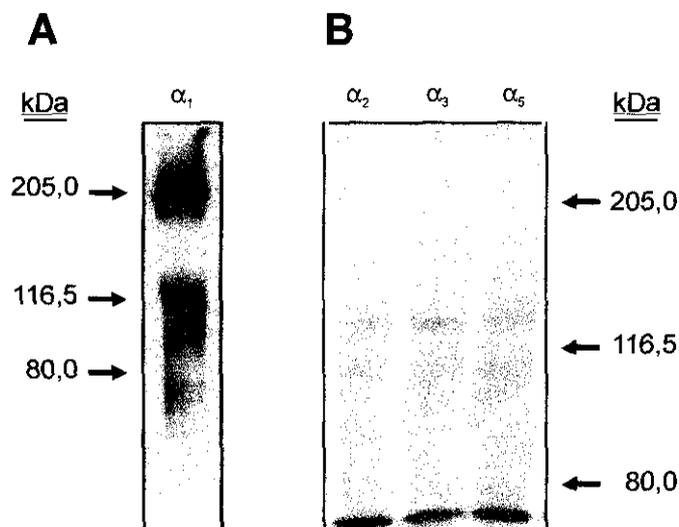


Figura 23.- Inmunoprecipitación de las integrinas expresadas en las células BCS-TC2.

Las células se marcan con biotina (A) o con ^3H -glucosamina (B) y los extractos se inmunoprecipitan con anti- α_1 (TS2/7), anti- α_2 (AB1936), anti- α_3 (AB1920) y anti- α_5 (Mab1986), como se indica en Materiales y Métodos, y se analizan mediante PAGE-SDS al 7% (A) o al 5% (B) en condiciones no reductoras.

La expresión de receptores de tipo integrina no siempre se correlaciona con su actividad funcional (Mercurio, 1995). Además, como se ha comentado previamente, las integrinas pueden reconocer como ligando a más de un componente de la matriz extracelular. La especificidad de ligando parece estar determinada en gran parte por la combinación particular de las subunidades α y β , aunque otros factores tales como el procesamiento alternativo y el grado de activación de la integrina también pueden contribuir. Por tanto, una vez conocidos los heterodímeros presentes en las células BCS-TC2 se plantea el estudio de la especificidad de dichos receptores por los ligandos de la matriz extracelular. Con este fin se realizan ensayos de inhibición de la adhesión a los distintos componentes de la matriz extracelular por anticuerpos específicos anti-integrinas así como cromatografías de afinidad.

3.2.2. RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS EN LA ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS BCS-TC2 A COMPONENTES DE LA ECM

Inhibición de la adhesión celular por anticuerpos anti-integrina

En los ensayos de inhibición de la adhesión se puede determinar la especificidad de unión de las integrinas usando anticuerpos que inhiban la función de integrinas individuales. Inicialmente se estudió el efecto de diferentes anticuerpos anti-integrinas sobre la adhesión a laminina, fibronectina, colágeno tipo I y colágeno tipo IV.

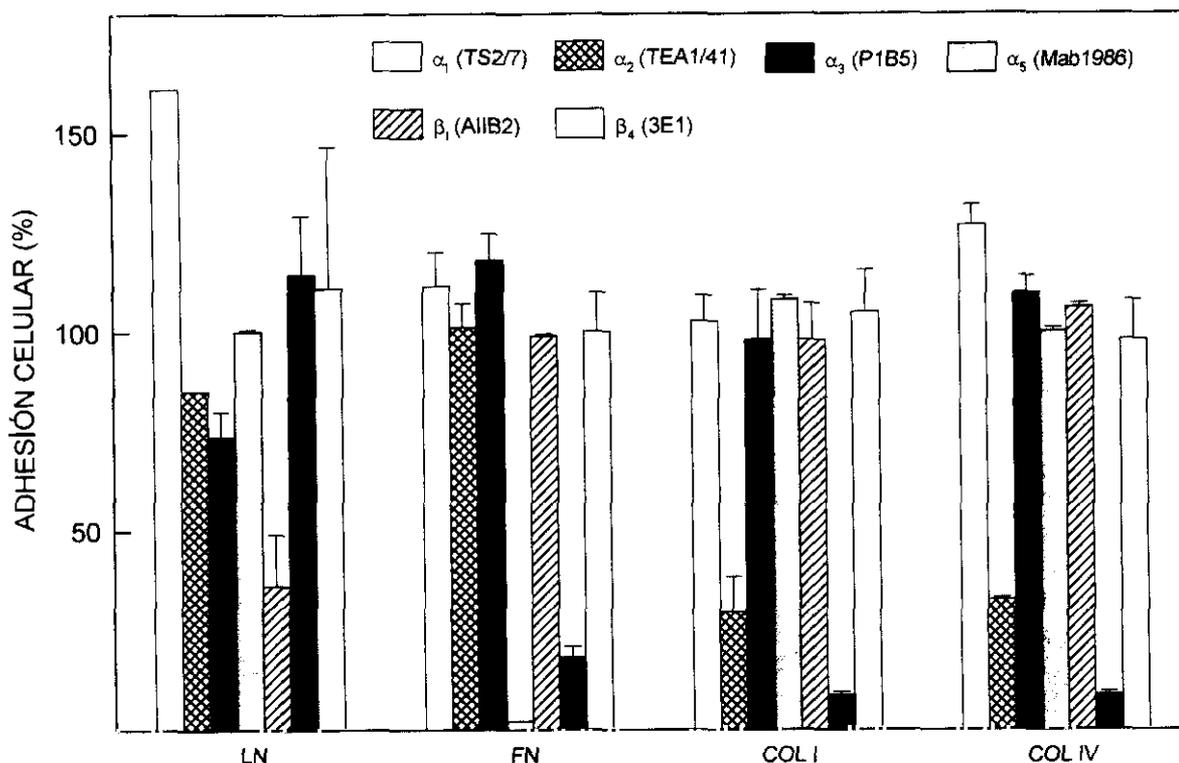


Figura 24.- Efecto de anticuerpos anti-integrinas sobre la adhesión de células BCS-TC2 a proteínas de la ECM.

Las células se incuban durante 45 minutos a 37°C con anticuerpos anti- α_1 , anti- α_2 , anti- α_6 y anti- β_1 (dilución 1:10), anti- α_3 y anti- α_5 (dilución 1:450), y anti- β_4 (dilución 1:50). Posteriormente las células se dejan adherir, durante 30 minutos, sobre superficies saturadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LN, FN, Col I o Col IV. El número de células adheridas se determinan como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de células adheridas respecto de la adhesión control a cada sustrato en ausencia de anticuerpo (100%), y proceden de cuatro experimentos realizados con determinaciones por cuadruplicado.

Como se observa en la figura 24 los anticuerpos anti- β_1 y anti- α_5 inhiben de manera significativa la adhesión a fibronectina, mientras que sobre laminina, a la concentración de anticuerpo utilizada, solamente se observa un fuerte bloqueo de la adhesión en presencia de anticuerpos anti- α_6 . La adhesión de las células BCS-TC2 sobre ambos tipos de colágeno se inhibe por anticuerpos anti- β_1 y anti- α_2 . Con estos resultados iniciales, se procede a estudiar en mayor profundidad los receptores celulares implicados en la adhesión a los diferentes sustratos.

Receptores celulares implicados en la adhesión célula-fibronectina

Efecto de anticuerpos anti-integrinas en la adhesión a fibronectina

Puesto que solamente los anticuerpos anti- α_5 y anti- β_1 inhiben la adhesión de manera significativa a fibronectina, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de estos anticuerpos sobre la adhesión a esta glicoproteína.

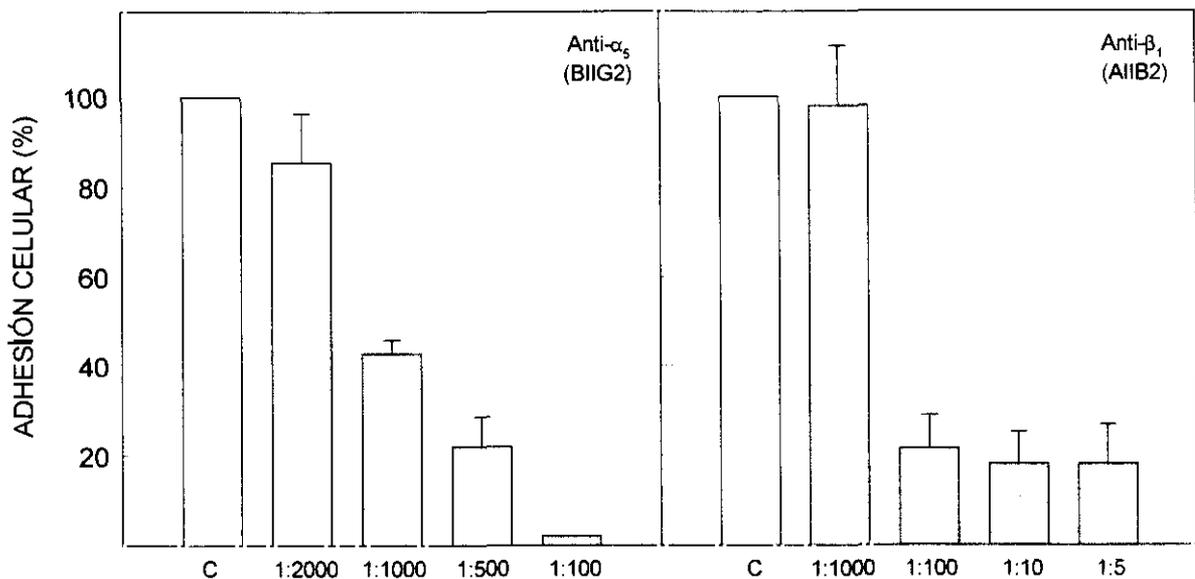


Figura 25.- Inhibición de la adhesión celular a fibronectina por anticuerpos anti-integrina.

Los experimentos de inhibición de la adhesión por anticuerpos se llevan a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células tripsinizadas se incuban durante 45 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de los anticuerpos. Posteriormente, las células se dejan adherir durante 30 minutos sobre pocillos saturados con 10µg/mL de fibronectina, tras lo cual se valora el número de células adheridas. Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto de las adheridas al sustrato en ausencia de anticuerpo (100%), y proceden de cuatro experimentos realizados con determinaciones por cuadruplicado.

Anticuerpos anti- β_1 producen un fuerte bloqueo de la adhesión celular, ya que para una dilución 1:100 se obtiene una inhibición del 80%, mientras que el anticuerpo anti- α_5 origina una total inhibición a una dilución 1:100 (Figura 25). Estos resultados sugieren que la integrina $\alpha_5\beta_1$ es el principal receptor en las células BCS-TC2 responsable de la adhesión a fibronectina. Parece, por tanto, que la integrina $\alpha_3\beta_1$, descrita como receptor de fibronectina, no participa como tal en este caso. Las células HT-29, que no expresan $\alpha_5\beta_1$ pero sí $\alpha_3\beta_1$, no son capaces de interactuar con fibronectina, lo que indica que este heterodímero $\alpha_3\beta_1$ tampoco participa en dicha interacción (Varner *et al.*, 1995).

Cromatografía de afinidad Sepharose-fibronectina

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos de inhibición de la adhesión, se purificaron las integrinas capaces de interactuar con fibronectina realizando cromatografías de afinidad Sepharose-fibronectina en presencia de Mn^{2+} . Este catión favorece la interacción integrina-ligando y, por tanto, la retención de las integrinas en la Sepharose-fibronectina. Las proteínas unidas de manera específica al ligando se eluyen con EDTA.

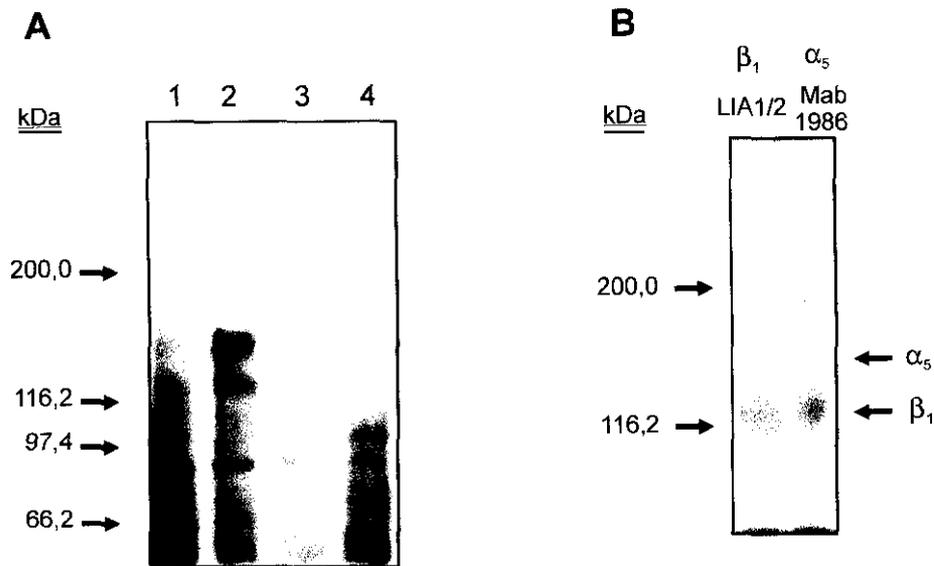


Figura 26.- Análisis electroforético de la cromatografía de afinidad en Sepharose-fibronectina.

Extractos celulares marcados con biotina se aplican en columnas de Sepharose-FN y las proteínas retenidas se eluyen con EDTA como se indica en Materiales y Métodos. (A) Las distintas fracciones eluidas con EDTA (1 a 4) se analizan por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. (B) Inmunoprecipitación de la fracción 2 del eluido con EDTA con anti- β_1 (LIA1/2) o anti- α_5 (Mab1986) y análisis del inmunoprecipitado por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. Tras la electroforesis se lleva a cabo el proceso de transferencia e identificación de las proteínas biotiniladas mediante tinción con avidina-peroxidasa y revelado por ECL.

En la figura 26 se recoge el patrón de proteínas retenidas en la columna de Sepharose-fibronectina tras someterlas a PAGE-SDS en condiciones no reductoras. Se detecta la presencia de dos bandas de proteína de 120 y 160 kDa (Figura 26A, carril 2), además de otras proteínas de mayor movilidad electroforética. Para identificar las integrinas se realiza una inmunoprecipitación con distintos anticuerpos frente a las distintas cadenas α y frente a β_1 y posterior análisis por PAGE-SDS. Sólo se obtuvo resultado positivo con los anticuerpos anti- α_5 y anti- β_1 (Figura 26B). En ambos casos se obtienen dos bandas de proteína de 120 y 160 kDa, masas moleculares que corresponden a las integrinas β_1 y α_5 (Adams y Watt, 1990). Por tanto, se pone de manifiesto que la principal integrina implicada en la unión a fibronectina es $\alpha_5\beta_1$, confirmando el resultado obtenido en los experimentos de inhibición de la adhesión.

Dicha integrina interacciona con el sitio de unión a células de la fibronectina que contiene las secuencias RGD/PHSRN (Akiyama *et al.*, 1995b). Como se ha indicado anteriormente (Figura 16 y 17), la adhesión de las células BCS-TC2 a fibronectina es inhibida por péptidos que contienen la secuencia -RGD-, lo que confirma la implicación de la integrina $\alpha_5\beta_1$ en la adhesión a fibronectina en estas células.

Receptores celulares implicados en la adhesión célula-colágeno

Efecto de anticuerpos anti-integrinas en la adhesión a colágeno tipo I y tipo IV

La adhesión sobre colágeno tipo I y IV se inhibe si las células se tratan con anticuerpos anti- α_2 y anti- β_1 , como se recoge en la figura 24. Por tanto se estudió el efecto de diferentes concentraciones de estos anticuerpos, observándose que la inhibición es, en todos los casos, dependiente de la concentración de anticuerpo utilizada.

El anticuerpo AIB2 (anti- β_1) inhibe fuertemente la adhesión de las células BCS-TC2 a colágenos tipo I y IV, consiguiéndose una inhibición del 95% a una dilución 1:100 del medio de cultivo de hibridomas (Figura 27).

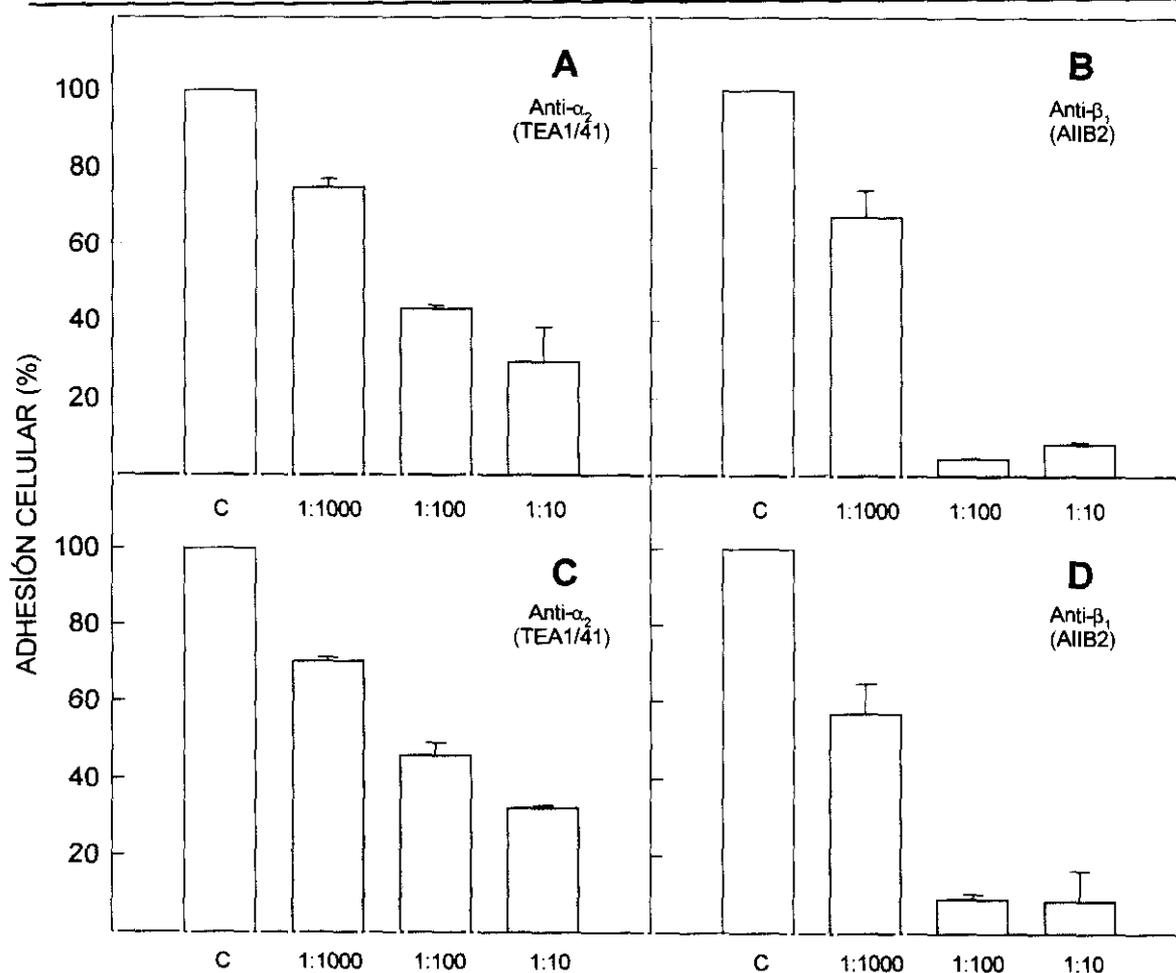


Figura 27.- Inhibición de la adhesión celular a colágenos por anticuerpos anti-integrina.

La inhibición de la adhesión por anticuerpos se ha llevado a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células tripsinizadas se incuban durante 45 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de los anticuerpos y se dejan adherir, durante 30 minutos, sobre pocillos saturados con 10µg/mL de colágeno tipo I (A,B) o tipo IV (C,D), tras lo cual se valora el número de células adheridas. Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto del control correspondiente en ausencia de anticuerpo (100%), y proceden de cuatro experimentos realizados con determinaciones por cuadruplicado.

El anticuerpo anti- α_2 inhibe, a una dilución 1:10, un 70% la adhesión a colágeno de tipo I y IV. Los resultados sugieren que la integrina $\alpha_2\beta_1$, probablemente, es el principal receptor celular que media en la interacción a los dos tipos de colágenos estudiados, como ocurre en la mayoría de las células epiteliales. Sin embargo, no se consigue el 100% de inhibición con anticuerpos anti- α_2 , lo que podría indicar la presencia de algún mecanismo adicional de adhesión, como la participación de la integrina $\alpha_1\beta_1$ también descrita como receptor para el colágeno de tipo I y IV (Gullberg *et al.*, 1992; Pfaff *et al.*, 1993). Sin embargo, los anticuerpos anti- α_1 utilizados (TS2/7 y 5E8D9) no bloquean la adhesión a colágenos, aunque sí que lo hacen en otras líneas celulares (Yamamoto *et al.*, 1995). El resto de anticuerpos no ejercen efecto, como se recoge en la figura 24.

Cromatografías de afinidad Sepharose-colágeno de tipo I

Una vez determinadas las integrinas implicadas en la interacción célula-colágeno, se procedió a su identificación mediante cromatografías de afinidad Sepharose-colágeno tipo I. El análisis electroforético, en condiciones no reductoras, de las proteínas retenidas pone de manifiesto la presencia de tres bandas de proteína de 210, 150 y 120 kDa (Figura 28A) que, por sus masas moleculares, podrían corresponder a las integrinas α_1 , α_2 y β_1 respectivamente. Para identificar estas proteínas se inmunoprecipitan las proteínas eluidas con EDTA con distintos anticuerpos anti-integrinas, obteniendo sólo inmunoprecipitado cuando se utilizan anticuerpos anti- α_2 o anti- β_1 . El análisis electroforético en condiciones no reductoras del inmunoprecipitado con anti- α_2 indica la presencia de bandas de proteínas de 150 y 120 kDa (Figura 28B). Cuando se realiza la inmunoprecipitación con anticuerpos anti- β_1 se observan tres bandas de proteína de 210, 150 y 120 kDa, que probablemente corresponden a las subunidades de integrinas α_1 , α_2 y β_1 . Por tanto, estos resultados sugieren que, en las células BCS-TC2, la integrina $\alpha_2\beta_1$ es el principal receptor para los colágenos, aunque en esta interacción también podría participar la integrina $\alpha_1\beta_1$. Puesto que el péptido GRGDSP no inhibe la adhesión celular a colágenos de tipo I y tipo IV (Figura 16), la interacción a través de estas dos integrinas parecer ser independiente de RGD, como han indicado otros autores (Vanderberg *et al.*, 1991; Gullberg *et al.*, 1992; Pfaff *et al.*, 1993).

En este sentido se ha propuesto que el péptido FYFDLR participa en la unión de las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ al colágeno de tipo IV (Vandenberg *et al.*, 1991; Underwood *et al.*, 1995), y que el péptido DGEA está implicado en la unión de la integrina $\alpha_2\beta_1$ al colágeno de tipo I en células de carcinoma de mama y plaquetas (Staa *et al.*, 1991). La integrina $\alpha_1\beta_1$ reconoce un conjunto de dos residuos, aspártico en la cadena α_1 (IV) y arginina en la cadena α_2 (IV) de la superficie de la triple hélice del colágeno de tipo IV (Eble *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1994b).

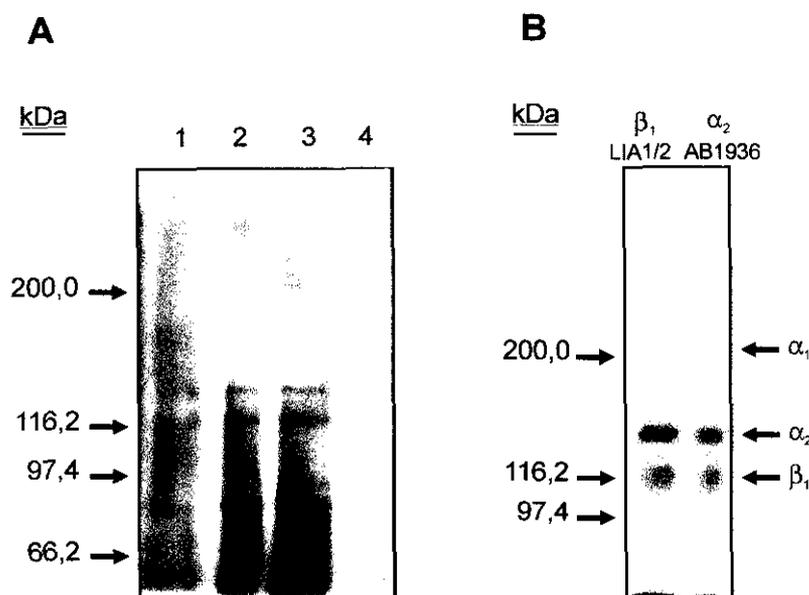


Figura 28.- Análisis electroforético de la cromatografía de afinidad en Sepharose-colágeno tipo I.

Extractos celulares marcados con biotina se aplican a columnas de Sepharose-Col I y las proteínas retenidas se eluyen con EDTA. (A) Las fracciones eluidas con EDTA (1 a 4) se analizan por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. (B) Inmunoprecipitación de la fracción 2 del eluido con EDTA con anti- β_1 (LIA1/2) o anti- α_2 (Mab1936) y análisis del inmunoprecipitado por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. Tras la electroforesis se lleva a cabo el proceso de transferencia e identificación de las proteínas biotinizadas mediante reacción con avidina-peroxidasa y revelado por ECL.

Receptores celulares implicados en la interacción célula-laminina

Efecto de anticuerpos anti-integrinas en la adhesión a laminina

Las células BCS-TC2 expresan las integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$, todas potenciales receptores para la laminina. Por tanto, resulta interesante analizar el efecto de diferentes anticuerpos anti-integrinas para determinar las que están implicadas en la interacción con laminina (Figura 24). Sólo el anticuerpo anti- α_6 (GoH3) inhibe significativamente la adhesión a laminina, consiguiéndose para una dilución 1:10 del anticuerpo una inhibición algo superior al 60% (Figura 29). Resultados similares a estos se han obtenido con la misma dilución de anticuerpo en células B16 de melanoma (Ramos *et al.*, 1990), un 60% de inhibición en células ClonA con 5 μ g/mL de concentración de anticuerpo (Lee *et al.*, 1992) y una inhibición casi total de la adhesión en células HT1080 y OVCAR-4 (Sonnenberg *et al.*, 1990a; Aumailley *et al.*, 1990b). Este anticuerpo bloquea selectivamente la adhesión celular al fragmento E8 de la laminina, pero no al P1, en plaquetas, fibroblastos y células tumorales (Sonnenberg *et al.*, 1990a; Aumailley *et al.*, 1990a). Estos resultados sugieren que la subunidad α_6 está implicada en la adhesión de las

células BCS-TC2 a laminina. Sin embargo, puesto que no se consigue una inhibición total de la adhesión con anticuerpos anti- α_6 , se debe estudiar la posible implicación de otras subunidades α de las integrinas.

Anticuerpos TS2/7 frente a la integrina α_1 activan la adhesión de las células BCS-TC2 a laminina, mientras que anticuerpos anti- α_1 5E8D9 no producen ningún efecto. Anticuerpos anti- α_2 , a una concentración que inhibe fuertemente la adhesión celular sobre colágeno, utilizados a la misma concentración, sólo inhiben ligeramente la adhesión sobre laminina. Los anticuerpos anti- α_3 (PIB5) también inhiben ligeramente la adhesión (Figura 24). Este anticuerpo bloquea parcialmente la interacción de células HT1080 a la laminina-1 (Wayner y Carter, 1987); sin embargo, otros autores no han encontrado efecto en la adhesión de células HT1080, OVCAR-4 y de carcinoma de vejiga (Sonnenberg *et al.*, 1990a; Aumailley *et al.*, 1990a; Nista *et al.*, 1996).

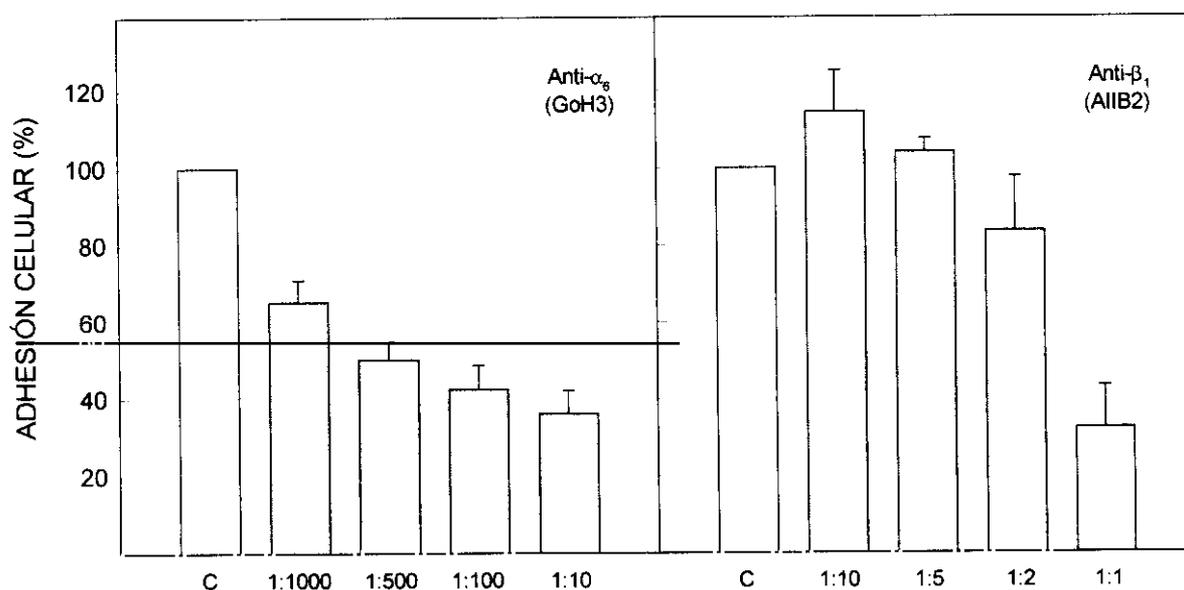


Figura 29.- Inhibición de la adhesión celular a laminina por anticuerpos anti-integrina.

Los experimentos de inhibición de la adhesión por anticuerpos se llevan a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células tripsinizadas se incuban durante 45 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de los anticuerpos. Posteriormente las células se dejan adherir, durante 30 minutos, sobre pocillos saturados con 10 μ g/mL de laminina, tras lo cual se valora el número de células adheridas. Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto de las adheridas al sustrato en ausencia de anticuerpo (100%), y proceden de cuatro experimentos realizados con determinaciones por cuadruplicado.

Se ha comprobado el efecto de la combinación de anticuerpos anti- α_2 y anti- α_3 con anticuerpos anti- α_6 , lo que origina una ligera mayor inhibición que la producida por cada uno de los anticuerpos individualmente. Estos resultados sugieren que probablemente existe

una contribución adicional en la adhesión a laminina proporcionada por otras integrinas tales como $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$. En concreto, $\alpha_2\beta_1$ actúa como receptor para esta proteína en células ClonA, de carcinoma de colon (Lotz *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992). Además, se ha descrito que la integrina $\alpha_2\beta_1$ puede estabilizar la adhesión iniciada por el heterodímero $\alpha_6\beta_1$, y también es posible que la ocupación de este heterodímero "active" la unión a laminina de $\alpha_2\beta_1$ (Lee *et al.*, 1992). La cooperación de integrinas en la unión a laminina se ha descrito en otras líneas celulares (Lotz *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1990; Rabinovitz *et al.*, 1995). En células de carcinoma de vejiga, el anticuerpo anti- α_3 utilizado en nuestro sistema (P1B5) no produce ningún efecto individualmente pero una mezcla de anti- α_6 (GoH3) y anti- α_3 (P1B5) bloquea completamente la adhesión a laminina, lo que sugiere una coparticipación de los receptores $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ (Nista *et al.*, 1996). En células de carcinoma de próstata la integrina α_3 está implicada en la adhesión a laminina en coparticipación con $\alpha_6\beta_4$ (Rabinovitz *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede concluir que en la adhesión de las células BCS-TC2 a laminina están implicadas integrinas de la familia β_1 , participando la integrina $\alpha_6\beta_1$ principalmente, además de $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$. La adhesión mediada por las integrinas $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ justificaría la adhesión celular al fragmento E8, ya que se ha postulado que ambas integrinas reconocen este fragmento en la molécula de laminina (Aumailley *et al.*, 1987; Gehlsen *et al.*, 1992a). Por otro lado, la integrina $\alpha_2\beta_1$ contribuiría a la adhesión celular al fragmento E1-4, ya que este receptor reconoce la secuencia -YGYGDALR- localizada en la cadena β_1 de la laminina próxima a la intersección de la cruz (Underwood *et al.*, 1995).

Cuando se estudió el efecto de anticuerpos anti- β_1 , se comprobó que sólo a altas concentraciones, el anticuerpo AIIB2 inhibe la adhesión a laminina (Figura 29). Así por ejemplo, a una dilución 1:100 del anticuerpo, dilución a la cual la adhesión a fibronectina y colágenos se inhibe está casi completamente, no se observa ningún efecto sobre la adhesión celular a laminina. Estos resultados, al contrario que los obtenidos con anticuerpos frente a las subunidades α , podrían indicar que las integrinas de la familia β_1 no están implicadas en la interacción con laminina. Sin embargo, hay que considerar que la interacción del anticuerpo anti- β_1 , en el caso de $\alpha_6\beta_1$, puede ser específica pero de baja afinidad, o bien que los niveles de $\alpha_6\beta_1$ sean tan altos que en ambos casos se requiera una concentración muy superior de anticuerpo para conseguir bloquear la interacción (Figura 29). Otra posibilidad a considerar sería que la subunidad β_1 implicada en la interacción con laminina presente un diferente grado de glicosilación que el resto de las subunidades β_1 . En este caso los hidratos de carbono podrían dificultar la unión del anticuerpo a la integrina. También podría darse el caso de que la conformación que adquiere β_1 al interactuar con α_6 sea distinta a la que adquiere al interactuar con otras subunidades α .

El hecho de que la inhibición por anticuerpos anti- β_1 no sea total podría sugerir la participación de otros receptores. Puesto que las células BCS-TC2 expresan el receptor $\alpha_6\beta_4$, se comprobó el efecto de anticuerpos 3E1 frente a la integrina β_4 sobre la adhesión celular a laminina. Sin embargo, estos anticuerpos no modifican la adhesión a esta glicoproteína (Figura 24). En las células de cáncer de colon ClonA, por el contrario, se consigue un 30% de inhibición con los anticuerpos anti- β_4 (A9), y se implica al heterodímero $\alpha_6\beta_4$ en la interacción con laminina (Lee *et al.*, 1992). La función de la integrina $\alpha_6\beta_4$ como receptor de laminina ha sido objeto de estudio en muchas líneas celulares, obteniéndose resultados diversos y contradictorios. En células de carcinoma de próstata y colorrectal se ha postulado que la integrina $\alpha_6\beta_4$ es un receptor para esta proteína (Niessen *et al.*, 1994; Rabinovitz *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1996), mientras que en células de adenocarcinoma de mama se pone en duda tal función (Sonnenberg *et al.*, 1990a). Otros autores sugieren que la integrina $\alpha_6\beta_4$ puede participar no en la adhesión inicial de las células a laminina, sino en un estado más tardío de la adhesión, como se ha descrito para queratinocitos (De Luca *et al.*, 1990). Hay que considerar que la ruptura proteolítica de las moléculas β_4 origina la pérdida de la parte principal del dominio citoplasmático, lo que podría alterar la actividad de unión al ligando, así como las conexiones con el citoesqueleto (Giancotti *et al.*, 1992; Chao *et al.*, 1996). Dicha ruptura proteolítica podría justificar en parte el diferente comportamiento de la integrina $\alpha_6\beta_4$ dependiendo de la línea celular. Además de participar en los procesos de adhesión celular, esta integrina está implicada en la formación de hemidesmosomas y en la diferenciación y la supervivencia celular (Dowling *et al.*, 1996).

Las células expresan en su superficie lectinas y galactosiltransferasa que pueden unir los hidratos de carbono de la molécula de la laminina. Por tanto, se planteó estudiar si en la interacción de las células BCS-TC2 con la matriz extracelular participan este tipo de interacciones, lo que justificaría, en parte, que no se consiga una total inhibición por anticuerpos anti-integrina. Para ello, se realizaron experimentos de inhibición de la adhesión a laminina preincubando las células con lactosa (Figura 30). En estos experimentos se produce una inhibición de la adhesión a laminina, consiguiéndose un 70% de inhibición para una concentración 50 mM de lactosa. Este resultado indicaría que las lectinas participan en la interacción con laminina a través del reconocimiento de residuos de galactosa de la proteína. Sin embargo, en otros casos se ha descrito que esta unión puede promover la extensión y la salida de neuritas pero que no es esencial para la fase inicial de adhesión (Dean *et al.*, 1990; Chandrasekaran *et al.*, 1991).

Puesto que las células BCS-TC2 expresan el receptor de alta afinidad para laminina (López-Conejo *et al.*, 1996; Olmo *et al.*, 1997), se estudió la contribución de dicho receptor en la adhesión celular a laminina. Para ello se comprobó el efecto de dos

anticuerpos monoclonales (MLUC5 y MLUC6) que reconocen al receptor de alta afinidad. Como se observa en la figura 30, a ninguna de las diluciones estudiadas de ambos anticuerpos se observa inhibición de la adhesión celular a laminina. Este hecho puede deberse a la ya cuestionada participación de este receptor en la adhesión (Mechan, 1991) o a que estos anticuerpos no presenten actividad inhibitoria. Algunos autores ya han observado que los anticuerpos MLUC5 y MLUC6 no ejercen ningún efecto en la adhesión celular (Martignone *et al.*, 1992). Actualmente no hay descrito ningún anticuerpo frente a la proteína de 67 kDa que inhiba la adhesión celular.

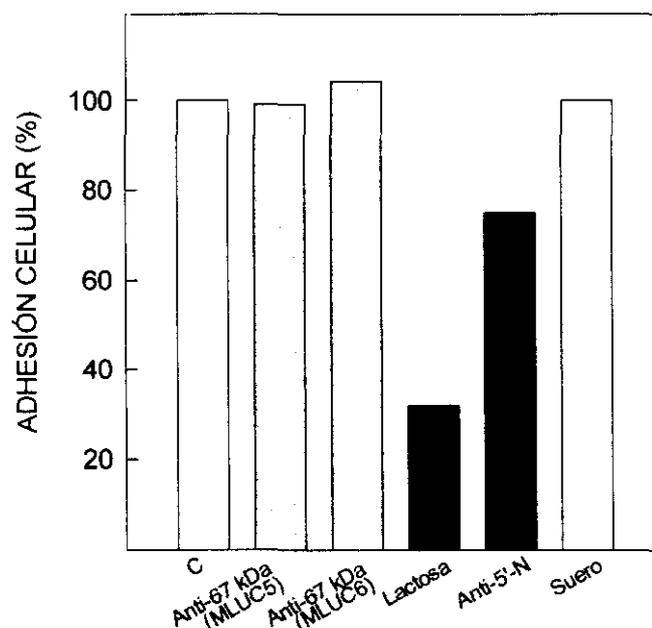


Figura 30.- Efecto de lactosa, anticuerpos anti-67 kDa y anti-5'-nucleotidasa sobre la adhesión celular a laminina.

La inhibición de la adhesión se lleva a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células tripsinizadas se incuban durante 45 minutos a 37°C con 50 mM de lactosa, con anticuerpos anti-67 kDa (dilución 1:100), con un anticuerpo policlonal anti-5'-nucleotidasa (dilución 1:100) o con un suero control. Posteriormente, las células se siembran sobre pocillos saturados con LN a 10 µg/mL, y las células se dejan adherir durante 30 minutos. Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto de las células adheridas a laminina en ausencia de lactosa o anticuerpo, y proceden de tres experimentos independientes realizados con determinaciones para cada dato por cuadruplicado. El error experimental es inferior al 10%.

La interacción de la 5'-nucleotidasa con laminina y fibronectina sugiere una función de la ectoenzima en el reconocimiento de componentes de la matriz extracelular, pudiendo actuar también como modulador en el proceso de adhesión y en la locomoción celular (Turnay 1989; Olmo *et al.*, 1992; Olmo y Lizarbe, 1994). Por lo tanto, se han realizado ensayos de inhibición de la adhesión con anticuerpos policlonales obtenidos frente a la

enzima de las células BCS-TC2 (Navarro *et al.*, 1997). En dichos experimentos se consigue una adhesión del 75% para una dilución 1:100 del anticuerpo (Figura 30). El efecto es específico, puesto que con suero control no se produce ningún efecto sobre la adhesión celular. Por tanto, es probable que la 5'-nucleotidasa actúe como receptor de laminina en las células BCS-TC2.

Los estudios de inhibición permiten concluir en la interacción células BCS-TC2-laminina tiene lugar a través del reconocimiento de secuencias específicas en la molécula por receptores de tipo integrina, así como por el reconocimiento de residuos de galactosa por las lectinas presentes en la superficie celular. Además en dicha interacción pueden participar otras moléculas como la ectoenzima 5'-nucleotidasa.

Identificación de receptores de laminina en células BCS-TC2

Cuando se realiza una cromatografía de extractos celulares en Sepharose-laminina quedan retenidas dos proteínas de 165 y 120 kDa que se eluyen con EDTA. Además, se observan otras bandas que corresponden a proteínas de menor masa molecular (Figura 31A). La identificación de las integrinas retenidas se ha realizado inmunoprecipitando las proteínas eluidas con EDTA con diferentes anticuerpos anti- α y con anticuerpos anti- β_1 , obteniéndose resultado positivo sólo cuando se utilizan anticuerpos frente a las subunidades α_6 y β_1 . Como se observa en la figura 31B, tras analizar el inmunoprecipitado por PAGE-SDS en condiciones no reductoras se obtienen dos bandas correspondientes a proteínas de 165 y 120 kDa de masa molecular, que coinciden con las descritas para las integrinas β_1 y α_6 respectivamente (Kim *et al.*, 1995; Nista *et al.*, 1996). Estos resultados, junto con los ensayos de inhibición con anticuerpos anti- α_6 y anti- β_1 , sugieren que la integrina $\alpha_6\beta_1$ es la principal integrina implicada en la unión a laminina, como ya se ha descrito en plaquetas, células de melanoma y células de cáncer de colon (Sonnenberg *et al.*, 1988b; Ramos *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1995). La inhibición producida por estos anticuerpos no es total, lo que implica la participación de otros receptores. De hecho, de la columna Sepharose-laminina se eluye una proteína minoritaria de masa molecular 210 kDa. Esta proteína tiene menos afinidad por la laminina, ya que eluye a fuerza iónica 0,2 M pero no con EDTA. Una proteína similar (180 kDa), detectada en células de melanoma (Ramos *et al.*, 1990), se ha propuesto como la integrina α_1 . Sin embargo, por su masa molecular también podría corresponder a la integrina β_4 , resultado que se debería confirmar. En muchos casos, el heterodímero $\alpha_6\beta_4$ no se retiene en este tipo de columnas. Algunos autores afirman que la unión de $\alpha_6\beta_4$ a laminina es dependiente de que la Sepharose-laminina esté recién preparada, sugiriendo que el estado físico o la conformación de la proteína es crítica para esta unión (Lee *et al.*, 1992).

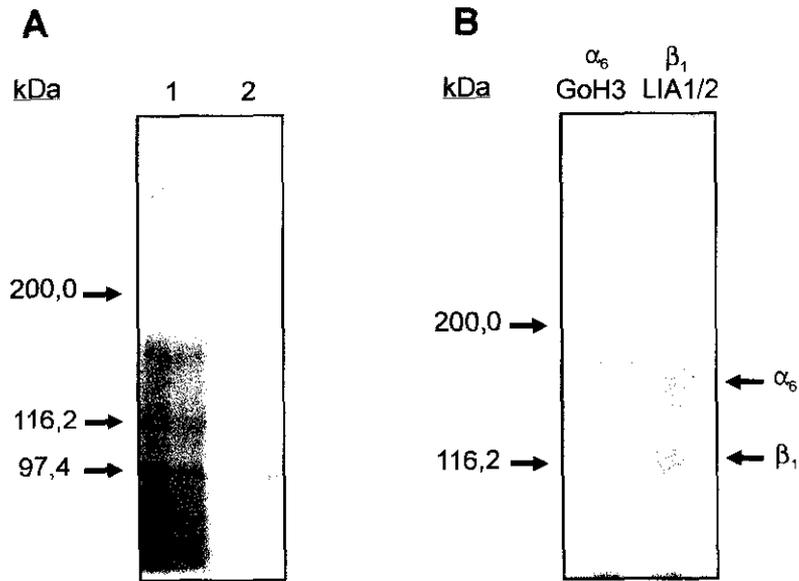


Figura 31.- Análisis electroforético de la cromatografía de afinidad en Sepharose-laminina.

Extractos celulares marcados con biotina se aplican en columnas de Sepharose-LN y las proteínas retenidas se eluyen con EDTA. (A) Las distintas fracciones eluidas con EDTA (1 y 2) se analizan por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. (B) Immunoprecipitación de la fracción 1 del eluido con EDTA con anti- β_1 (LIA1/2) o anti- α_6 (GoH3) y análisis del inmunoprecipitado por PAGE-SDS al 5% en condiciones no reductoras. Tras la electroforesis se lleva a cabo el proceso de transferencia e identificación de las proteínas biotinizadas mediante reacción con avidina-peroxidasa y revelado por ECL.

3.2.3. EFECTO DE CATIONES DIVALENTES EN LA INTERACCIÓN CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR

Las integrinas requieren cationes divalentes no sólo para su dimerización, sino también para su unión al ligando (Loftus *et al.*, 1990; Gulino *et al.*, 1992). Los cationes pueden modular tanto la afinidad como la especificidad de las integrinas. Se ha sugerido que la principal función de los cationes divalentes es provocar un cambio conformacional en la integrina y desplazar el equilibrio entre su estado activo e inactivo (Mould *et al.*, 1995a; Humphries, 1996). Puesto que las células BCS-TC2 interactúan con la matriz extracelular a través de integrinas, se ha estudiado el efecto de distintos cationes divalentes en estas interacciones.

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 32. Todos los cationes divalentes empleados incrementan la adhesión a laminina, siendo la efectividad obtenida $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+}$. Las integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$ requieren Mg^{2+} y/o Mn^{2+} para su unión al ligando, mientras que el Ca^{2+} inhibe esta unión (Grzesiak *et al.*, 1992; Lallier y Bronner-Fraser, 1992; Hara *et al.*, 1994). Sin embargo, la adhesión de las

células BCS-TC2 a laminina se incrementa prácticamente al doble en presencia de cationes Ca^{2+} respecto del control. Este resultado está de acuerdo con estudios que indican que la laminina contiene dominios reconocidos por integrinas dependientes de calcio (Kramer *et al.*, 1990). Hay que considerar, además, que el heterodímero $\alpha_3\beta_1$ requiere Ca^{2+} para unirse a la laminina (Elices *et al.*, 1991). Por tanto, es probable que, en estas células, este catión incremente la afinidad de la integrina $\alpha_3\beta_1$ por laminina. Por otro lado, la integrina $\alpha_6\beta_4$ se une a laminina en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} (Lee *et al.*, 1992).

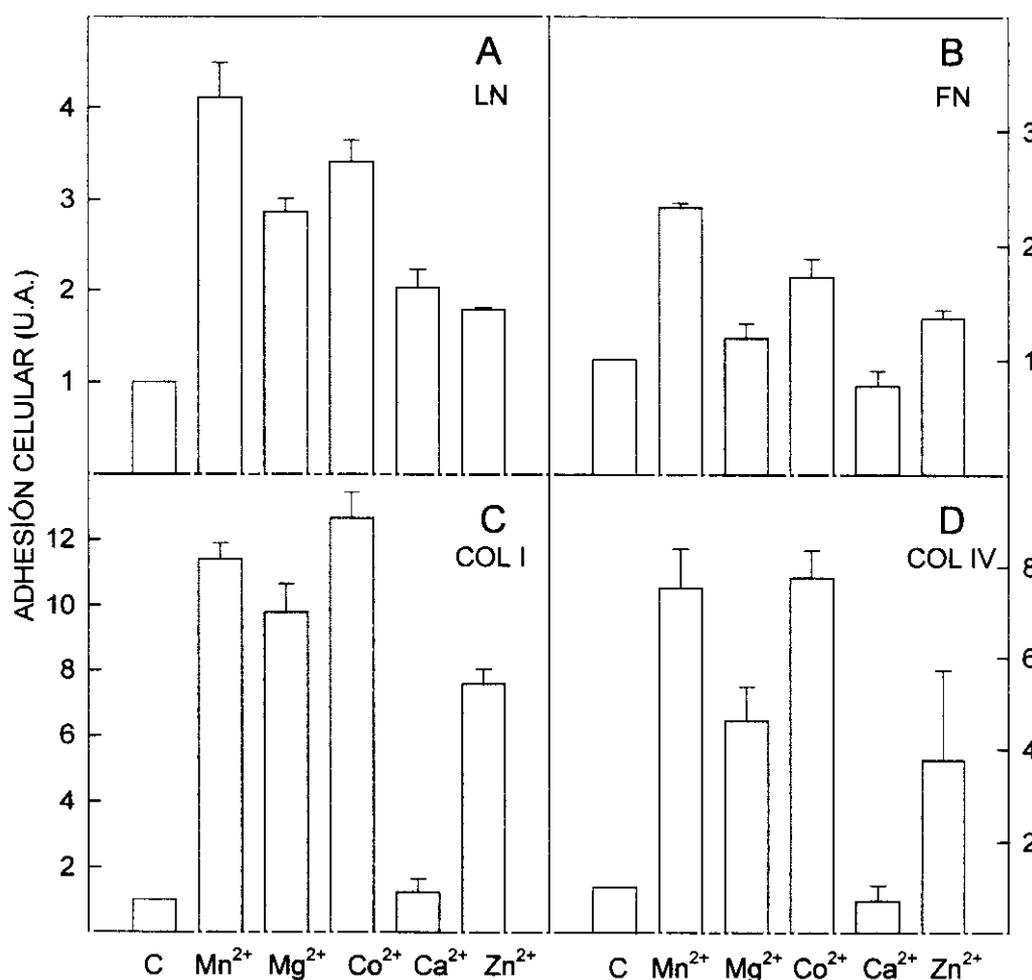


Figura 32.- Efecto de cationes divalentes en la adhesión de las células BCS-TC2 a proteínas de la ECM.

Las células se recogen por tripsinización, se lavan dos veces con PBS/EDTA 1mM y se resuspenden en tampón Tris 10mM, pH 7,5, NaCl 0,15M, KCl 5mM, Glutamina 2mM, Glucosa 1,8mM y BSA al 1%, en presencia o ausencia del catión divalente correspondiente a una concentración 2mM. Las células se siembran sobre LN, FN, Col I y Col IV (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se valora el número de células adheridas después de 30 minutos mediante el método colorimétrico descrito en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como incremento en la adhesión celular respecto de la obtenida en ausencia de cationes, a la que se asigna el valor de 1.

Los cationes Mn^{2+} y Co^{2+} incrementan la adhesión a fibronectina, mientras que Mg^{2+} y Zn^{2+} lo hacen muy ligeramente, y el catión Ca^{2+} no ejerce ningún efecto. La interacción de las células BCS-TC2 con esta proteína tiene lugar a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$. Estos resultados coinciden con otros que indican que el reconocimiento del ligando por este heterodímero $\alpha_5\beta_1$ está favorecido por cationes Mn^{2+} , Mg^{2+} pero no por Ca^{2+} (Mould *et al.*, 1995a,b). Además el Mn^{2+} confiere una mayor afinidad de unión por el ligando que el Mg^{2+} (Mould *et al.*, 1995a,b). Sin embargo, otros estudios indican que esta integrina se une a fibronectina en presencia de cationes Ca^{2+} , además de Mg^{2+} y/o Mn^{2+} (Gailit y Ruoslahti, 1988; Kirchhofer *et al.*, 1991). En las células BCS-TC2 la interacción célula-fibronectina es independiente de cationes Ca^{2+} .

La adhesión de las células BCS-TC2 a los colágenos se incrementa por Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} . Sin embargo, la adhesión no se afecta por Ca^{2+} . Estos resultados coinciden con otros, que indican que las integrinas $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$ requieren Mn^{2+} y Mg^{2+} , pero no Ca^{2+} para su interacción con el ligando (Grzesiak *et al.*, 1992; Lallier y Bronner-Fraser, 1992).

3.3. TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL

Diferentes tipos de células cuando se adhieren sobre componentes de la matriz extracelular forman ensamblajes transmembrana conocidos como contactos focales. De forma general, los contactos focales pueden dividirse morfológica y bioquímicamente en 4 regiones (extracelular, transmembrana, placa citoplasmática y red de microfilamentos). La primera zona, o región extracelular, se caracteriza por la presencia de moléculas de la matriz extracelular, las cuales conducen o inducen la formación de contactos focales. La segunda es la región transmembrana, en la cual están implicadas directamente las integrinas. El dominio citoplasmático de las subunidades α tiene una función reguladora y el de la subunidad β daría cuenta de la asociación directa con el citoesqueleto.

Para completar los estudios, recientemente se ha planteado también la posibilidad de realizar ensayos para elucidar las vías de transmisión de la señal tras la interacción componentes de la matriz extracelular-integrina. Aunque se trata de datos previos y actualmente en estudio, se ha considerado oportuno incorporarlos en esta Memoria.

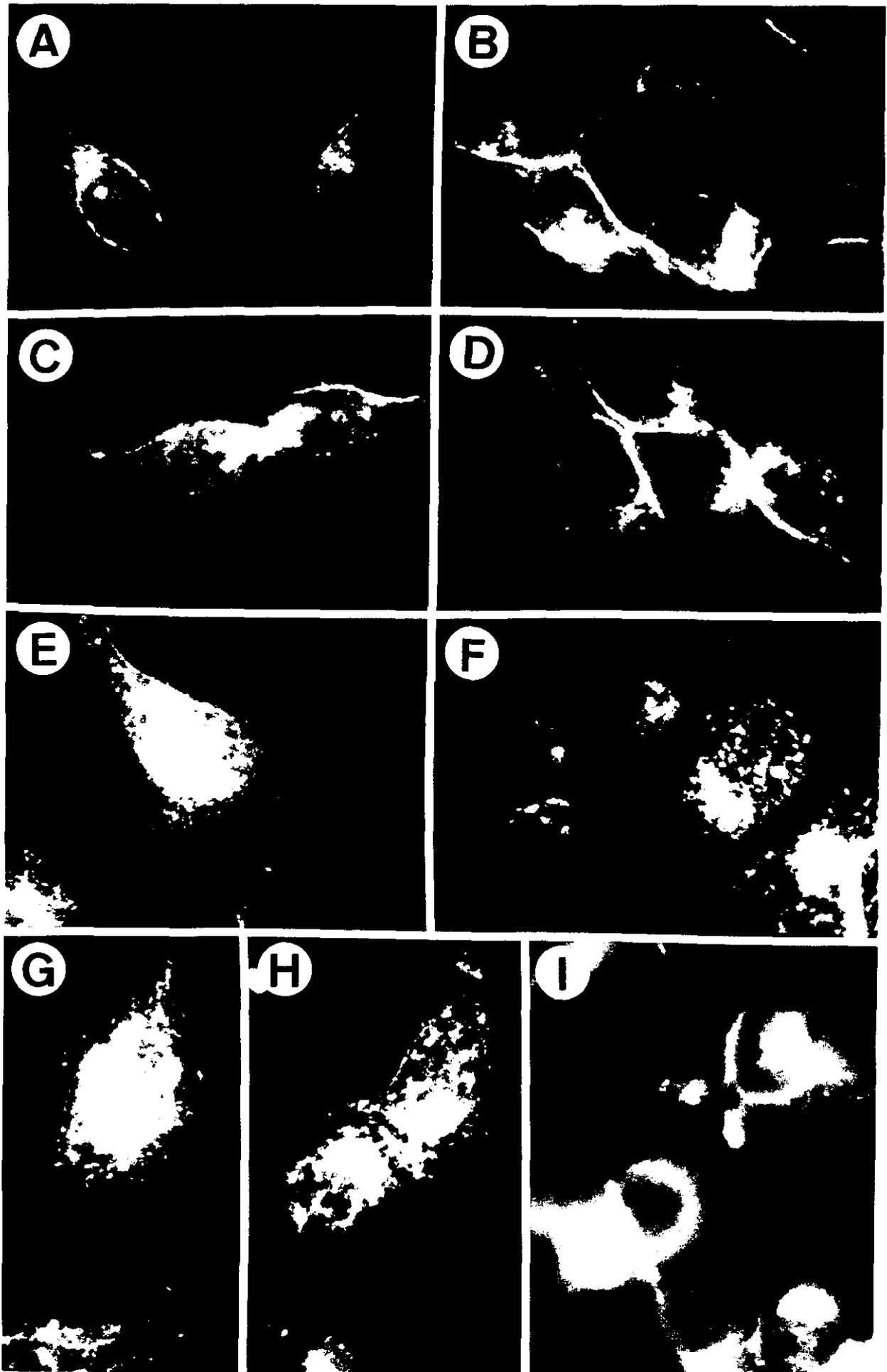
Distribución de la integrina β_1

Los resultados anteriormente presentados indican que la interacción de las células BCS-TC2 con la matriz extracelular está mediada por las integrinas de la familia β_1 . Por ello se ha planteado analizar, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, la

distribución de las integrinas que contienen la subunidad β_1 y la posible formación de contactos focales en células adheridas a laminina, fibronectina, colágeno de tipo I y colágeno de tipo IV.

La matriz extracelular puede modular la distribución de las integrinas, pero a tiempos de extensión cortos, cuando todavía no se ha sintetizado matriz propia. La proteína sobre la que se siembran las células determina el receptor que se agrupa en los contactos focales. Así, en los primeros momentos de la adhesión, cuando las células BCS-TC2 aún permanecen redondas, las integrinas β_1 se distribuyen por toda la superficie celular, sin ningún patrón definido. Transcurridas 4 horas, las células comienzan a extenderse sobre los sustratos y, a las 20 horas, cuando la mayor parte de las células están ya extendidas, las integrinas β_1 se distribuyen en las placas de adhesión focal que, de forma puntual, aparecen a lo largo de la periferia de la célula (Figura 33). Un comportamiento similar se ha observado en diferentes tipos celulares sobre estos sustratos (Ramos *et al.*, 1990; Clyman *et al.*, 1992; Gullberg *et al.*, 1992; Enomoto *et al.*, 1993). Esta localización en contactos focales periféricos indicaría que las integrinas β_1 son moléculas de anclaje de las células BCS-TC2 a la matriz. También se aprecia una tinción en regiones de contacto célula-célula, como se ha descrito para la integrina β_1 en queratinocitos (Nicholson y Watt, 1991) y en células epiteliales de mama (Berdichevsky *et al.*, 1992).

La distribución de β_1 en las células BCS-TC2 sembradas sobre colágenos es diferente del que presentan las células sobre laminina y fibronectina al mismo tiempo de ensayo. Sobre laminina y fibronectina es más intensa la tinción en los puntos de contacto célula-célula (Figura 33), aunque en todos los casos se aprecia tinción en zonas célula-sustrato y célula-célula. Una vez formadas y estabilizadas las uniones iniciales, disminuye el número de sitios de adhesión célula-sustrato y las integrinas se relocalizan en sitios de adhesión célula-célula (Dejana *et al.*, 1988; Lampugnani *et al.*, 1991). Es probable, por tanto, que sobre laminina y fibronectina se produzca la formación de los contactos focales de una manera más rápida, redistribuyéndose las integrinas β_1 y situándose preferentemente en contactos célula-célula. En células migratorias se ha descrito que los agregados de integrinas son altamente dinámicos y sufren un ciclo de formación y desagregación (Regen y Horwitz, 1992). La localización principalmente puntual y periférica de la integrina β_1 en células extendidas sobre laminina y fibronectina sugiere que la integrina β_1 pueda estar implicada, además de en la adhesión al sustrato, en la extensión y migración celular, donde se requieren unas interacciones transitorias. Sobre ambos tipos de colágenos se observa que la integrina β_1 se distribuye, además de en los contactos célula-célula y célula-sustrato, en toda la superficie celular en forma de proyecciones, por lo que estas integrinas β_1 principalmente estarían implicadas en el anclaje de la célula a la matriz (Akiyama *et al.*, 1990).



Fosforilación de proteínas en tirosina como respuesta a la interacción células BCS-TC2-ECM

La unión del ligando a la integrina se transmite hasta el dominio citoplasmático, que interacciona con moléculas intracelulares, iniciándose la transmisión de la señal. Esto constituye la tercera región de los contactos focales, denominada placa citoplasmática, formada por proteínas tales como paxilina, talina, vinculina, proteína quinasa C, tirosina quinasas (pp125^{FAK}, pp60^{v-src}), tensina, zysina, etc. (Lafrenie y Yamada, 1996). Como resultado de la interacción entre estas proteínas se produce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y la modificación de la concentración intracelular de calcio (Yamada y Miyamoto, 1995; Lafrenie y Yamada, 1996). Los ensayos de inmunofluorescencia muestran que la adhesión de las células BCS-TC2 a los diferentes sustratos de la ECM origina el agrupamiento de integrinas β_1 en los contactos focales y, por tanto, cabe esperar que se produzca la interacción de su dominio citoplasmático con moléculas intracelulares. Además, en la figura 33I se observa que la interacción de las células BCS-TC2 con sustratos de la ECM origina la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Así, durante la adhesión de las células se detectan proteínas fosforiladas en residuos de tirosina localizadas tanto en las zonas de contacto con el sustrato como en los contactos célula-célula.

Para identificar las proteínas que se fosforilan en tirosina, se analizaron por inmunodetección usando anticuerpos anti-fosfotirosina, extractos de células adheridas a diferentes tiempos sobre laminina, fibronectina y colágeno tipo I. Como control se analiza la fosforilación en células recién tripsinizadas o bien sembradas sobre plástico o polilisina. Las células sembradas sobre polilisina se adhieren pero no se extienden, ya que la adhesión tiene lugar por carga y es independiente de integrinas, y muestran unos niveles de fosforilación en residuos de tirosina similares o ligeramente superiores a los de las células recién tripsinizadas. Como se observa en la figura 34, la adhesión de las células a los diferentes sustratos origina un incremento en la fosforilación en tirosinas de proteínas respecto de las células recién tripsinizadas y mantenidas en suspensión. Este incremento es dependiente del tiempo de adhesión sobre los sustratos. Por todo ello, se puede considerar que la fosforilación de todas estas proteínas está mediada por las integrinas que participan en la interacción célula-matriz extracelular.

Se ha demostrado que un grupo de proteínas de masas moleculares comprendidas entre 105 y 130 kDa se fosforilan en tirosina en respuesta a la adhesión (Juliano y Haskill, 1993; Hamawy *et al.*, 1993). Entre estas proteínas se ha identificado la proteína denominada p130^{Cas} (Harte *et al.*, 1996), así como la pp125^{FAK} (Hanks *et al.*, 1992; Kornberg *et al.*, 1992; Schaller *et al.*, 1993). También se ha demostrado que la paxilina

(68-70 kDa) y la tensina (200 kDa) se fosforilan en tirosina después de la adhesión y la extensión sobre componentes de la matriz extracelular.

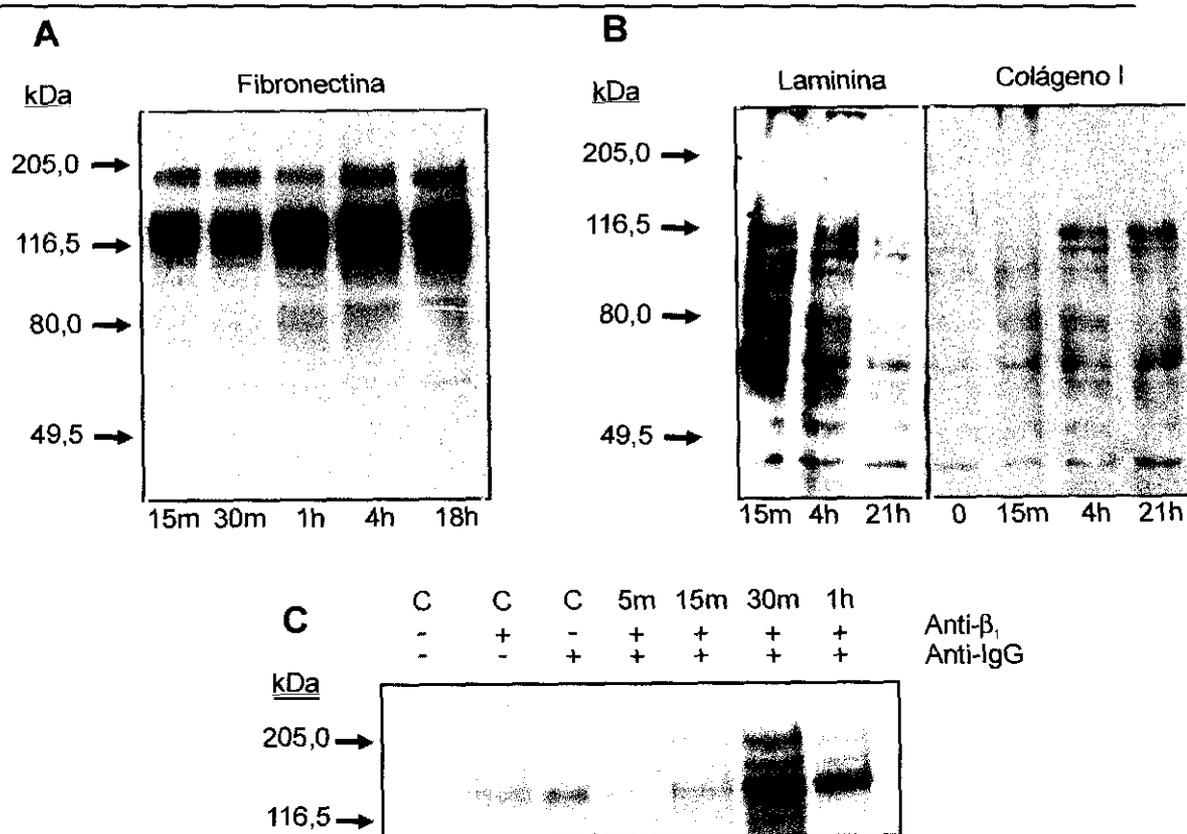


Figura 34.- Inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina tras la interacción celular con componentes de la ECM.

Las células BCS-TC2 se siembran sobre superficies saturadas con 10 µg/mL de LN, FN y Col I. A diferentes tiempos las células se recogen y los extractos celulares se someten a electroforesis e inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina (PY20; dilución 1:1000). Proteínas fosforiladas en tirosina en células adheridas a FN (A) y LN y colágeno tipo I (B) a diferentes tiempos. (C) Células BCS-TC2 se siembran sobre plástico y se incuban en presencia (+) o ausencia (-) de anticuerpos anti-β₁ (LIA1/2) o anti-IgG de ratón a los tiempos indicados, como se indica en Materiales y Métodos. En (A) y (B) se considera como control la fosforilación de proteínas en tirosinas en células recién tripsinizadas (0) y en (C) la fosforilación en ausencia de ambos anticuerpos, o en presencia exclusivamente de anti-β₁ o de anti-IgG, durante 30 minutos.

Como se observa en la figura 34A, en células sembradas sobre fibronectina la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina tiene lugar a tiempos cortos. Tras 15 minutos de adhesión se observa una banda intensa que corresponde a proteínas fosforiladas en tirosina de masas moleculares comprendidas entre 130 y 115 kDa. A este tiempo la mayor parte de las células están adheridas pero mantienen una morfología redondeada, sin

ningún indicio de extensión. Después de 4 horas de adhesión, cuando se alcanzan los niveles de fosforilación máximos, aproximadamente un 50% de las células aún presentan morfología redondeada. Los niveles de fosforilación se mantienen después de 20 horas, cuando todas las células están extendidas. Probablemente, entre las proteínas fosforiladas se encuentre la proteína de adhesión focal (pp125^{FAK}), de 125 kDa de masa molecular. Esta proteína, cuando se fosforila, es capaz de activar a otras tirosina quinasas implicadas en la transmisión de la señal. Además, aparece otra banda, de menor movilidad electroforética (200 kDa), cuya intensidad también se incrementa con el tiempo. Probablemente, por su masa molecular se trate de la tensina, ya que se ha descrito que esta proteína se fosforila en células adheridas sobre fibronectina (Bockholt y Burridge, 1993). Estudios con anticuerpos anti- α_4 y anti- α_5 han demostrado que la unión de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ a fibronectina estimula la fosforilación de proteínas de 105 y 120 kDa, entre ellas pp125^{FAK} (Nojima *et al.*, 1995). Además, la ocupación de $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ induce la fosforilación de pp125^{FAK} en células epiteliales y fibroblastos (Kornberg *et al.*, 1992; Vuori y Ruoslahti, 1993).

Cuando las células se siembran sobre laminina se produce una rápida fosforilación de la misma proteína de 125 kDa, alcanzándose los niveles máximos a 15 minutos de adhesión. Estos niveles se mantienen tras 4 horas de adhesión a laminina (Figura 34B). Estos resultados sugieren que la adhesión de las células BCS-TC2 a laminina y fibronectina induce la fosforilación de la proteína pp125^{FAK} de manera dependiente del tiempo. Esto se ha observado también en células KB y en fibroblastos adheridos sobre estos mismos sustratos (Burridge *et al.*, 1992; Kornberg *et al.*, 1992). Además, la fosforilación en tirosinas es un proceso relativamente rápido e independiente de la extensión celular. Sobre laminina y fibronectina la fosforilación precede a la extensión celular, lo que implica una correlación entre la transmisión de la señal y los cambios morfológicos, como se ha descrito en otros sistemas de estudio (Kornberg *et al.*, 1992).

En la figura 34B también se recoge el patrón de proteínas fosforiladas cuando las células se adhieren a colágeno de tipo I. La aparición de la banda de proteína fosforilada de 125 kDa (pp125^{FAK}) requiere un mayor tiempo que sobre fibronectina o laminina, no detectándose a los 15 minutos pero sí 30 minutos después de la siembra. La fosforilación de esta proteína se incrementa con el tiempo, alcanzándose el máximo después de 21 horas de adhesión cuando la práctica totalidad de las células presentan una morfología extendida sobre colágeno de tipo I. En la detección de integrinas por inmunofluorescencia se ha comentado que, probablemente, la formación de contactos focales sobre colágeno tenga lugar más lentamente, lo que justificaría el retraso observado en la fosforilación de pp125^{FAK}. Se ha descrito que la adhesión de fibroblastos a colágeno de tipo I produce fosforilación en tirosinas de proteínas, entre ellas pp125^{FAK}, sólo cuando las células

presentan una morfología extendida, no siendo suficiente la adhesión celular (Roedel y Krieg, 1994). Sin embargo, la adhesión de plaquetas a colágeno a través de la integrina $\alpha_2\beta_1$ produce la rápida fosforilación de pp125^{FAK} (Polanowska-Grabowska *et al.*, 1993).

En todos los casos el incremento en los niveles de fosfotirosina observado se induce por la adhesión y extensión celular, pero no por desunión de las células de la ECM, como se desprende de los niveles obtenidos con las células control recién tripsinizadas. Este resultado sugiere que la fosforilación en tirosina está implicada en el ensamblaje del citoesqueleto más que en el desensamblaje.

Los resultados obtenidos sugieren que la fosforilación en tirosina de las proteínas tensina y pp125^{FAK} se induce por interacción con la matriz extracelular (a través de integrinas) y es responsable de la formación de contactos focales y de la extensión de las células BCS-TC2.

Fosforilación de proteínas en tirosina como respuesta al agrupamiento de integrinas

La adhesión celular a laminina, fibronectina y colágeno de tipo I está mediada por las integrinas $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$, respectivamente. Sin embargo, en todos los casos se induce la fosforilación de pp125^{FAK}, lo que sugiere que la unión del ligando a la correspondiente integrina puede activar la misma tirosina quinasa, como también han sugerido otros autores (Bockholt y Burridge, 1993). El estímulo inicial para la fosforilación se ha propuesto que es el agrupamiento de integrinas, proceso clave en la formación de los contactos focales, que puede ser inducido cuando las células se incuban con anticuerpos anti-integrinas (Kornberg *et al.*, 1992). Puesto que en todos los casos participa la subunidad β_1 de la integrina, se ha estudiado el efecto del agrupamiento de integrinas β_1 sobre la fosforilación de residuos de tirosinas. El agrupamiento se puede inducir por incubación con anticuerpos anti- β_1 , que simula la ocupación de la integrina, seguido de la incubación con el anti-IgG de ratón. Como se puede observar en la figura 34C, este tratamiento estimula la fosforilación de proteínas de 125 kDa de manera dependiente del tiempo de incubación con los anticuerpos. El máximo efecto en la fosforilación ocurre cuando tienen lugar tanto la ocupación como el agrupamiento de las integrinas. En otros tipos celulares también se ha descrito que el agrupamiento de integrinas β_1 incrementa la fosforilación de proteínas de 115-130 kDa, entre ellas la pp125^{FAK} (Kornberg *et al.*, 1991,1992).

Modificación de los niveles de Ca²⁺ intracelular

Otro de los aspectos analizados como resultado de la interacción de las células BCS-TC2 con la matriz extracelular es la modificación de los niveles de calcio intracelular. Para ello se introduce en las células una sonda fluorescente que incrementa su fluorescencia al

quelar calcio. De esta manera, la intensidad de fluorescencia es indicativa de los niveles de calcio intracelular. La interacción de las células mantenidas en suspensión con fibronectina no origina una modificación significativa de los niveles de calcio intracelular. Se requieren tiempos de ocho minutos de interacción con esta proteína para apreciar un ligero incremento en dichos niveles, no observándose una dependencia con la concentración de fibronectina utilizada (Figura 35). Sin embargo, la interacción de las células con laminina origina, tan solo después de un minuto, un incremento del calcio intracelular que es dependiente de la concentración de laminina (Figura 35). En este caso, los niveles decaen con el tiempo una vez alcanzado el máximo. Al estudiar el efecto de la interacción con colágeno de tipo I sólo se observa una ligera variación, existiendo dos poblaciones celulares que responden de diferente manera a la interacción con esta proteína.

Las variaciones observadas en los niveles de calcio intracelular no son muy significativas, incrementándose la señal de manera muy acusada si se incubaba con un ionóforo. En otros casos, el incremento detectado es mayor, por ejemplo, cuando hepatocitos en suspensión se incubaban con anticuerpos anti-integrinas (α_2 , α_6 y β_1) (Nebe *et al.*, 1995).

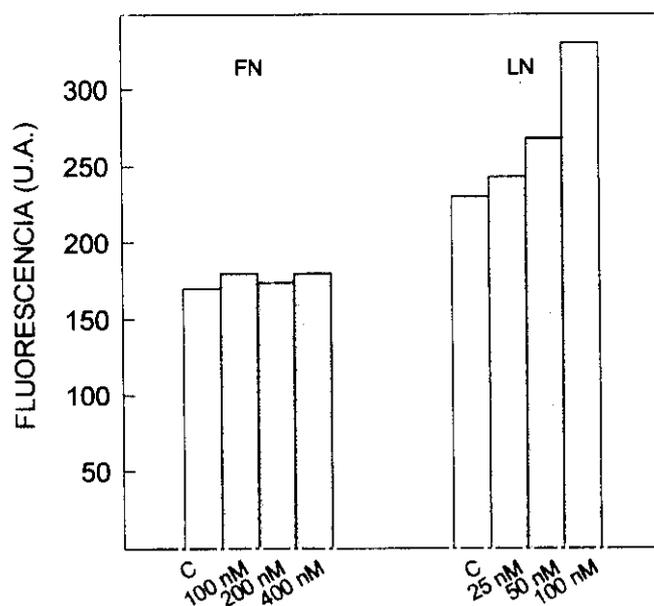


Figura 35.- Niveles de calcio intracelular en células BCS-TC2 después de la interacción con componentes de la matriz.

Las células en suspensión se marcan con la sonda *Calcium Green* y se incuban con distintas concentraciones de fibronectina o laminina a diferentes tiempos. La medida del incremento en la fluorescencia debido a cambios en los niveles de calcio con respecto al control (células en ausencia de componente de la matriz) se realiza por citometría de flujo. En la figura se representa la fluorescencia registrada tras ocho minutos de incubación con fibronectina o tras un minuto de incubación con laminina. U.A., unidades arbitrarias de fluorescencia.

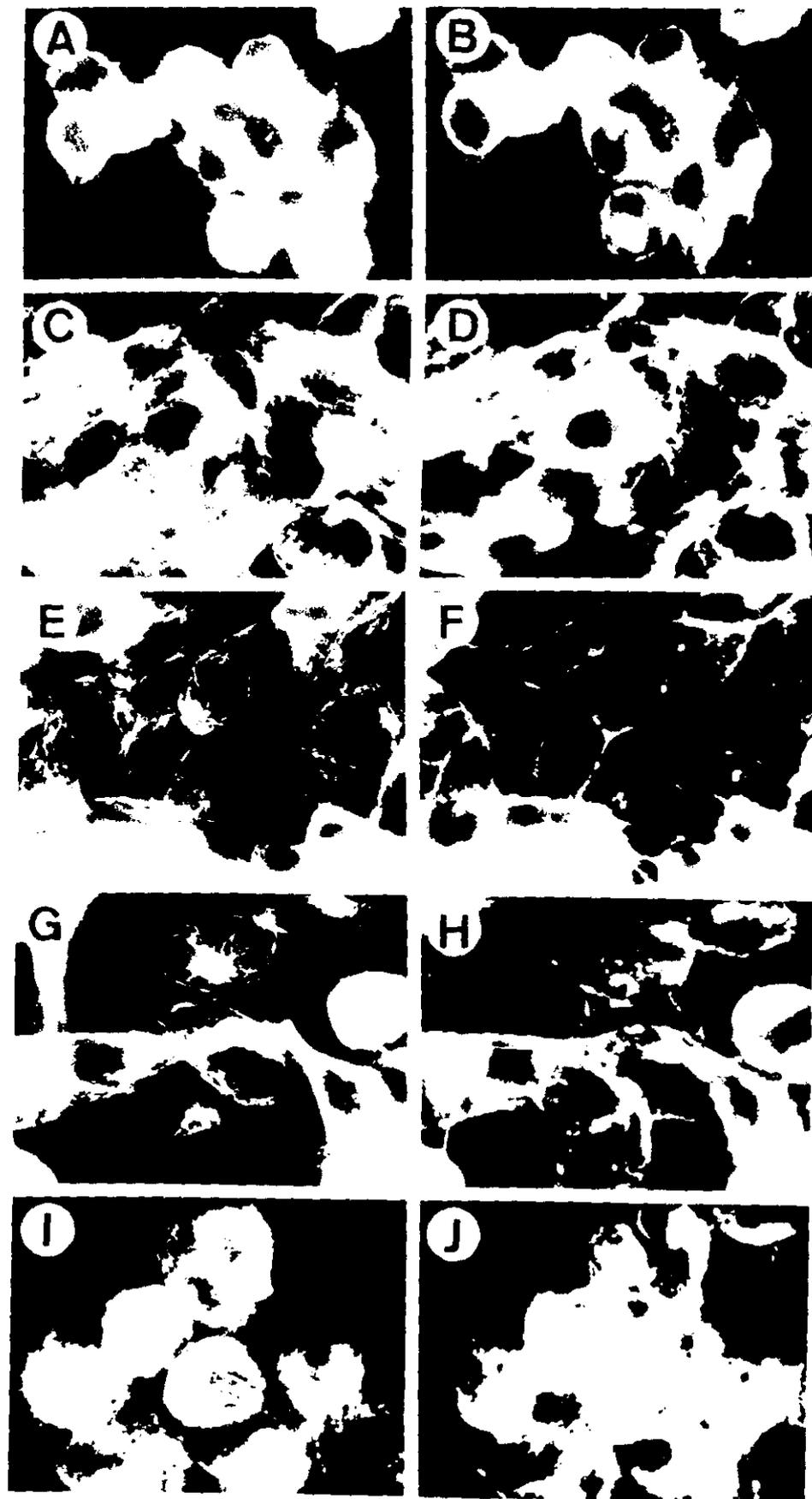
Los ensayos anteriormente comentados se han realizado con células recogidas por tripsinización y mantenidas en suspensión. Para determinar si en la monocapa las integrinas participan en las modificaciones del calcio intracelular, se han realizado estudios por microscopía confocal, sembrando células sobre los diferentes sustratos y registrándose las variaciones con la extensión celular. En este caso no se detecta una movilización rápida del calcio, por lo que dicha movilización parece depender de la extensión y no de la adhesión celular, a semejanza de lo que ocurre con células endoteliales HUVEC extendiéndose sobre fibronectina y vitronectina (Schwartz, 1993).

Organización del citoesqueleto

Todos estos resultados indican que la adhesión de las células a la ECM origina el agrupamiento de integrinas y la interacción de su dominio citoplasmático con moléculas intracelulares induciendo la formación de los contactos focales y la transmisión de la señal. El cuarto dominio de los contactos focales es la red de microfilamentos. Estos constan de actina y proteínas asociadas tales como α -actinina y miosina. Por tanto, se ha analizado si la adhesión de las células BCS-TC2 a distintos componentes de la ECM influye sobre la organización del citoesqueleto.

Cuando las células BCS-TC2 crecen sobre superficies de vidrio no se produce la organización de redes fibrilares de tubulina o actina (Figura 36A,B). Se observa una condensación de la tubulina en placas en los contactos célula-célula, mientras que la actina se localiza principalmente en la periferia celular, exhibiendo una tinción punteada y discontinua. Por tanto, el citoesqueleto de estas células está poco organizado reflejo, probablemente, de la transformación maligna. Esta falta de organización del citoesqueleto se asocia normalmente con las propiedades invasivas de células tumorales, como su alta motilidad, adaptabilidad y velocidad de proliferación incrementada (Decloitre *et al.*, 1991), y coincide con lo ya observado en células epiteliales de colon humanas (Olive *et al.*, 1993).

En las células BCS-TC2 sólo se detectan los microfilamentos de actina cuando éstas crecen sobre colágeno de tipo I o laminina (Figura 36D,J), aunque no se observa una clara organización en fibras de tensión. Sin embargo, otros sustratos, que también promueven la adhesión y extensión celular, no inducen la organización de la actina. En este sentido se ha descrito un efecto específico del colágeno de tipo I sobre la organización de las fibras de actina en otras células tumorales (Luparello *et al.*, 1991). Por otro lado, todos los sustratos inducen la organización de microtúbulos. El patrón de tinción de la tubulina muestra una fina red de filamentos distribuida radialmente por todo el citoplasma a partir del área perinuclear (Figura 36). Así, los microtúbulos podrían estar implicados en la transmisión de señales tras la interacción de las células con los componentes de la ECM.



3.4. INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN EL FENOTIPO TUMORIGÉNICO DE LAS CÉLULAS BCS-TC2

3.4.1. INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA

La capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2 es prácticamente nula, como se observó tanto por estudios *in vitro* como *in vivo*. Estas células presentan una baja capacidad para formar colonias (eficacia de formación de colonias del 22% en medio líquido a baja densidad, y del 2% en agar). Además, estudios previos indican que presentan una casi nula capacidad tumorigénica *in vivo*, incluso cuando se inyecta un gran número de células en ratones atímicos (Turnay *et al.*, 1990).

Estas células epiteliales y poco diferenciadas, que *in vitro* responden a componentes de la matriz extracelular, pueden constituir un buen modelo para el estudio del efecto de la ECM sobre el comportamiento *in vivo* de células malignas. Teniendo en cuenta que la proliferación y la diferenciación celular dependen de las interacciones con la matriz extracelular y, en el caso de las células epiteliales, con los basamentos membranosos, se propuso inicialmente estudiar la posible influencia del matrigel sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2. El matrigel es un basamento membrano reconstituido obtenido del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Sus principales componentes son: laminina, colágeno de tipo IV, proteoglicanos de tipo heparán sulfato, entactina, fibronectina, plasminógeno, factores de crecimiento propios del tumor EHS, tales como TGF- β , FGF, EGF, PDGF e interleuquina IL-1 (Kleinman *et al.*, 1982 y 1986; Vukicevic *et al.*, 1992b; Farina *et al.*, 1996).

El matrigel se ha utilizado para determinar la implicación de las interacciones ECM-célula tumoral en la estimulación del crecimiento, en la diferenciación celular, invasión y metástasis, así como en el proceso angiogénico (Albini *et al.*, 1992; Vukicevic *et al.*, 1992a,b; Noel *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1994). Se ha descrito que la coinyección subcutánea con matrigel incrementa el crecimiento *in vivo* de una gran variedad de tipos celulares, entre ellos células de carcinoma de pulmón y de próstata humana y de adenocarcinoma de mama y de colon (Fridman *et al.*, 1990; Passaniti *et al.*, 1992; Topley *et al.*, 1993).

Efecto del matrigel en la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2

El efecto que el matrigel ejerce sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2 *in vivo* se ha estudiado inyectando subcutáneamente en ratones atímicos diferente

número de células en presencia o ausencia de matrigel. A la dosis más baja, 250.000 células/ratón, no se observa formación de tumores en ninguno de los ratones inyectados únicamente con células. Cuando el número se incrementa a 1×10^6 células/ratón, sólo en un experimento se apreció la formación de tumores, siendo la incidencia total del 6% (5 de 82 ratones). Estos resultados verifican que las células BCS-TC2 presentan una capacidad tumorigénica prácticamente nula. Otras líneas celulares, procedentes también de adenocarcinoma de colon (WiDr, SW480 y HT29) son, por sí solas tumorigénicas y los valores de incidencia son del 90-100%. En determinados casos, como ocurre con las células SW480, el crecimiento del tumor es muy lento, desapareciendo los tumores a los 50 días (Varner *et al.*, 1992; Topley *et al.*, 1993).

Como se puede apreciar en la figura 37, la coinyección de las células con matrigel incrementa de manera significativa la capacidad tumorigénica de las células.

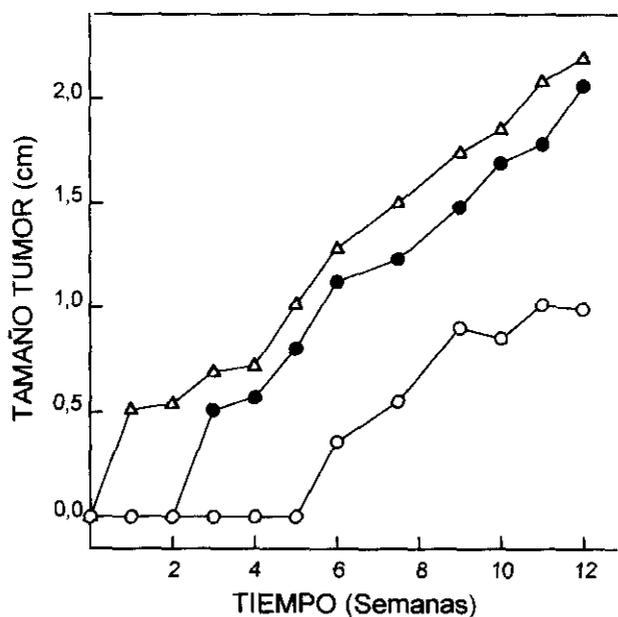


Figura 37.- Efecto del matrigel sobre el crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2.

El efecto del matrigel sobre la tumorigenicidad de las células BCS-TC2 se estudia por inyección subcutánea en ratones atómicos. La velocidad de crecimiento de los tumores se analiza después de la inyección de 1×10^6 células solas (○), o en presencia de 0,6 mg (●) o 1,2 mg (Δ) de matrigel por ratón. El tamaño de los tumores se determina a los tiempos indicados. Los valores control corresponden al valor medio del tamaño de los 5 tumores obtenidos en los 82 ratones inyectados únicamente con células BCS-TC2. El efecto del matrigel se determina en tres experimentos distintos, en cada uno de los cuales se utilizan de 6 a 8 ratones. Los datos representan los valores medios. El error experimental es inferior al 10%.

El matrigel produce un incremento considerable tanto en la incidencia como en la velocidad de crecimiento del tumor de células BCS-TC2 cuando se compara con los

controles. La incidencia es del 100% para cualquiera de las concentraciones de matrigel estudiadas y se produce una disminución en el período de latencia (Tabla VIII). El efecto del matrigel es dependiente de la dosis, observándose una disminución en el período de latencia cuando se incrementa la cantidad de matrigel inyectada (Tabla VIII).

Tabla VIII. Efecto de la dosis de matrigel sobre el crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2.

Tratamiento	Incidencia	Tamaño tumor (cm)	Tiempo latencia (semanas)
Ninguno	5(82) 6%	1,24 ± 0,25	5-6
Matrigel 0,6 mg	18(18) 100%	2,06 ± 0,53	2-3
Matrigel 1,2 mg	18(18) 100%	2,19 ± 0,70	1

Se inyectan 1×10^6 células subcutáneamente en ratones atímicos en ausencia (ninguno), o en presencia de 0,6 mg o 1,2 mg de matrigel. El tamaño del tumor se determina 12 semanas después de la inoculación de las células, como se describe en Materiales y Métodos.

Estos experimentos ponen de manifiesto la estimulación del crecimiento que ejerce el matrigel *in vivo* sobre las células BCS-TC2 ya que, incluso cuando se inyecta una concentración baja de células ($2,5 \times 10^5$ células/ratón), se produce la formación de tumores con una incidencia del 100%. En ninguno de los ratones en los que se desarrollaron tumores se observaron visualmente metástasis en órganos internos, lo que sugiere una limitada capacidad de las células malignas del tumor primario para extravasarse a la circulación.

Puesto que el matrigel promueve o incrementa considerablemente la tumorigenicidad de las células BCS-TC2, se procedió a estudiar el efecto de este extracto de basamentos membranosos sobre la tumorigenicidad de las células HT-29, también procedentes de un adenocarcinoma de colon, pero con capacidad tumorigénica intrínseca. La incidencia de formación de tumores para las células HT-29 solas es del 100% (Varner *et al*, 1992). A los ratones se les inyectan subcutáneamente 1×10^6 células HT-29 en presencia de matrigel. Después de 4 semanas todos los ratones inyectados con células HT-29 (4/4) presentan tumores, cuyo tamaño es aproximadamente 3 veces superior al de los obtenidos cuando se inyectan las células BCS-TC2 en presencia de matrigel (Tabla IX).

De los resultados obtenidos se puede concluir que el matrigel induce la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2. El matrigel produce este mismo efecto en otras células no tumorigénicas, como fibroblastos, células de retinoblastoma y células SCLC de

carcinoma de pulmón (Sweeney *et al.*, 1991; Albini *et al.*, 1992; Fridman *et al.*, 1992). Por otro lado, el matrigel puede acelerar el crecimiento tumoral en células con tumorigenicidad intrínseca, como ocurre en el caso de las células HT-29. Así se ha descrito que el matrigel puede incrementar la tumorigenicidad o la velocidad de crecimiento tumoral y el tamaño de los tumores en células procedentes de distintos tipos de carcinomas humanos y células B16F10 de melanoma de ratón (Fridman *et al.*, 1991; Sweeney *et al.*, 1991; Topley *et al.*, 1993).

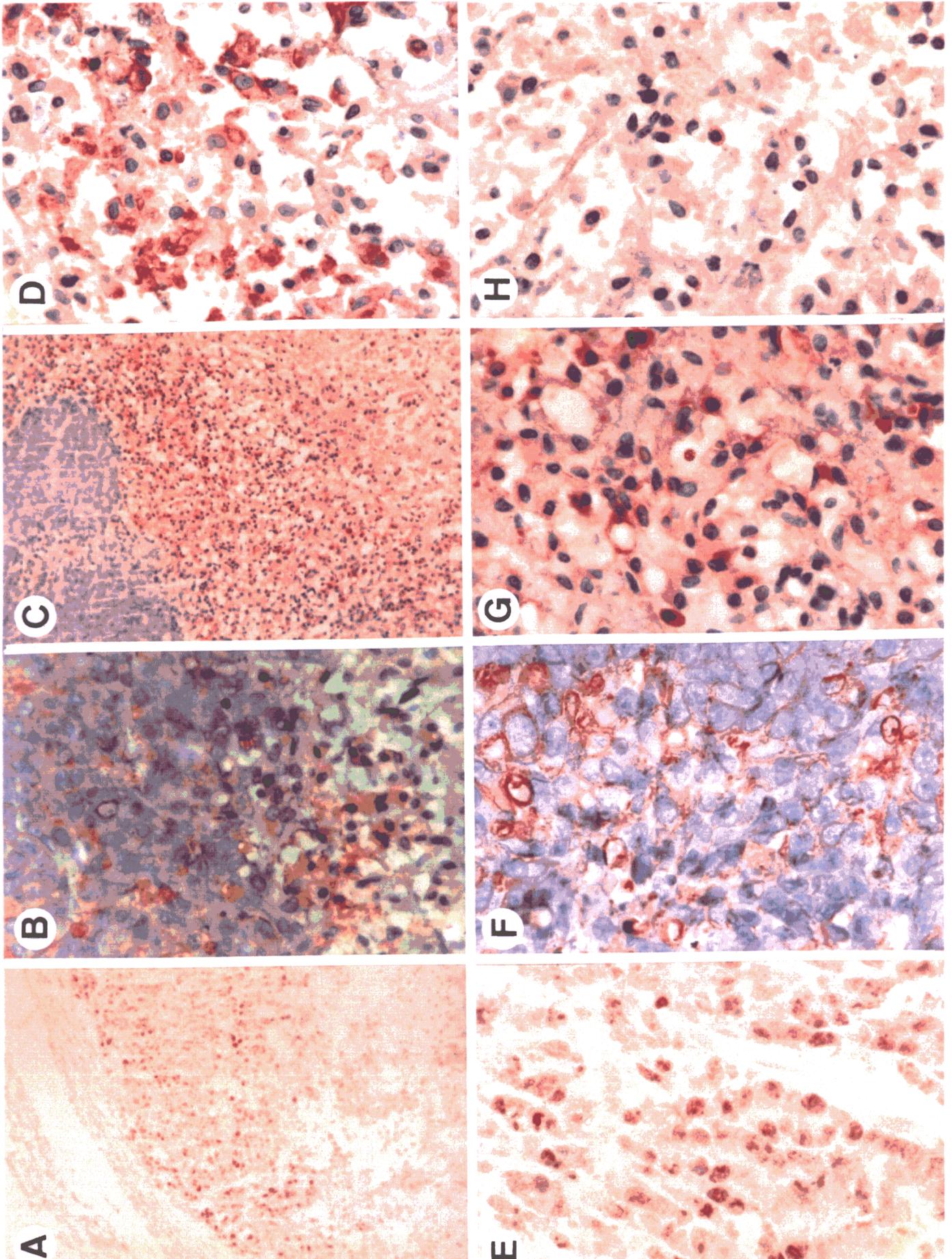
Tabla IX. Comparación de la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2 y HT-29

Línea celular	Incidencia	Tamaño tumor (cm)
BCS-TC2 + MG	5(5) 100%	0,38 ± 0,22
HT-29 + MG	5(5) 100%	1,14 ± 0,68

Se inyectan 1×10^6 células subcutáneamente en ratones atímicos en presencia de 0,6 mg de matrigel (+MG). El tamaño del tumor se determina 4 semanas después de la inoculación de las células, como se describe en Materiales y Métodos.

Las células coinyectadas con matrigel forman tumores sólidos rodeados por una membrana que los encapsula. La observación visual de estos tumores muestra una extensa vascularización externa. En tumores de gran tamaño la parte central, donde no llegan los vasos sanguíneos, presenta una zona de tejido necrótico y edema. El análisis inmunohistoquímico de los tumores muestra la existencia de dos regiones, una externa, celular y compacta, y un área interna con menos células y más diseminadas. En la parte externa de estos tumores, las células están asociadas fuertemente y presentan actividad proliferativa, como se deduce de la tinción positiva obtenida con anticuerpos anti-67-Ki (frente al antígeno nuclear expresado preferentemente por células en división) (Figura 38). Estas células también se tiñen positivamente con el anticuerpo anti-citoqueratinas AE1, pero no con el AE3 (que reconoce citoqueratinas expresadas por células epiteliales diferenciadas) ni con anticuerpo anti-CEA, lo que sugiere un bajo grado de diferenciación celular. Por el contrario, las células de la zona interior de los tumores parecen ser menos proliferativas, ya que no se tiñen con anticuerpos anti-67-Ki, pero son aparentemente más diferenciadas, ya que dan reacción positiva con los anticuerpos anti-AE3 y anti-CEA. Los estudios muestran que los tumores están formados por células de origen epitelial como se observa en la tinción con marcadores específicos para células epiteliales (AE1 y AE3).

La apariencia histológica, morfológica y los datos inmunohistoquímicos de los tumores desarrollados en los ratones en presencia de matrigel son indistinguibles de los obtenidos esporádicamente tras la inyección de las células BCS-TC2 solas.



Efecto de distintos componentes del matrigel sobre la proliferación tumoral

Aunque diferentes estudios han puesto de manifiesto que el matrigel promueve la formación de tumores *in vivo*, aún se desconoce cómo ejerce este efecto. Se ha sugerido que puede ser debido a las características físicas del matrigel, ya que éste adquiere consistencia de gel a 37°C cuando está lo suficientemente concentrado. El matrigel podría actuar como barrera protegiendo a las células inoculadas de las células NK (*natural killer*) del ratón (Albini *et al.*, 1992; Topley *et al.*, 1993). Además, se ha postulado que el matrigel podría mantener a las células agrupadas en pequeñas áreas lo que permitiría una influencia mayor de los factores de crecimiento. De esta manera, las células dispondrían de un microentorno adecuado para la proliferación celular, estimulándose el crecimiento tumoral.

Para determinar si el efecto del matrigel se debe sólo a que las células se inyectan embebidas en un gel, se han realizado dos aproximaciones distintas. Se ha comparado su efecto con el de un gel formado por otro componente de la matriz extracelular, el colágeno de tipo I. Como se recoge en la tabla X, el gel de colágeno no induce la formación de tumores en ninguno de los ratones inyectados. Por otro lado, se han empleado bajas concentraciones de matrigel, a las cuales no se produce la formación de gel, e incluso a estas concentraciones se favorece el crecimiento tumoral. Estos datos indican que el efecto mediado por el matrigel no es debido a sus propiedades físicas, sino que se debe a algún componente específico del mismo. En este sentido se ha descrito que un coágulo de fibrina, que *in vitro* protegía a las células humanas de la actividad citotóxica de las células NK (Gunji y Gorelik, 1988), no favorece el crecimiento de células *in vivo* inyectadas sólo con medio (Passaniti *et al.*, 1992; Topley *et al.*, 1993). Por otro lado, células no tumorigénicas de retinoblastoma inyectadas en ratones inmunosuprimidos (deficientes en células NK, T y B) no son capaces de crecer, y sólo forman tumores cuando se coinyectan con matrigel sin que exista diferencia en la velocidad de crecimiento con respecto a la de tumores desarrollados en ratones atímicos (Albini *et al.*, 1992).

El matrigel contiene factores de crecimiento (Vukicevic *et al.*, 1992a,b), y éstos podrían ser los responsables del incremento en la capacidad tumorigénica de las células. Por lo tanto se analizó la influencia que tiene la reducción de estos componentes sobre el crecimiento tumoral coinyectando las células con matrigel, tratado previamente para eliminar las proteínas de baja masa molecular y los factores de crecimiento (*matrigel low*) (Vukicevic *et al.*, 1992b). Como se aprecia en la tabla X, en todos los casos el matrigel bajo en factores de crecimiento induce la formación de tumores, siendo estos sólo ligeramente más pequeños que los obtenidos con matrigel. La diferencia más significativa consiste en un aumento del tiempo de latencia respecto del obtenido en presencia de matrigel. El período de latencia es dependiente de la dosis de *matrigel low* utilizada, como

se observa en la figura 39. Estos resultados indican que los factores de crecimiento presentes en el matrigel no son los responsables del efecto observado. Sin embargo, es probable que los factores de crecimiento participen de algún modo en las etapas iniciales de la formación del tumor, lo que origina que, en ausencia de ellos, se produzca un incremento de la fase de latencia, lo que se correlaciona con una ligera disminución del tamaño de los tumores 12 semanas después de la inyección.

Tabla X. Efecto del matrigel y de componentes de la matriz extracelular sobre el crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2.

Tratamiento	Incidencia	Tamaño tumor (cm)	Tiempo de latencia (días)
Ninguno	0 (8)	---	---
Matrigel	6 (6)	1,98 ± 0,57	10
Matrigel <i>low</i>	6 (6)	1,58 ± 0,61	12
Gel de colágeno tipo I	0 (8)	---	---
Colágeno de tipo IV	0 (8)	---	---
Colágeno de tipo V	0 (8)	---	---
Laminina	8(10)	1,19 ± 0,28	10

1x10⁶ células se inyectan en ratones atímicos en ausencia (ninguno) o en presencia de matrigel o diferentes componentes de la matriz extracelular. Las células se inoculan con dosis de 0,4 mg de matrigel, matrigel *low*, laminina, o empleando dos dosis diferentes de colágenos, 1,25 y 2 mg. El tamaño del tumor se determina 12 semanas después de la inyección de las células como se detalla en Materiales y Métodos.

Puesto que los factores de crecimiento presentes en el matrigel no son los principales responsables del crecimiento tumoral inducido por matrigel, se analizó el efecto de la coinyección de las células BCS-TC2 con laminina y diversos tipos de colágeno (tipos I, IV y V). Los resultados se recogen en la tabla X y ponen de manifiesto que ninguno de los colágenos analizados, a las dosis estudiadas, promueven la formación de tumores. El colágeno tampoco incrementa el crecimiento tumoral de células de carcinoma de pulmón ni de carcinoma de próstata (Sweeney *et al.*, 1991; Fridman *et al.*, 1991; Passaniti *et al.*, 1992). Sin embargo, la coinyección de células con laminina pura, incluso a concentraciones muy bajas, incrementa considerablemente la capacidad de formación de tumores de las células BCS-TC2. La coinyección de células con esta proteína origina tumores en el 80% de los ratones con un tiempo de latencia inferior a dos semanas. Los tumores desarrollados en presencia de laminina son de menor tamaño que los originados por matrigel (Tabla X).

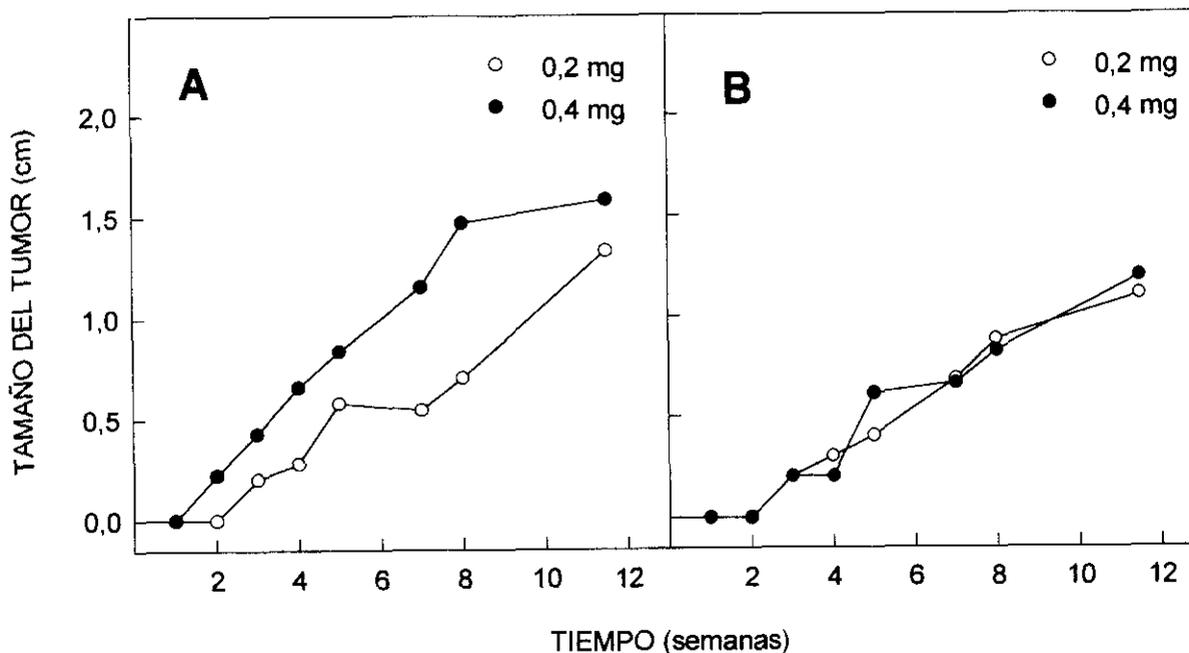


Figura 39.- Crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2 en presencia de matrigel bajo en factores de crecimiento (matrigel *low*) y en presencia de laminina.

Las células (1×10^6) se mezclan con 0,2 o 0,4 mg de matrigel *low* (A) o laminina (B), y se inyectan subcutáneamente en ratones atímicos. El tamaño de los tumores se mide como se detalla en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron 3 veces utilizando en cada uno de ellos de 3 a 4 ratones. Los datos representan el valor medio de dichos experimentos. El error experimental es inferior al 10%.

Por tanto, los resultados demuestran que la matriz extracelular induce la tumorigenicidad de las células BCS-TC2, y parece que la laminina es la principal molécula responsable, aunque no se puede excluir la influencia de otros componentes como factores de crecimiento, proteoglicanos o proteasas, que pueden incrementar el efecto de la laminina.

La función de la laminina intacta como inductora del crecimiento tumoral *in vivo* ha sido descrita en muy pocos casos: en células WiDr de adenocarcinoma de colon humano y en células A253 (carcinoma submandibular) o A549 (carcinoma de pulmón) (Topley *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1994). En la mayor parte de los estudios en que se han coinyectado células con laminina no se ha incrementado el crecimiento tumoral (Fridman *et al.*, 1990, 1992; Albin *et al.*, 1992; Vukicevic *et al.*, 1992b). Este hecho se ha explicado considerando que sólo la laminina purificada, libre de entactina, origina el desarrollo de tumores, mientras que el complejo laminina-entactina no tiene ningún efecto sobre el crecimiento tumoral (Topley *et al.*, 1993). Sin embargo, en otros sistemas, la coinyección con laminina pura no ha favorecido el crecimiento tumoral. Esto ha intentado explicarse considerando la naturaleza soluble de la laminina, que presenta una mayor susceptibilidad

a su degradación *in vivo*, mientras que el matrigel es insoluble y puede persistir intacto durante largos períodos de tiempo (Fridman *et al.*, 1990).

El mecanismo a través del cual la laminina o el matrigel ejercen su efecto no se conoce, aunque se han sugerido diferentes posibilidades, como: a) proporciona interacciones específicas célula-matriz que incrementan el crecimiento y la supervivencia celular en los estadios iniciales de la progresión tumoral a través de mecanismos como la supresión de la apoptosis (Fridman *et al.*, 1990; Passaniti *et al.*, 1992; Fisher, 1994); b) incrementa la supervivencia celular por selección de una subpoblación más resistente dentro de la población heterogénea original (Fridman *et al.*, 1991, 1992); c) induce la liberación de factores de crecimiento que incrementan la viabilidad de las células tumorales (Fridman *et al.*, 1992; Vukicevic *et al.*, 1992b; Noel *et al.*, 1993); y d) induce la angiogénesis (Fridman *et al.*, 1992; Bonfil *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995). Estas distintas posibilidades no son excluyentes y su importancia relativa depende, probablemente, del tipo de célula tumoral del que se trate y de distintos factores del organismo u órgano invadido.

La laminina estimula la proliferación en líneas celulares establecidas, actividad que parece deberse a las repeticiones de tipo EGF presentes en la glicoproteína (Figura 3). La región de la laminina que contiene dichas secuencias es accesible a las células solamente cuando el basamento membranoso ha sido dañado o no está intacto (Panayotou *et al.*, 1989). Así se piensa que la coinyección de células con laminina purificada puede imitar esta situación causando, de este modo, un incremento de la proliferación celular. La laminina incrementa la adhesión y la proliferación *in vitro* de las células BCS-TC2, como se ha comentado anteriormente (Figura 13 y 20). Sin embargo, estos mecanismos no deben ser los únicos implicados en la inducción de la tumorigenicidad, ya que otras moléculas de la matriz como colágenos de tipo I y IV, también originan un efecto similar *in vitro* (Figura 13 y 20), pero no inducen la tumorigénesis *in vivo*. Hay que tener en cuenta que esta situación es compleja y que en este comportamiento pueden intervenir otros factores, como las interacciones con proteínas del huésped.

La observación visual de los tumores inducidos por matrigel muestra que éstos están vascularizados, lo que sugiere que se ha producido un proceso de angiogénesis. Este efecto puede ser debido a la capacidad que tiene el matrigel para prevenir la degradación de factores de crecimiento (FGF y TGF- β), que presentan actividad angiogénica (Folkman y Klagsburn, 1987). Por otro lado, las células que rodean al matrigel, o las que se encuentran en su interior, pueden secretar factores angiogénicos o afectar al matrigel de modo que, en su procesamiento *in vivo*, se liberen péptidos angiogénicos. De esta manera los nuevos capilares favorecerían el crecimiento de las células coinyectadas con matrigel desde el inicio favoreciendo su supervivencia y promoviendo su proliferación (Bonfil *et al.*, 1994).

Efecto de distintos péptidos de reconocimiento celular sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2

Dentro de la molécula de laminina existen diferentes secuencias, como -YIGSR- e -IKVAV-, que son reconocidos por las células y que influyen en su capacidad tumorigénica. Péptidos que contienen la secuencia -IKVAV- son angiogénicos e incrementan la vascularización, el crecimiento tumoral y la metástasis (Sweeney *et al.*, 1991; Kibbey *et al.*, 1992). Se ha postulado que el sitio SIKVAV de la laminina puede quedar expuesto debido a la proteólisis del matrigel por las células del estroma (Kibbey *et al.*, 1992). Por otro lado, péptidos que contienen la secuencia -YIGSR- presente en la cadena β de la laminina, inhiben la angiogénesis y, por tanto, reducen la metástasis y el crecimiento de tumores subcutáneos (Yamamura *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996).

Con objeto de confirmar si el efecto de la laminina sobre el crecimiento celular está relacionado con propiedades angiogénicas, se iniciaron los estudios encaminados a determinar el efecto que estos péptidos tienen sobre la capacidad tumorigénica de las células. Además, se ha comprobado el efecto producido por péptidos que contienen la secuencia -RGD- que es reconocida por receptores celulares de adhesión a la matriz extracelular. La coinyección subcutánea de células BCS-TC2 con el péptido GRGDSP no influye en la capacidad tumorigénica de las células, puesto que no se observa aparición de tumor en ninguno de los ratones inyectados.

Para comprobar el efecto del péptido CDPGYIGSR se coinyectaron subcutáneamente células BCS-TC2 con matrigel en presencia o en ausencia del péptido CDPGYIGSR. Como se observa en la figura 40A, el péptido estudiado no inhibe el crecimiento tumoral, siendo la velocidad de crecimiento de los tumores prácticamente idéntica en presencia o en ausencia del péptido. Además, se consiguen tumores de igual tamaño y no se modifica la fase de latencia, siendo en ambos casos la incidencia del 100%. Por tanto, el péptido CDPGYIGSR no inhibe el crecimiento tumoral estimulado por el matrigel. Únicamente se observa la formación de tumores con un alto grado de necrosis, lo que podría ser indicativo de una menor vascularización.

En otros estudios, cuando el péptido YIGSR se coinyecta subcutáneamente con matrigel y con células de carcinoma de pulmón o de carcinoma de próstata, el crecimiento tumoral se reduce notablemente (Fridman *et al.*, 1990; Passaniti *et al.*, 1992). Eventualmente puede tener lugar crecimiento tumoral debido al recambio metabólico del péptido, puesto que no se administraron nuevas dosis del péptido (Passaniti *et al.*, 1992). También hay que considerar que en este péptido, como ya se ha comentado, es importante la conformación que presenta. Recientemente, se ha descrito que un péptido multimérico incrementa el efecto inhibitorio sobre la angiogénesis respecto del monomérico (Iwamoto

et al., 1996). Por tanto, es probable que, en este sistema, no se observe inhibición debido a una inadecuada conformación del péptido. En cualquier caso, el hecho de que este péptido no ejerza ningún efecto sobre el crecimiento tumoral puede correlacionarse con la falta de bloqueo de la adhesión a laminina por este mismo péptido *in vitro* (Figura 15).

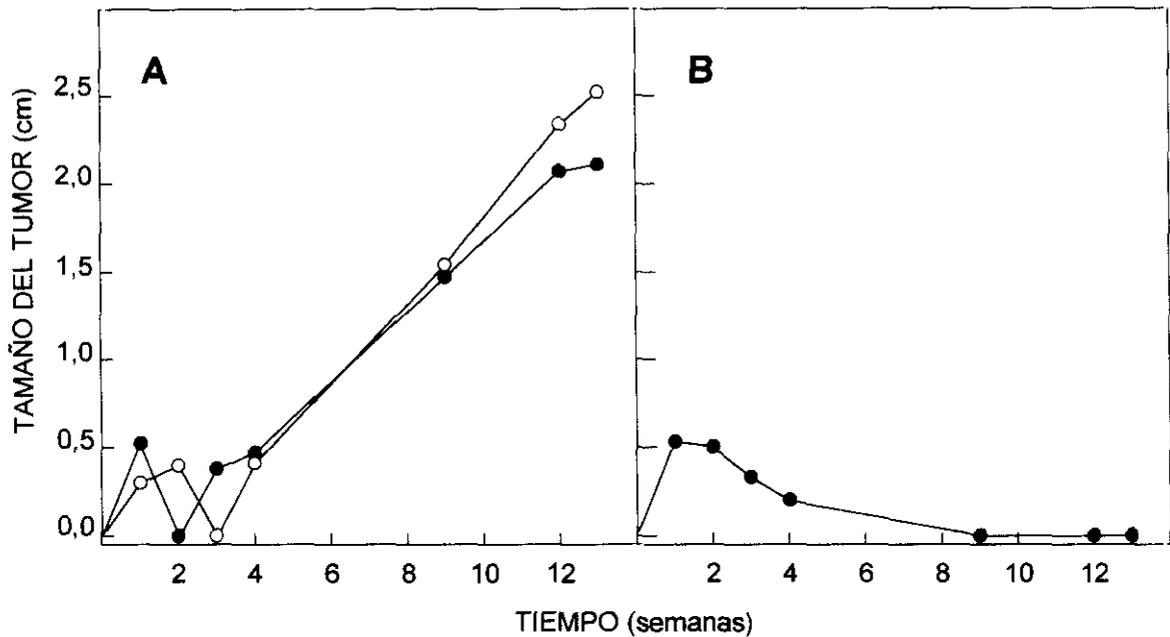


Figura 40.- Efecto de péptidos sobre el crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2.

1×10^6 células se mezclan con 0,6 mg de matrigel en ausencia (○) o en presencia (●) de 1 mg del péptido CDPGYIGSR (A) o de 1 mg del péptido CIKVAVS en ausencia de matrigel (B), y se inyectan subcutáneamente en ratones atímicos. El tamaño de los tumores se mide como se detalla en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron 2 veces utilizando en cada uno de ellos de 3 a 4 ratones. Los datos representan el valor medio de dichos experimentos. El error experimental es inferior al 10%.

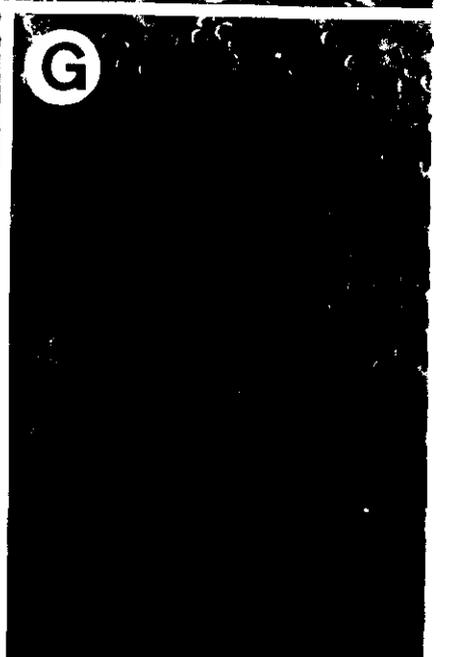
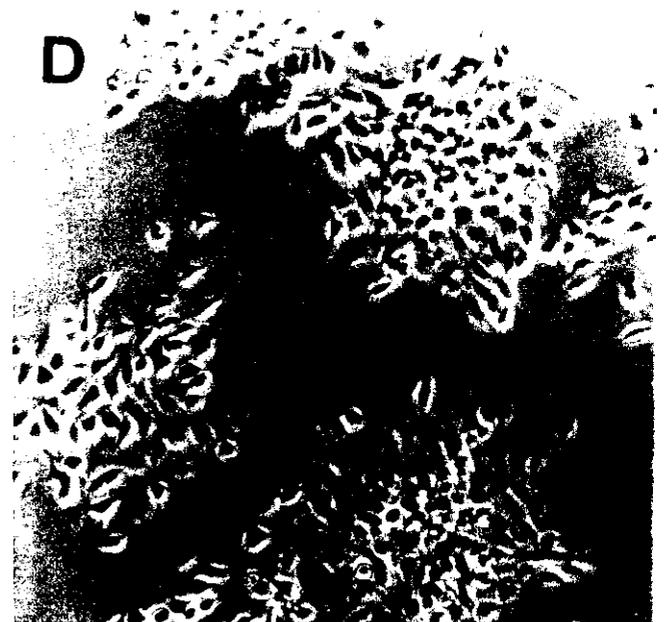
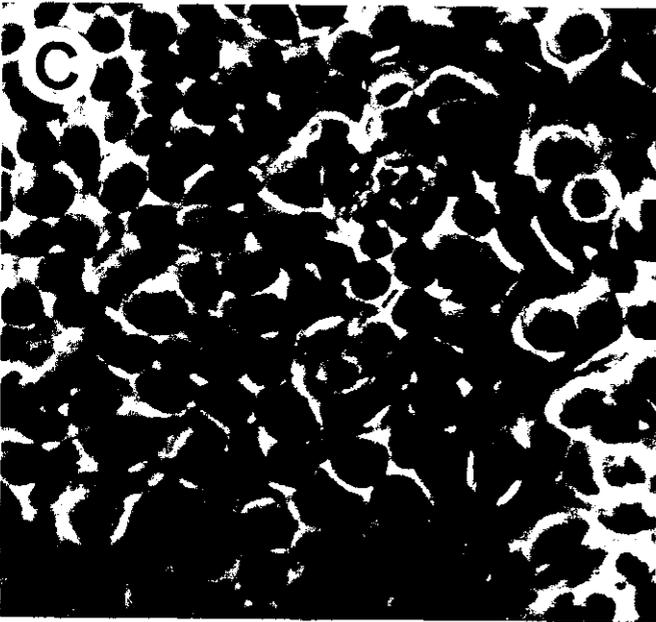
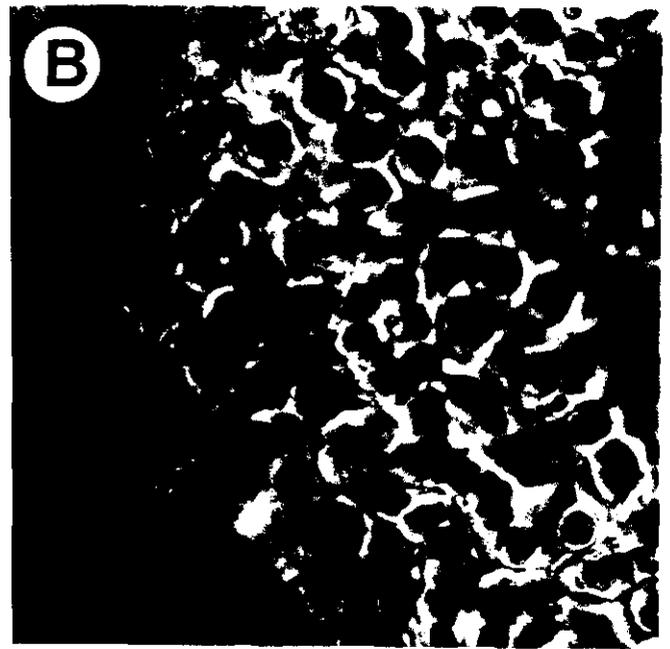
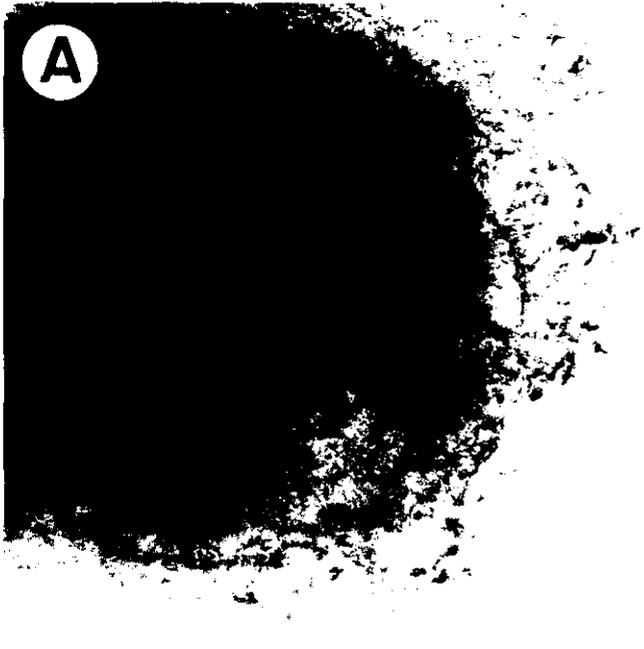
Como se observa en la figura 40B, tras la coinyección de las células con el péptido CIKVAVS, inicialmente se observa la formación de tumores en el 50% de los ratones. Sin embargo, a partir de la cuarta semana se produce una remisión del crecimiento tumoral; al final del estudio no se observa tumor en ninguno de los ratones. Por tanto, este péptido podría estar implicado en el crecimiento inicial del tumor, probablemente debido a su capacidad angiogénica. Sin embargo, la remisión de los tumores podría estar indicando que se requieren otros factores adicionales para la inducción de la tumorigenicidad aparte de la posible inducción de la angiogénesis. También se podría postular la necesidad de administrar nuevas dosis de péptido para observar un mayor efecto en el crecimiento tumoral. No obstante, en otros tipos celulares se ha observado efecto de este péptido sin que se requiera la administración de nuevas dosis (Kibbey *et al.*, 1992). Por otro lado,

también se ha descrito que la coinyección de células de carcinoma de próstata únicamente con el péptido IKVAV no origina crecimiento tumoral, e incluso en estas células el péptido IKVAV en presencia de matrigel no altera el crecimiento tumoral estimulado por matrigel (Passaniti *et al.*, 1992). Por el contrario, en células de melanoma B16F10 este péptido incrementa el crecimiento y la vascularización del tumor, pero siempre en presencia de matrigel (Kibbey *et al.*, 1992).

3.4.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LOS TUMORES INDUCIDOS POR MATRIGEL Y ESTUDIO DE SU CAPACIDAD TUMORIGÉNICA

El matrigel estimula el crecimiento de las células BCS-TC2 *in vivo*. Sin embargo, no se conoce de qué manera tiene lugar este proceso, ni tampoco cómo afecta a las células, para que éstas sean capaces de proliferar y formar tumores *in vivo*. Una aproximación para determinar los mecanismos implicados en la inducción de la formación de tumores por el matrigel, es el examen de las características de las células que forman el tumor. Por ello se planteó la obtención de células de los tumores inducidos por matrigel, utilizando el tejido tumoral disgregado por tratamiento con colagenasa (Figura 41A), o bien diseccionándolo en pequeños fragmentos que se cultivan (Figura 41E). Tras el tratamiento con colagenasa, las células individuales no sobreviven, obteniéndose células sólo a partir de fragmentos no disgregados del tejido (constituidos fundamentalmente por células epiteliales)(Figura 41A).

Después de 5 días en cultivo, se observa la salida de células esféricas pequeñas que permanecen unidas al explante y que después de dos semanas comienzan a extenderse (Figura 41). Además, en el cultivo se aprecian células, con apariencia de fibroblastos, que migran desde el explante y que, posiblemente, proceden de la cápsula fibrosa que envuelve al tumor (Figura 41E,F). Estos dos tipos celulares presentan diferente sensibilidad al tratamiento con tripsina/EDTA. La proporción de células esféricas, que van adquiriendo una morfología poligonal, aumenta a medida que se subcultiva, hasta llegar un momento en que prácticamente han desaparecido todos los fibroblastos (alrededor de la tercera y cuarta tripsinización) (Figura 41G). Las células que, una vez extendidas, presentan una morfología epiteloide, se subcultivan para su posterior estudio, generando la nueva sublínea celular denominada BCS-TC2.1. Estas células presentan características en cuanto a la organización del cultivo semejantes a la de la línea parental. Muestran una morfología epiteloide, poligonal, con un alto grado de extensión celular y con algunas células pequeñas de forma alargada (Figura 41). Las células crecen adheridas a la superficie de cultivo formando clones, hasta alcanzar la confluencia adoptando una monocapa altamente organizada (Figura 41). El análisis del cariotipo de la nueva sublínea confirma su origen humano.



Se puede pensar que la formación de tumores inducidos con matrigel resulta de la selección de una subpoblación de células tumorigénicas ya presente en la línea celular parental, o bien que las células, en contacto con el matrigel, adquirieran determinadas propiedades que les confiera un fenotipo tumorigénico. Para poder determinar cuál de los procesos ha tenido lugar, y si la alteración es permanente, tras 10-15 pases de tripsinización se analiza el comportamiento *in vivo* de la sublínea BCS-TC2.1. Al contrario que la línea celular parental, las células BCS-TC2.1 son capaces de formar tumores *in vivo* en ausencia de matrigel. Cuando estas células se inyectan solas en ratones atímicos (Figura 42A), la incidencia es considerablemente superior a la de la línea parental, y el período de latencia menor. Los tumores desarrollados están rodeados por tejido conectivo, son compactos, bien delimitados y similares a los obtenidos cuando las células parentales se coinyectan con matrigel, según el análisis histológico.

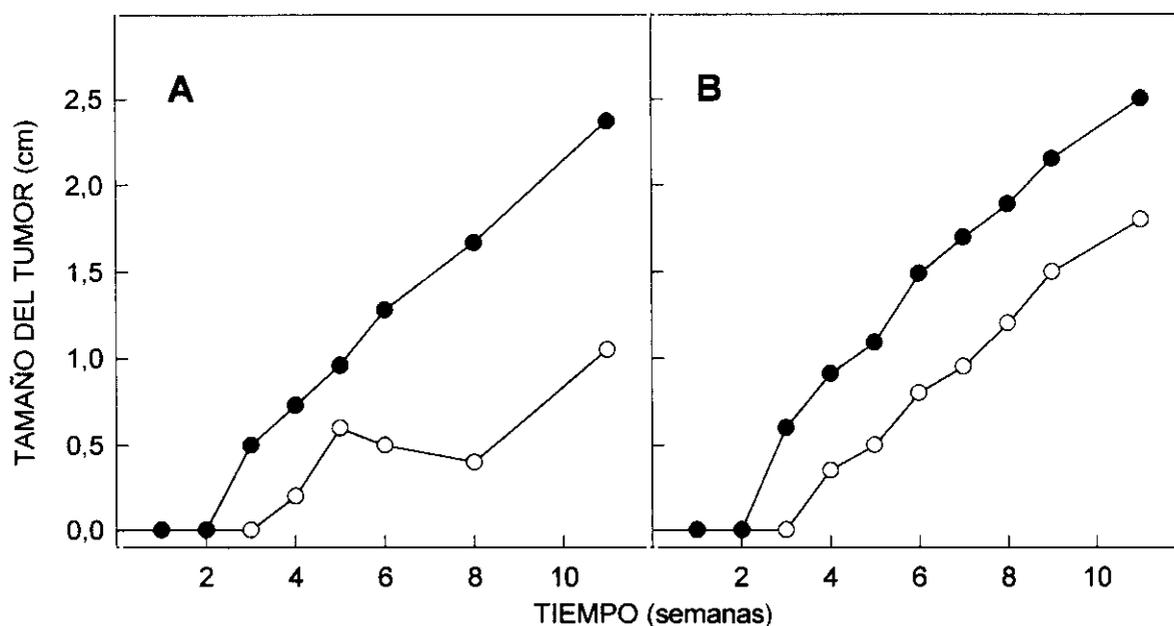


Figura 42.- Evolución del tamaño de los tumores inducidos por las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2.

La tumorigenicidad de las sublíneas establecidas se estudia inyectando subcutáneamente en ratones atímicos $2,5 \times 10^5$ (○) o 1×10^6 (●) células BCS-TC2.1 (A) o BCS-TC2.2 (B). El tamaño de los tumores se mide a distintos tiempos. Los experimentos se realizan tres veces, utilizando en cada experimento una media de 3-4 ratones. Los datos representan los valores medios, siendo el error inferior al 10%.

De los tumores obtenidos se aíslan nuevamente células utilizando los procedimientos anteriormente descritos (Figura 10). De esta manera, tras este segundo pase *in vivo*, se obtiene una nueva subpoblación celular, que tras su establecimiento en cultivo generó la línea celular BCS-TC2.2. Estas células presentan características morfológicas similares a las de las células BCS-TC2.1. Tras 10-15 pases de tripsinización se comprobó su

comportamiento *in vivo* inyectándolas subcutáneamente en ratones atímicos. Al igual que las células BCS-TC2.1, las células BCS-TC2.2 presentan tumorigenicidad intrínseca, ya que son capaces de originar tumores en ausencia de matrigel (Figura 42B). La incidencia de los tumores es superior que la de la sublínea BCS-TC2.1 así como el tamaño de los tumores inducidos en los ratones atímicos (Figura 43). La apariencia morfológica y características histológicas de estos tumores son similares a los producidos por la sublínea BCS-TC2.1.

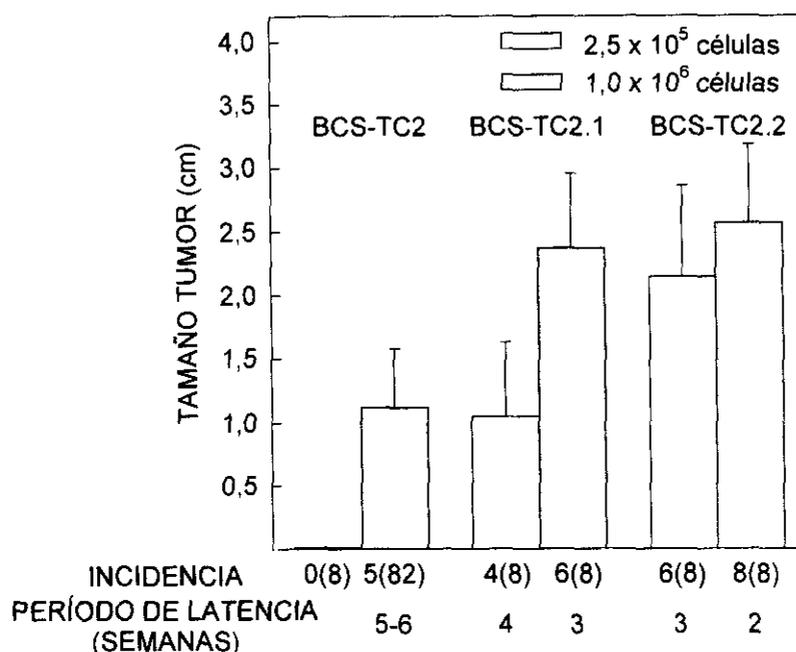


Figura 43.- Comparación de la tumorigenicidad de las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 con las células parentales.

Se indica la incidencia, el período de latencia y el tamaño de los tumores inducidos tras inyección subcutánea en ratones atímicos de $2,5 \times 10^5$ o 1×10^6 células procedentes de la línea parental o de las sublíneas BCS-TC2.1 o BCS-TC2.2. Se representa el tamaño de los tumores 12 semanas después de la inyección.

Por tanto, mientras que las células parentales requieren matrigel para formar tumores, las nuevas sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 son tumorigénicas por sí solas. En la figura 43 se compara el tamaño de los tumores, 12 semanas tras la inyección en ausencia de matrigel a dos concentraciones diferentes de células. El tamaño de los tumores obtenidos es significativamente mayor que el de aquellos ocasionalmente formados por las células parentales (Figura 43). Además, el período de latencia se reduce considerablemente y la incidencia se incrementa desde un 6% para las células parentales hasta un 67% y 100% para las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2, respectivamente. La capacidad tumorigénica de las sublíneas obtenidas se ha determinado en distintos pases de tripsinización sin que se aprecien diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Algunos autores indican que el efecto del matrigel no está relacionado con la selección de una subpoblación más tumorigénica, sino que es debido a la mejora de las condiciones de crecimiento. En la mayoría de los estudios, las células obtenidas de tumores inducidos por matrigel (células A549, células de adenocarcinoma de colon SW480, células SCLC o células de retinoblastoma) muestran las mismas características que las parentales y son incapaces de inducir tumores en ausencia del matrigel (Albini *et al.*, 1992; Fridman *et al.*, 1991; Topley *et al.*, 1993). Sin embargo, en el caso de los tumores inducidos por células NIH-3T3 con matrigel, las células obtenidas a partir de éstos no requieren matrigel nuevamente para crecer subcutáneamente y, además, son metastáticas cuando se inyectan por vía intravenosa (Fridman *et al.*, 1991, 1992). También se han establecido sublíneas de melanomas humanos en estadio temprano, obtenidas cuando células con poca o nula capacidad tumorigénica se coinyectan con matrigel, que son tumorigénicas cuando se inyectan en ausencia de matrigel (Kobayashi *et al.*, 1994).

La tumorigenicidad de la nueva sublínea celular BCS-TC2.1 se mantiene, e incluso se incrementa, después de su propagación *in vivo* de acuerdo al comportamiento de las células BCS-TC2.2 (Figura 43). Este hecho sugiere que se ha producido un proceso gradual de selección y adaptación, probablemente requerido para la expresión del fenotipo tumorigénico. El análisis del cariotipo de ambas sublíneas indican que las dos anomalías cromosómicas detectadas en las células parentales, un marcador +der(15) de origen desconocido y un cromosoma 16 alterado, se mantienen en las metafases estudiadas de las sublíneas. Además, las células BCS-TC2.1 presentan un nuevo marcador cromosómico, una alteración en el cromosoma 9, que se mantiene en las células BCS-TC2.2 después de la propagación *in vivo* de estas células (Tabla XI).

Tabla XI. Cariotipo de las células parentales y de las sublíneas tumorigénicas.

Línea celular	Cariotipo
BCS-TC2	46XX, +der(15), +der(16)
BCS-TC2.1	46XX, +der(15), +der(16), +der(9)
BCS-TC2.2	46XX, +der(15), +der(16), +der(9)

El cariotipo se realiza mediante bandeo G de varias metafases de ambos tipos de células, en diferentes pasajes de tripsinización.

Los resultados obtenidos sugieren que la coinyección de las células parentales con matrigel origina la selección de clones tumorigénicos derivados de las células originales. Este no es un hecho extraño, ya que la progresión *in vivo* de un tumor es un proceso

dinámico en el que continuamente están teniendo lugar alteraciones genéticas y/o fenotípicas, asociados con la adquisición de características específicas, lo que permite la evolución de poblaciones de células tumorales (Hiddermann *et al.*, 1986). La interacción de las células con los componentes del matrigel puede originar la expansión de un clon de células tumorigénicas que expresen un fenotipo específico. Además la ECM o los factores de crecimiento asociados producidos por las células del estroma (como TGF- β), pueden regular la expresión de proteínas de adhesión de estas células. Esta selección no es solamente un proceso que tiene lugar *in vivo*, sino que también puede ocurrir *in vitro*, como se ha descrito para células de melanoma humano primario (Jacob *et al.*, 1995).

3.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBLÍNEAS TUMORIGÉNICAS BCS-TC2.1 Y BCS-TC2.2

3.5.1. PROLIFERACIÓN CELULAR

Para determinar si el incremento de la tumorigenicidad en las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 se correlaciona con cambios en las características del crecimiento de las células, se analizaron las curvas de proliferación celular y la incorporación de metil-³H-timidina. Las curvas de proliferación de las células parentales y de las dos sublíneas en presencia de suero fetal bovino al 5% son prácticamente coincidentes, no encontrándose diferencias en ninguno de los parámetros característicos de las curvas de proliferación. Los estudios de incorporación de metil-³H-timidina indican que las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 incorporan 2,8 y 12,9 veces más metil-³H-timidina que la línea parental (Figura 44B). Este incremento no se correlaciona con variaciones en las curvas de proliferación pero, puede ser indicativo de una mayor actividad mitogénica y no siempre proliferativa. En algunas células transformadas (Virshup *et al.*, 1989; Boyer *et al.*, 1993), se ha descrito una tendencia a amplificar genes; Así por ejemplo, existe una diferencia 10.000 veces superior para amplificar determinados genes entre células NHF1 y células HeLa (Tlsty *et al.*, 1990).

Como ya se ha comentado, los componentes de la ECM ejercen efectos mitogénicos sobre las células BCS-TC2. Sin embargo, como se aprecia en la figura 44A, el efecto ejercido sobre las células tumorigénicas es considerablemente inferior, siendo casi nulo para las células BCS-TC2.2. Estos resultados sugieren que las células tumorigénicas, cuya capacidad mitótica es considerablemente superior a la de las células no tumorigénicas, son menos dependientes del suero, o de factores con actividad mitogénica. De este modo, la selección inducida por matrigel y los pases *in vivo* inducen cambios significativos en la

velocidad de síntesis de DNA, lo que posiblemente influya en la capacidad tumorigénica de las células.

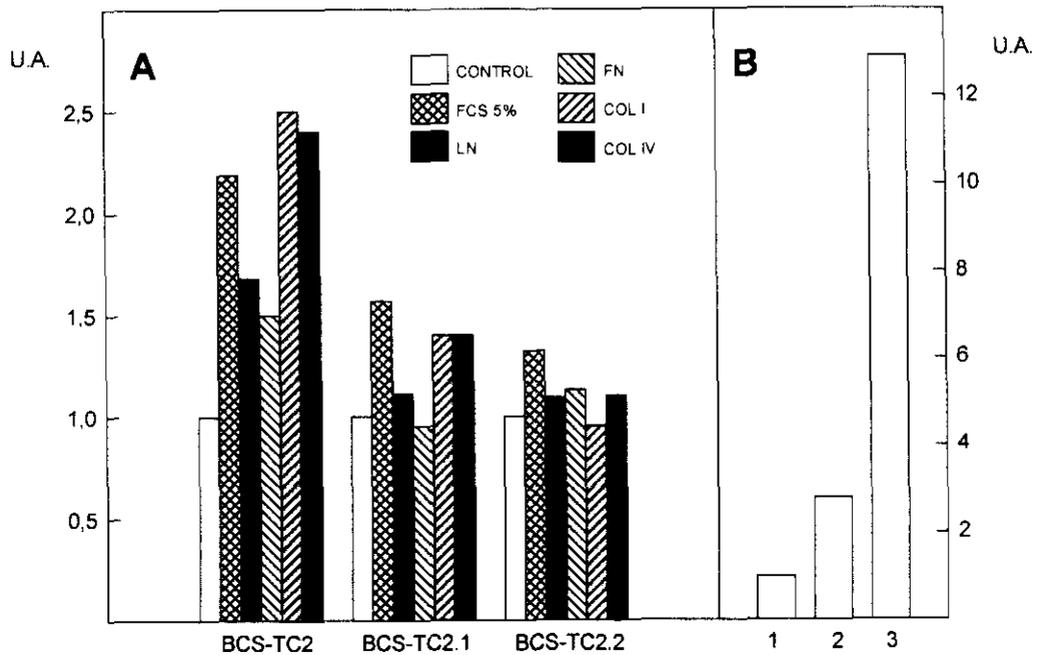


Figura 44.- Efecto de proteínas de la ECM y FCS en la incorporación de metil-³H-timidina por las células parentales y las sublíneas tumorigénicas.

La actividad mitogénica se evalúa incubando las células (5×10^4 por pocillo) en medio libre de suero suplementado con el correspondiente factor ($20 \mu\text{g/mL}$) o con FCS al 5%, en presencia de metil-³H-timidina ($0,9 \mu\text{Ci/pocillo}$). Transcurridas 24 horas, se determina la incorporación de metil-³H-timidina por las células como se indica en Materiales y Métodos. (A) Variación en la incorporación de metil-³H-timidina en presencia de LN, FN, Col I, Col IV o FCS. Cada línea celular se refiere a su correspondiente control de incorporación, en ausencia de factor, al que se le asigna de forma arbitraria el valor de 1. (B) Incorporación relativa de metil-³H-timidina, en ausencia de FCS, de las sublíneas BCS-TC2.1 (2) y BCS-TC2.2 (3) respecto de la línea parental (1) a la que se le asigna el valor de 1 (3629 cpm). Los resultados proceden de tres experimentos independientes, con determinaciones para cada dato por cuadruplicado. El error experimental es inferior al 10% en todos los casos.

Se ha descrito que las células de carcinoma de colon secretan factores de crecimiento entre los que se incluyen TGF- α , TGF- β , PDGF y EGF (Anzano *et al.*, 1989). El incremento en la capacidad mitogénica puede deberse a la secreción de factores de crecimiento por las propias células tumorigénicas. Para estudiar este aspecto, se ha evaluado la capacidad del medio condicionado por las sublíneas para incrementar la actividad mitogénica de la línea celular parental. Sin embargo, la adición de este medio a las células BCS-TC2 no estimula la incorporación de metil-³H-timidina, lo que podría indicar que los posibles factores de crecimiento secretados por estas células no son los responsables del incremento de la actividad mitogénica de las sublíneas. No obstante, hay

que considerar diferentes aspectos. Es posible que los factores de crecimiento producidos por las sublíneas se mantengan asociados a la monocapa celular después de la secreción, no apareciendo por tanto como factores solubles. Además, los factores de crecimiento sean liberados al medio condicionado, es posible que las células parentales no expresen receptores para estos factores, o lo hagan en menor número, como se ha visto en las células DLD-2 de carcinoma de colon humano (Gross *et al.*, 1993). También podría ocurrir que aunque las células parentales expresen estos receptores, el proceso de transmisión de la señal pueda encontrarse alterado, por lo que no se observaría la misma incorporación de metil-³H-timidina.

3.5.2. GRADO DE DIFERENCIACIÓN

Antígeno carcinoembrionario

La síntesis del antígeno carcinoembrionario (CEA) es una característica que diferencia a las células que proceden de un adenocarcinoma frente a las del tejido de colon normal. La presencia de este antígeno en sangre es, además, una de las pruebas clínicas realizadas para detectar la patología. En general, se ha descrito que existe una mayor producción de CEA en las líneas celulares tumorales más diferenciadas, en contraposición a las que proceden de tumores poco diferenciados (Wagner *et al.*, 1992; Prado *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos autores no han encontrado que exista dicha relación (Kammerer y von Kleist, 1994). Además, se ha descrito una gran variabilidad en el contenido de CEA por célula, hecho que puede ser debido bien a la naturaleza del tumor del que proceden las células o bien a la modulación de su expresión durante el cultivo prolongado. Las condiciones de cultivo y el método de ensayo pueden modificar los niveles de CEA detectados. Para analizar el grado de diferenciación de las sublíneas se valora el contenido en CEA, tanto en el medio de cultivo condicionado por las células, como en la capa celular. Como control, se ha evaluado la producción de CEA por las células HT-29, que proceden también de un adenocarcinoma de colon pero presentan un fenotipo más diferenciado que las células BCS-TC2. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla XII.

Las células BCS-TC2 sintetizan menos CEA que las células HT-29, tanto en el medio de cultivo como en la monocapa. Los niveles de CEA detectados en el caso de las sublíneas tumorigénicas son aún más bajos que los de las células parentales, lo que sería indicativo de un menor grado de diferenciación. Por otro lado, la baja síntesis de CEA también se ha relacionado con una mayor velocidad de proliferación (Semple *et al.*, 1978), lo que se podría correlacionar con los bajos niveles obtenidos para las sublíneas tumorigénicas.

Tabla XII. Características de las células BCS-TC2 y de las sublíneas tumorigénicas.

	CÉLULAS			
	BCS-TC2	BCS-TC2.1	BCS-TC2.2	HT-29
CEA medio cultivo	100% ¹	43%	38%	333%
CEA monocapa	100% ²	53%	55%	140%
Fosfatasa alcalina ³	25,7	18,1	6,4	nd
5'-Nucleotidasa ⁴	24x10 ⁻⁵	15x10 ⁻⁵	12x10 ⁻⁵	nd

Los datos del contenido en CEA se expresan como porcentajes, considerándose como 100% el valor obtenido para las células BCS-TC2. (¹0,89 ng CEA/mg proteína; ²33,19 ng CEA/10⁶ células). (³) La actividad de fosfatasa alcalina de células mantenidas en cultivo durante 20 días se expresa en mU/mg de proteína. (⁴) La actividad de 5'-nucleotidasa se expresa como nmoles de AMP hidrolizados/15 minutos/célula. Los valores son la media de tres experimentos diferentes, cada uno de los cuales se realiza por triplicado. El error fue siempre inferior al 10%.

Actividad de Fosfatasa Alcalina

Entre los antígenos descritos como marcadores de diferenciación presentes en la membrana apical de células epiteliales de colon se encuentra la fosfatasa alcalina. En la transformación maligna se ha descrito una disminución de la actividad de esta enzima, aumentando, sin embargo, con el proceso de diferenciación celular (Schroy *et al.*, 1994; Buras *et al.*, 1995). Como se recoge en la tabla XII, en las sublíneas se reduce la actividad de esta enzima respecto de la línea parental, lo que indicaría un menor grado de diferenciación y se relacionaría inversamente con su capacidad tumorigénica. Algunas líneas celulares procedentes de carcinomas de colon, como la línea celular Caco-2, son capaces de alcanzar un mayor grado de diferenciación durante el cultivo prolongado de las células, produciéndose un progresivo incremento en la actividad de fosfatasa alcalina (Pinto *et al.*, 1983). Sin embargo, en las células BCS-TC2 y en las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 no se modifica apreciablemente esta actividad con el tiempo en cultivo, a semejanza con lo descrito para las células HT-29 (Gamet *et al.*, 1992; Schroy *et al.*, 1994).

Actividad de 5'-nucleotidasa

La ectoenzima 5'-nucleotidasa se ha relacionado con los procesos de crecimiento, diferenciación y envejecimiento celular; asimismo, esta actividad se modifica en ciertos estados patológicos y en la transformación tumoral (Turnay *et al.*, 1989; Heilbronn y

Zimmerman, 1995; Navarro *et al.*, 1997).

Como se recoge en la tabla XII, las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 presentan una menor actividad de 5'-nucleotidasa que la línea celular parental. Estos datos están de acuerdo con otros descritos que indican una disminución de la actividad de la 5'-nucleotidasa en células malignas cuando se comparan con células normales (Raz *et al.*, 1978; Turnay *et al.*, 1989). Los resultados también confirman un menor grado de diferenciación de las sublíneas frente a las células no tumorigénicas BCS-TC2. En este sentido se ha observado que los niveles de expresión y la actividad de la enzima se incrementan con el grado de diferenciación, sugiriéndose que la 5'-nucleotidasa podría constituir un nuevo marcador de diferenciación (Sedlak *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1997). Además, se confirman resultados previamente descritos, existiendo una relación inversa entre la actividad de 5'-nucleotidasa y la velocidad de proliferación, lo que sugiere que la 5'-nucleotidasa puede ejercer un control negativo sobre la proliferación celular (Sun *et al.*, 1982; Turnay *et al.*, 1989).

Una manera de clasificar los carcinomas es según su grado de diferenciación; una mayor tumorigenicidad normalmente se asocia con un menor grado de diferenciación. Los resultados del contenido en CEA y las actividades de fosfatasa alcalina y 5'-nucleotidasa en las tres líneas celulares estudiadas están de acuerdo con esta hipótesis. Todos los resultados apuntan a una disminución en el grado de diferenciación, aún cuando la línea celular parental es ya poco diferenciada. Con estos datos, se puede sugerir que la laminina o el matrigel inducen la selección de una subpoblación menos diferenciada dentro de la población heterogénea original.

Estudios morfológicos

Estos estudios se han realizado por microscopía óptica de contraste de fase así como por microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Las células BCS-TC2 presentan una organización del cultivo característica de su origen epitelial (Figura 45A). Por microscopía de contraste de fase se aprecia heterogeneidad celular, presentando una gran variación en tamaño. En la figura 45B se recoge la microscopía electrónica de barrido de un cultivo casi confluyente. Se observan células extendidas y adheridas a la superficie, así como su morfología poligonal y alargada. Por microscopía electrónica de transmisión no se detectan células con microvellosidades en borde de cepillo o polarizadas, lo que es indicativo de la naturaleza poco diferenciada de las células BCS-TC2.

En la figura 46 se recogen las características morfológicas de las sublíneas BCS-TC2.1 (Figura 46 A,B,C) y BCS-TC2.2 (Figura 46 D,E,F). Las monocapas celulares formadas por ambas sublíneas presentan características similares a las de las células

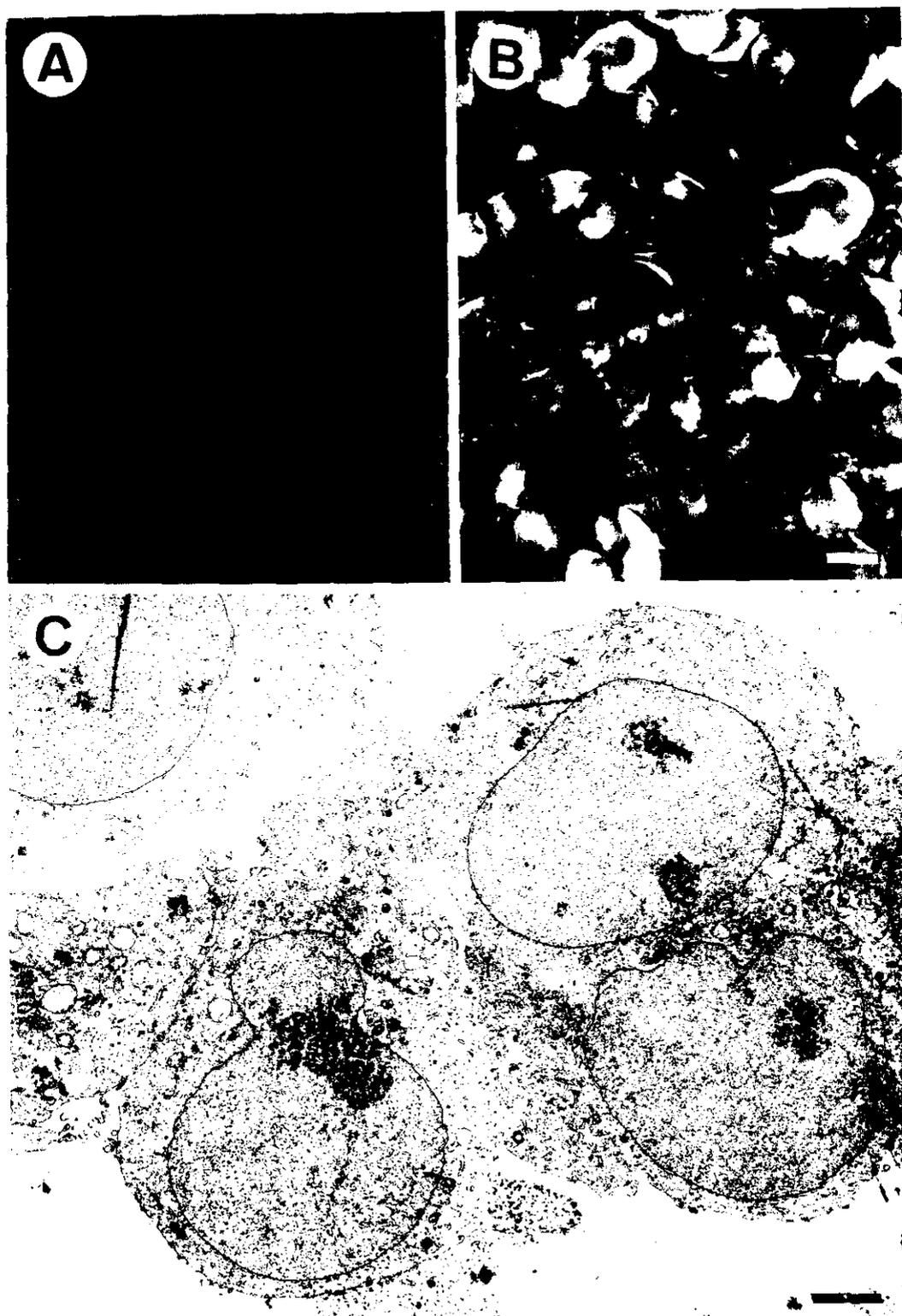
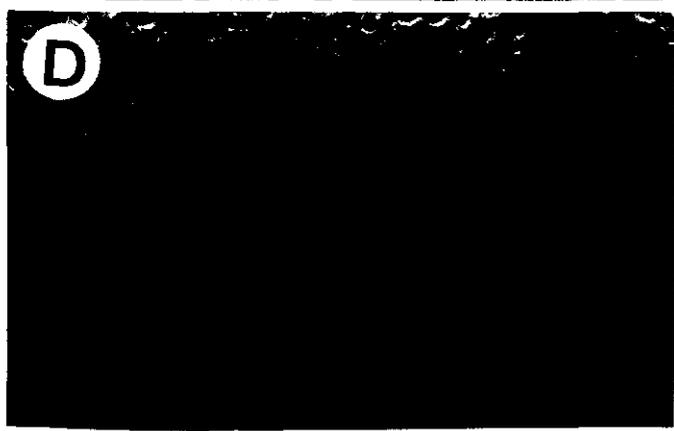
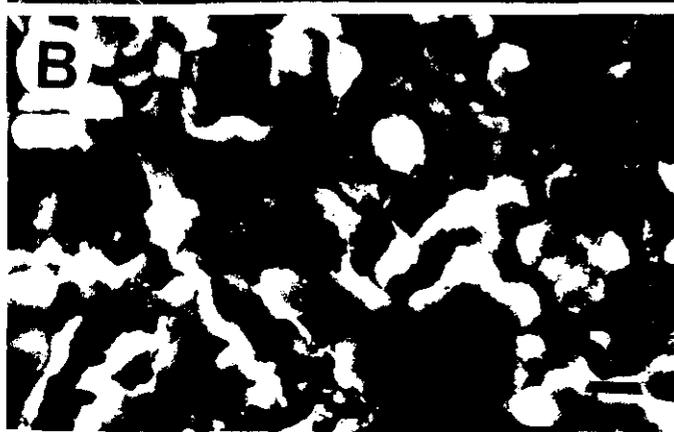


Figura 45.- Morfología de las células BCS-TC2 en cultivo.

(A) Microscopía de contraste de fase. Las células BCS-TC2 forman monocapas de células poligonales y alargadas (x10). (B) Microscopía electrónica de barrido. Se aprecian células adheridas a la superficie o a las células subyacentes mediante proyecciones citoplasmáticas (Barra 10 μm). (C) Microscopía electrónica de transmisión. Se detectan interacciones célula-célula sin que exista polarización en la membrana celular (Barra 2 μm).



parentales (Figura 46). Por microscopía de contraste de fase y de barrido se observa una mayor homogeneidad en cuanto al tamaño y la morfología de las células. A partir de la microscopía electrónica de barrido se ha determinado el tamaño medio del diámetro celular de las tres líneas celulares estudiadas (calculado a partir de la media de 50 determinaciones). Las células parentales tienen un diámetro medio de $10,25 \pm 1,37 \mu\text{m}$ en comparación con los $7,9 \pm 1,35$ y $8,37 \pm 1,38 \mu\text{m}$ de las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2, respectivamente. Por tanto, las sublíneas tumorigénicas presentan un menor tamaño celular. Por microscopía electrónica de transmisión (Figura 46C,F) se comprueba que las sublíneas tumorigénicas, como ocurre con la línea parental, presentan una baja polarización celular.

3.5.3. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE COMPONENTES DE LA ECM

Los resultados anteriores parecen indicar que la laminina es la principal molécula responsable del efecto del matrigel en la inducción de la tumorigenicidad celular. La laminina coinyectada con las células debe modular la función de éstas a través de la interacción con sus receptores celulares. Esto implica que se seleccionarán solamente las células con un patrón de receptores concreto se seleccionarán por su interacción con la laminina *in vivo*. Por tanto, es probable que en las sublíneas tumorigénicas el patrón de expresión de receptores celulares sea diferente comparado con el de las células parentales. Además, hay que considerar que se han descrito cambios, asociados con la transformación neoplásica, en la expresión de la proteína de 67 kDa y en la expresión de los receptores de tipo integrina (Dedhar y Saulnier, 1990; Castronovo, 1993; Kim *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1995). La importancia biológica de estos cambios no se conoce todavía, pero se ha sugerido que pueden desempeñar una función potencial en la aparición del fenotipo maligno o tumorigénico.

Por ello se procedió a analizar la expresión de receptores de componentes de la ECM, de tipo integrina y no integrina, en ambas sublíneas tumorigénicas, comparándola con la de las células parentales.

Expresión del receptor de 67kDa

La expresión del mRNA del receptor de 67kDa se analizó por *Northern Blot* en tumores originados por células BCS-TC2, solas o en presencia de matrigel, y tumores obtenidos por inyección de células BCS-TC2.1. En la figura 47 se aprecia la presencia de una única especie de mRNA 1,2 kb, que coincide con datos descritos para el mRNA de esta proteína (Rao *et al.*, 1989; Castronovo, 1993). El densitometrado de la señal del mRNA normalizado con respecto al control interno (señal del 18S) indica que no existen diferencias significativas en la expresión de esta proteína en los tres tipos de tumores. Cuando se

analiza el RNA extraído de las tres líneas celulares se obtienen unos resultados similares. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por citometría de flujo que indican que, en las tres líneas, casi todas las células (por encima del 90%) expresan este antígeno en la superficie celular y, además, con valores de intensidad media de fluorescencia semejantes (Tabla XIII).

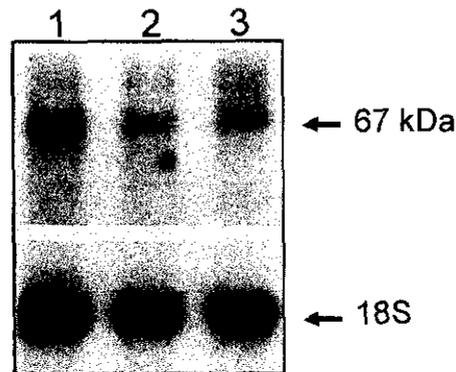


Figura 47.- Expresión del mRNA del receptor de 67 kDa.

Se analiza el RNA total extraído de los tumores obtenidos de células parentales inyectadas subcutáneamente en ratones atímicos en medio de cultivo solo (1), en presencia de matrigel (2), y de los tumores inducidos por las células BCS-TC2.1 (3). 10 μ g de RNA total de los tumores se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en presencia de formaldehído, tras lo cual se transfieren a una membrana de mylon, y se hibrida con una sonda frente al receptor de laminina de 67 kDa marcada con 32 P.

Así, la tumorigenicidad de las sublíneas no se asocia con un incremento en los niveles del mRNA de la proteína de unión a laminina de alta afinidad de 67 kDa o con la proteína localizada en la superficie celular. Sin embargo, se ha descrito que existe una correlación entre la malignidad celular y los niveles de mRNA o de expresión de este receptor (Cioce *et al.*, 1991; Albelda, 1993; Castronovo, 1993, Sobel, 1993). Por otro lado, se ha sugerido que la expresión del fenotipo tumorigénico puede requerir ciertos cambios genéticos diferentes de los necesarios para el desarrollo del fenotipo metastático (Ess *et al.*, 1995). Por tanto, la expresión de altos niveles de la proteína de unión a laminina de 67 kDa podría favorecer la metástasis, facilitando la migración y la degradación de los basamentos membranosos, pero no el incremento de la tumorigenicidad. La laminina incrementa la expresión de esta proteína (López-Conejo, 1992), pudiendo favorecer la capacidad tumorigénica de las células en las etapas iniciales de la formación del tumor. Sin embargo, este incremento no se mantiene de forma constitutiva, ni es un requisito imprescindible o único para que presenten capacidad metastática.

Expresión de receptores de tipo integrina

La expresión de las integrinas en las células BCS-TC2 y en las sublíneas tumorigénicas se ha examinado por citometría de flujo. El estudio se ha centrado principalmente en las integrinas que presentan afinidad por laminina ($\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$, y otras integrinas, como $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ que además tienen afinidad por colágenos y fibronectina). En la tabla XIII se compara el porcentaje de células positivas y los valores de intensidad media de fluorescencia de los diferentes antígenos en las tres líneas celulares.

Tabla XIII. Expresión de subunidades de integrinas y de la proteína de unión a laminina de 67 kDa por citometría de flujo.

Antígeno (Anticuerpo)	BCS-TC2	BCS-TC2.1	BCS-TC2.2
α_1 (TS2/7)	56 (21)	23 (14)	8 (10)
α_2 (P1E6)	100 (143)	100 (228)	100 (420)
α_3 (P1B5)	100 (243)	100 (318)	100 (303)
α_4 (HP2/1)	2 (0)	2 (0)	0 (0)
α_5 (BIIG2)	100 (28)	100 (26)	100 (32)
α_6 (GoH3)	98 (60)	99 (98)	98 (139)
β_1 (ALEX1/4)	100 (275)	100 (366)	100 (485)
β_4 (3E1)	74 (247)	56 (90)	37 (98)
67-kDa (MLUC5)	90 (466)	97 (447)	99 (479)

Las células, creciendo en condiciones estándar se tripsinizan y se preparan para su análisis por citometría de flujo como se indica en Materiales y Métodos. Las diluciones de los primeros anticuerpos utilizados son: anti- α_1 , anti- α_2 , anti- α_3 , anti- α_5 , anti- β_1 y anti-67 kDa, dilución 1:100; anti- α_4 y anti- α_6 , dilución 1:50; anti- β_4 , dilución 1:1000. Como segundo anticuerpo, se utiliza anti-IgG de ratón o de rata marcados con FITC y a una dilución 1:100. En la tabla se recoge el porcentaje de células positivas y, entre paréntesis, el valor de la intensidad media de fluorescencia (MFI). 67 kDa, proteína de unión a laminina de 67 kDa.

Las cadenas de integrinas β_1 , α_2 , α_3 y α_6 se expresan prácticamente en el 100% de las células, observándose un incremento en la intensidad media de fluorescencia en las sublíneas. Por el contrario, si se consideran las cadenas β_4 y α_1 , se produce una disminución en ambos parámetros en las sublíneas tumorigénicas. En ninguna de las tres líneas celulares se expresa la subunidad α_4 .

La integrina $\alpha_6\beta_4$ es un constituyente de los hemidesmosomas de las células epiteliales diferenciadas, estructuras que contribuyen a las fuertes interacciones célula epitelial-basamento membranoso (Nagle *et al.*, 1995; Dowling *et al.*, 1996). La disminución de los niveles de integrinas se relaciona con la pérdida de interacciones célula-célula y célula-matriz en las fases iniciales de la invasión (Chammas *et al.*, 1991b; Bosman, 1993), favoreciéndose la liberación de las células tumorales y la formación de metástasis distantes (Daèmi *et al.*, 1995). La integrina β_4 parece estar implicada en el ciclo endocítico y la disminución en su expresión podría relacionarse con una mayor motilidad de las células tumorigénicas, como ya se ha indicado para células de carcinoma de mama y próstata y en tumores colorrectales (Bretscher, 1992; Falcioni *et al.*, 1994; Nagle *et al.*, 1995). Sin embargo, en células de carcinoma escamoso oral se ha indicado que la pérdida de la integrina $\alpha_6\beta_4$ no es directamente responsable del crecimiento y la diferenciación anormal observada en estas células (Jones *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha relacionado a la integrina β_4 con la apoptosis y la inhibición del crecimiento (Clarke *et al.*, 1995), por lo cual la disminución en su expresión podría relacionarse con una mayor capacidad proliferativa de las células transformadas.

Si se comparan las sublíneas con las células parentales se observa un incremento en la expresión de las subunidades β_1 , α_2 , α_3 y α_6 . En células invasivas y tumorigénicas también se han detectado niveles más altos de integrinas β_1 con respecto a células no tumorigénicas y poco invasivas (Dedhar y Saulnier, 1990). Además, se ha descrito una elevada expresión de integrinas β_1 en tumores colorrectales y en adenocarcinomas gástricos poco diferenciados (Fujita *et al.*, 1995). Sin embargo, la función de las integrinas β_1 en la malignidad no está clara. Así, se ha descrito, como un proceso general, la disminución de las integrinas β_1 en tumores agresivos poco diferenciados. Una disminución de la expresión de esta integrina, además de en las subunidades α_6 y β_4 , se ha observado en células de adenocarcinoma de colon y en tumores de mama y de colon (Koretz *et al.*, 1991; Stallmarch *et al.*; 1992; Daèmi *et al.*, 1995). Por otro lado, células invasivas de carcinoma de próstata sintetizan menores cantidades de $\alpha_3\beta_1$ que las células parentales (Dedhar *et al.*, 1993). Este aparente desacuerdo en cuanto a la integrina β_1 ha sido discutido por Kim *et al.* (1995), indicándose que la controversia puede deberse a diferentes causas, tales como la gran cantidad de actividades biológicas de las integrinas β_1 o el empleo de diferentes anticuerpos. Parece que hay diferentes integrinas implicadas en cada tipo de tumor y, quizás, incluso en cada nivel de malignidad dentro de un mismo tipo de tumor. Aunque la familia de las integrinas β_1 participa principalmente en el anclaje de las células a los sustratos, también se le han asignado otras actividades como la transmisión de la señal, la organización de la matriz y/o la modulación de la respuesta celular del huésped (Juliano, 1993c).

El patrón de expresión de las integrinas β_1 en cáncer de colon no está claro. Koretz *et al.*, (1991) examinaron la expresión de esta subunidad en 96 casos de adenocarcinoma de colon y encontraron que los niveles de expresión son similares a los de la mucosa normal, no correlacionándose con el estado clínico o el grado del tumor. También las metástasis en hígado muestran un patrón similar de la expresión de β_1 . Por el contrario, estudios desarrollados en otros laboratorios indican una disminución en la expresión de la integrina β_1 en carcinoma de colon comparado con la mucosa normal (Stallmach *et al.*, 1992; Nigam *et al.*, 1993)

La expresión de las subunidades α_6 y α_3 se asocia con la transformación y progresión tumoral. En el estudio recogido por Bartolazzi *et al.* (1994) la integrina α_3 se expresa en el 82% de los tumores metastáticos considerados en el estudio. Otros análisis indican una correlación entre la capacidad invasiva *in vitro* y la expresión de α_6 (Dedhar y Saulnier, 1990; Rabinovitz *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1996). La integrina α_6 se sobreexpresa en tumores de cabeza y cuello, en cáncer de vejiga, pulmón y carcinoma de colon. El incremento en los niveles de α_6 observado en las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 se podría relacionar con un incremento en la proliferación celular *in vivo*, como ocurre en células de carcinoma de próstata, donde se sugiere que este hecho podría estar relacionado con alguna señal regulada por la integrina α_6 (Rabinovitz *et al.*, 1995).

También se produce un incremento en la subunidad α_2 en las sublíneas tumorigénicas que se podría relacionar con una mayor motilidad celular. La transfección de células RD, de rhabdomiosarcoma humano, con la subunidad α_2 confiere una mayor capacidad metastática (Chan *et al.*, 1991,1992) aunque, por el contrario, no afecta a la tumorigenicidad *in vivo* (Chan *et al.*, 1991). Además existe una asociación entre esta integrina y la regulación positiva de la expresión de MMP-1 (Riikonen *et al.*, 1995). Sin embargo, en células de carcinoma de mama, la pérdida o disminución en los niveles de $\alpha_2\beta_1$ se relaciona con un fenotipo transformado (Zutter *et al.*, 1995; Keely *et al.*, 1995) y su incremento, con la supresión del crecimiento e inducción de la diferenciación (Zutter *et al.*, 1995).

La expresión de la integrina α_5 no se modifica de manera sustancial en las sublíneas tumorigénicas. Los datos referentes a la expresión de α_5 y su posible relación con la capacidad tumorigénica y de metástasis son difíciles de interpretar. Así, se ha correlacionado un incremento en la expresión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ con una baja tumorigenicidad de células de cáncer de colon (Stallmach *et al.*, 1994) y de células transformadas (Giancotti y Ruoslahti, 1990; Schreiner *et al.*, 1991). Por el contrario, en otras líneas celulares, entre ellas también células de cáncer de colon, se observa un incremento de las subunidades α_5 y β_1 en las líneas más tumorigénicas y/o invasivas

(Schiller y Bittner, 1995; Gong *et al.*, 1997). Algunos autores sugieren que la expresión en la superficie celular de $\alpha_5\beta_1$ no se correlaciona con tumorigenicidad, aunque indican la función clave de esta integrina en los procesos tumorigénicos, puesto que anticuerpos frente a las subunidades α_5 y β_1 inhiben el crecimiento tumoral en ratones atímicos (Schiller y Bittner, 1995).

En el caso particular de las células BCS-TC2 y las sublíneas tumorigénicas descritas en esta Memoria, el incremento de las integrinas β_1 podría contribuir al establecimiento de contactos de adhesión moderados, necesarios para la migración celular y la invasión del tejido circundante, como se ha descrito para células de carcinoma de próstata (Rabinovitz *et al.*, 1995). La disminución de la expresión de la integrina $\alpha_6\beta_4$, con la pérdida de un anclaje estable podría facilitar la migración celular, lo que, junto con el paralelo incremento en las integrinas β_1 , esté probablemente asociado a una mayor motilidad e invasividad de las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2. Además parece que el patrón de expresión de integrinas en las sublíneas tumorigénicas puede estar implicado en el incremento de la proliferación. En este sentido, se ha descubierto una oncoproteína, denominada quinasa-1, unida a integrina (ILK-1 *Integrin-Linked Kinase-1*), que interacciona con el dominio citoplasmático de β_1 (Hannigan *et al.*, 1995), y que, junto con otros mediadores de la transmisión de la señal, participa en la proliferación celular regulada por integrinas.

3.5.4. ADHESIÓN DE CÉLULAS BCS-TC2.1 Y BCS-TC2.2 A COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Para verificar si las diferencias observadas en la expresión de integrinas en las sublíneas tumorigénicas influye en la capacidad adhesiva de las células, se realizaron ensayos de adhesión celular sobre laminina, fibronectina y colágenos de tipo I y IV. Los resultados, recogidos en la figura 48, muestran que no existe ninguna diferencia significativa en la adhesión de estas células sobre las proteínas estudiadas. Este resultado podría indicar que se necesitan unos niveles muy bajos de expresión de integrinas para que tenga lugar la adhesión a componentes de la matriz. Por ello, el incremento en los niveles de estos receptores no origina ninguna modificación apreciable en dicho comportamiento. En este sentido distintos autores han indicado que la variación en los niveles de integrinas no modifica significativamente las propiedades adhesivas de las células (Daèmi, 1995; Rabinovitz *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996).

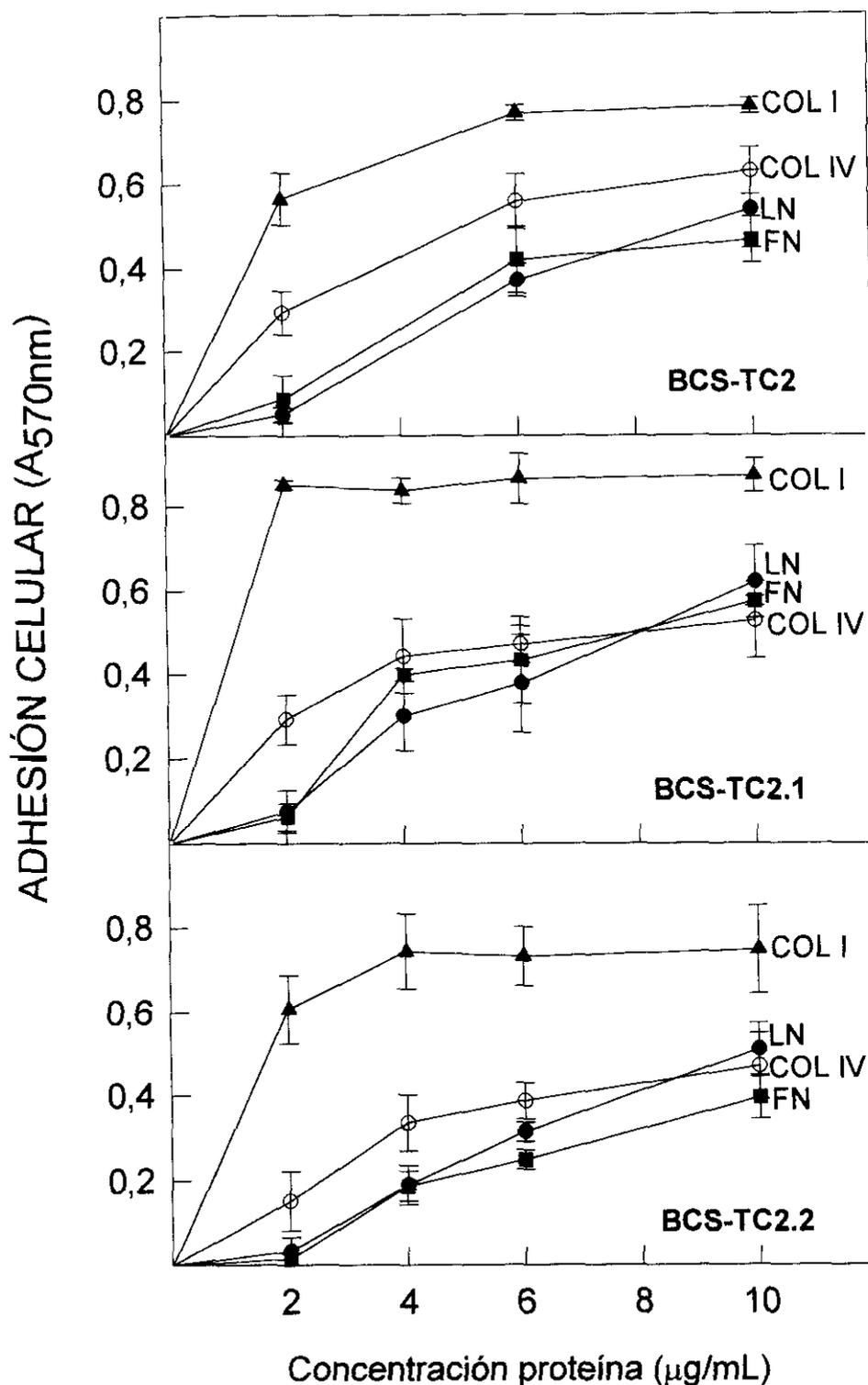


Figura 48.- Adhesión de las células BCS-TC2, BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 a distintos componentes de la matriz extracelular.

Los ensayos de adhesión se han realizado como se detalla en Materiales y Métodos. Las células se dejan adherir, durante 30 minutos, sobre pocillos recubiertos con distintas concentraciones de los cuatro sustratos. A continuación se valora el número de células adheridas por tinción con violeta cristal. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm restando la absorbancia debida al control (células adheridas sobre BSA) y proceden de, al menos, tres experimentos independientes realizados con determinaciones para cada dato por cuadruplicado.

3.5.5. EFECTO DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS INTEGRINAS β_1 EN LA TUMORIGENICIDAD DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.2

Uno de los cambios más acusados en las sublíneas tumorigénicas es el aumento en la expresión de la subunidad β_1 . Dicha subunidad participa en la formación de los heterodímeros $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$, todos ellos implicados en la interacción célula-ECM. Con objeto de profundizar en el papel de las integrinas β_1 en la adquisición del fenotipo tumorigénico, se planteó estudiar el efecto de anticuerpos específicos frente a esta subunidad en la propagación *in vivo* de las células. Para ello se seleccionaron las células BCS-TC2.2, que son las que presentan una mayor capacidad tumorigénica y también un mayor nivel de integrina β_1 . Se han utilizado tres tipos de anticuerpos distintos frente a la subunidad β_1 : LIA1/2, ALEX1/4 y TS2/16. Dichos anticuerpos reconocen diferentes sitios funcionales que se encuentran en la misma región de la integrina β_1 , y afectan de manera distinta a los procesos de adhesión y agregación celular (Campanero *et al.*, 1992; Arroyo *et al.*, 1992; van de Wiel-van Kemenade *et al.*, 1992; Takada y Puzon, 1993; Martín-Padura *et al.*, 1994).

Las células BCS-TC2.2 se preincubaban con el anticuerpo correspondiente, tras lo cual se coinyectan subcutáneamente en ratones atímicos. Como se observa en la figura 49 no se aprecian grandes diferencias en el desarrollo del tumor en el caso de células solas o preincubadas con los anticuerpos LIA1/2 o TS2/16. Sin embargo, las células tratadas con el anticuerpo ALEX1/4 presentan una menor capacidad tumorigénica, puesto que se originan tumores de menor tamaño, efecto que se pone claramente de manifiesto 25 días después de la coinyección. Después de 40 días, el tamaño de estos tumores se ha reducido a la mitad respecto del control o del resto de anticuerpos estudiados. A este tiempo, los tumores se extraen y se pesan. En este caso, el efecto de ALEX1/4 es más acusado, puesto que el peso de los tumores obtenidos supone un 15% del peso de los tumores desarrollados por las células control (Figura 49). Además, se observa que los tumores desarrollados por las células preincubadas con LIA1/2 también son de menor peso (aproximadamente el 78%) que los tumores desarrollados en ausencia de anticuerpo.

Estos resultados indican que los anticuerpos anti- β_1 LIA1/2 y ALEX1/4 inhiben el crecimiento tumoral de las células BCS-TC2.2 en ratones atímicos, siendo más acusado el efecto producido por este último. Una de las etapas iniciales en el proceso tumorigénico es la adhesión de las células a la ECM. Es probable, por tanto, que la inhibición observada en la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2.2 por anticuerpos anti- β_1 se deba, al menos en parte, a la inhibición de la adhesión a componentes de la matriz. Por ello se realizaron experimentos de inhibición de la adhesión preincubando las células con los mismos anticuerpos anti- β_1 .

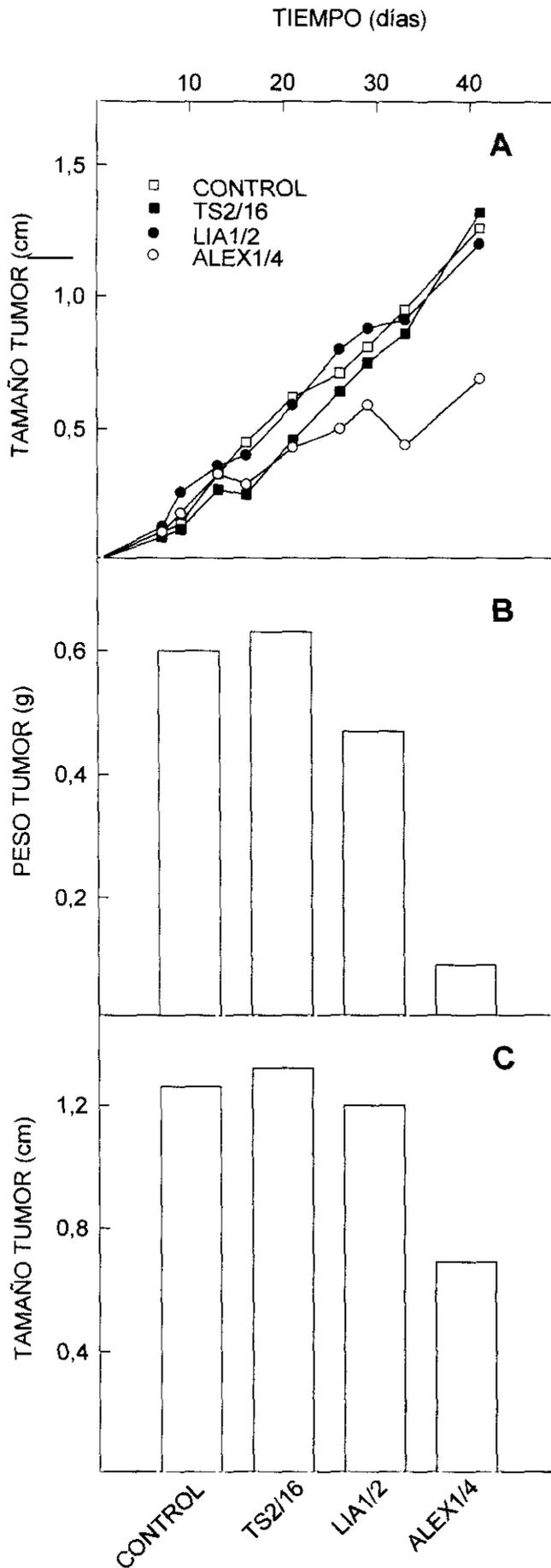


Figura 49: Efecto de anticuerpos frente a la integrina β_1 sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2.2.

Las células BCS-TC2.2 (7×10^6) tras preincubación con $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo de hibridomas con anti- β_1 TS2/16, LIA1/2, ALEX1/4 o en ausencia de anticuerpo (control) se coinyectan subcutáneamente en ratones atímicos (1×10^6 células/ratón). El tamaño de los tumores se mide a distintos tiempos. (A) Crecimiento de las células BCS-TC2.2 preincubadas con anticuerpos TS2/16 (■), LIA1/2 (●), ALEX1/4 (○) o en ausencia de éstos (□). (B) Peso y (C) tamaño del tumor 40 días después de la inyección. Los experimentos se realizaron dos veces, utilizando en cada experimento una media de 4 ratones. Los datos representan los valores medios, siendo el error no superior al 15% en todos los casos.

Como se observa en la figura 50 el anticuerpo TS2/16 activa la adhesión celular sobre todos los sustratos estudiados (LN, FN, COL I y COL IV), resultado ya descrito para este anticuerpo activante (Arroyo *et al.*, 1992; van de Wiel-van Kemenade *et al.*, 1992). Los anticuerpos LIA1/2 y ALEX1/4 inhiben la adhesión a fibronectina y colágenos. Sin embargo, sobre laminina el anticuerpo LIA1/2 no ejerce ningún efecto mientras que el anticuerpo ALEX1/4 activa la adhesión a este sustrato.

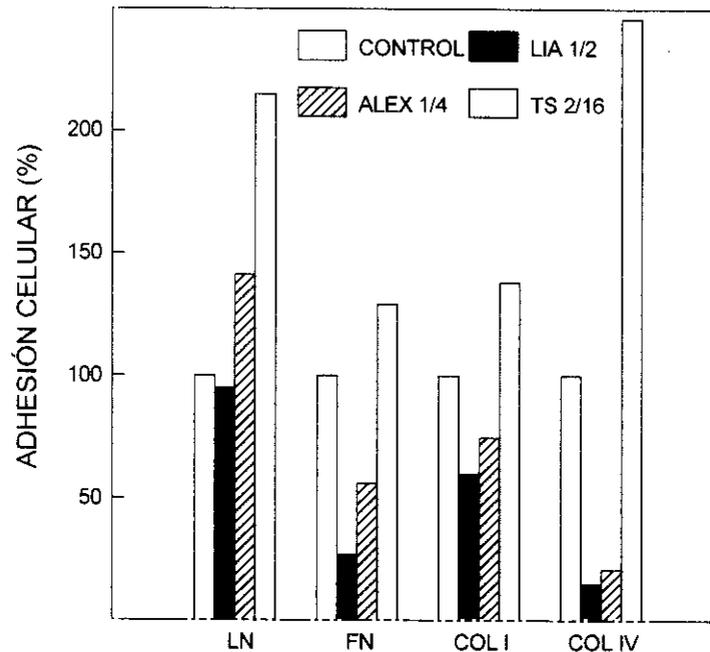


Figura 50.- Inhibición de la adhesión de células BCS-TC2.2 por anticuerpos anti- β_1 .

La inhibición de la adhesión por anticuerpos se ha llevado a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las células tripsinizadas se incuban durante 45 minutos a 37°C con anticuerpos anti- β_1 (TS2/16, LIA1/2 o ALEX1/4; dilución 1:10) o en ausencia de anticuerpo (control). Posteriormente, las células se siembran sobre pocillos saturados con LN, FN, Col I o Col IV (10 μ g/mL) y se dejan adherir durante 30 minutos. Los resultados se expresan en porcentaje de células adheridas respecto de las células adheridas al correspondiente sustrato en ausencia de anticuerpo, y proceden de tres experimentos independientes realizados con determinaciones para cada dato por cuadruplicado. El error experimental es inferior al 10%.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que los anticuerpos que bloquean la interacción célula-ECM producen una disminución en el tamaño de los tumores. Por el contrario las células incubadas con el anticuerpo TS2/16, que no bloquea la interacción célula-ECM sino que incluso la favorece, son capaces de desarrollar tumores de la misma manera que lo hacen las células BCS-TC2.2 solas. Por tanto, la interacción inicial célula-ECM parece ser clave para el posterior desarrollo tumoral. En este sentido, estudios realizados con anticuerpos, péptidos y disintegrinas confirman esta teoría. Distintos anticuerpos anti- β_1 bloquean la tumorigenicidad y reducen el número de colonias

metastáticas, probablemente debido al bloqueo de la adhesión celular (Schiller y Bittner, 1995; Newton *et al.*, 1995), o por inhibición de la proliferación de células tumorales metastáticas *in vivo* (Elliot *et al.*, 1994). Una disintegrina, aislada de veneno de serpiente, inhibe la adhesión mediada por integrinas *in vitro* y la colonización en pulmón *in vivo* (Tripathi *et al.*, 1994). Además, estudios realizados con péptidos que inhiben la adhesión a componentes de la ECM inhiben la metástasis tumoral por la interferencia de la interacción célula-ECM (Saiki *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996).

La unión de los diferentes anticuerpos a la integrina β_1 puede originar cambios en la conformación o en la accesibilidad de los dominios de unión del ligando, de modo que se active o inactive la función de β_1 . Se ha identificado una pequeña región en esta integrina donde se sugiere que se unen tanto anticuerpos activantes como inhibidores de la adhesión (Takada y Puzon, 1993). La unión de un anticuerpo u otro induce un cambio conformacional diferente en la integrina β_1 que activa o inactiva su función. La unión de anticuerpos a esta región podría impedir de algún modo que tuviera lugar la función de la integrina en la transmisión de la señal. Los anticuerpos anti- β_1 no funcionales (no activan ni inhiben) reconocen otra región diferente en la integrina β_1 que contiene motivos tipo EGF (Takada y Puzon, 1993).

La tumorigenicidad bloqueada por anticuerpos anti- β_1 , en este sistema, confirmaría la hipótesis que indica que la interacción de la ECM con células neoplásicas que expresan altos niveles de proteínas de adhesión específicas (β_1) favorece la proliferación *in vivo* de las células. Así, el bloqueo inicial o temprano de la función de estas integrinas por anticuerpos originaría una disminución real de los niveles de β_1 que tendería a asemejarse a los presentes en las células BCS-TC2, teniendo como resultado la disminución de formación de tumores.

3.5.6. EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS

La degradación de la ECM es un prerrequisito para la adquisición del fenotipo invasivo por las células transformadas. Estudios en líneas celulares y en tumores indican que la capacidad invasiva de las células se relaciona con las actividades de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (Stetler-Stevenson, 1993; Kleiner y Stetler-Stevenson, 1993; Birkedal-Hansen, 1995; MacDougall y Matrisian, 1995). Por tanto, se procedió a estudiar si el diferente comportamiento de las sublíneas en cuanto a su capacidad tumorigénica se podría correlacionar con un diferente patrón de expresión de MMPs.

Estudios previos indicaban que las células BCS-TC2 no presentan actividad colagenolítica. Al valorar la actividad degradativa sobre colágenos marcados

radiactivamente tanto en el medio condicionado por las células epiteliales transformadas como en el del cocultivo de estas células con fibroblastos de colon, en ningún caso se detectó actividad colagenolítica (Turnay, 1989; Turnay *et al.*, 1990).

La interacción *in vivo* de las células con el matrigel, o con uno de sus componentes podría haber originado la secreción de MMPs en las células. En este sentido se ha postulado que la interacción de células con laminina induce la producción de colagenasa (Yudoh *et al.*, 1995). Además, el péptido SIKVAV, estimula la producción de MMP-9 y de la colagenasa intersticial en monocitos (Corcoran *et al.*, 1995). Se realizaron zimogramas del medio condicionado por células BCS-TC2 creciendo sobre plástico, laminina o matrigel (Figura 51A). Solamente se observan dos bandas en las muestras que corresponden a las células creciendo sobre matrigel. Sin embargo, cuando se aplica matrigel en el gelatinograma se observa la aparición de bandas similares (Figura 51A), por lo que las actividades detectadas en estas células probablemente provienen de gelatinasas contaminantes contenidas en el extracto de basamentos membranosos. En las células que crecen sobre laminina, al igual que en las que lo hacen sobre plástico, no se detecta actividad gelatinolítica. Teniendo en cuenta estos resultados se podría sugerir que la interacción de las células BCS-TC2 con matrigel no induce la secreción de gelatinasas por parte de las células BCS-TC2.

Por otro lado, se procedió a estudiar si en el medio condicionado por tumores se detectaba la presencia de actividad de MMPs. Tanto en los tumores obtenidos en presencia de matrigel o laminina, como en los tumores que, esporádicamente, crecieron en ausencia de matrigel, se detecta actividad gelatinolítica (Figura 51B), sin que exista una gran diferencia entre las distintas muestras. Esto podría deberse a la secreción de MMPs por parte de las células del tumor. El mismo patrón de gelatinasas se obtiene en medio condicionado de tumores originados al inyectar las células BCS-TC2.1 o BCS-TC2.2. En todos los casos se observan tres bandas mayoritarias de actividad gelatinolítica de 92 kDa, 68-72 y 64 kDa, que podrían asignarse a las MMP-9 y MMP-2 (Figura 51B). La MMP-9 aparece como una única banda ya que podría estar en forma zimógena o precursora en el tumor. Se ha descrito que, en el zimograma, las formas precursoras presentan actividad porque sufren una autoactivación por su parcial y reversible desnaturalización por el tratamiento con SDS (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; Springman *et al.*, 1990). Las otras dos bandas de actividad corresponden probablemente a la forma latente (68-72 kDa) y activada (64 kDa) de la MMP-2. Esta activación se debe a la eliminación total o parcial del propéptido por alguna actividad proteolítica presente en el medio condicionado, lo que conllevaría la disminución de la masa molecular. Por otro lado, es probable que exista en la superficie de las células que forman el tumor la metaloproteinasa de membrana (MT-MMP-1) que induce la activación de la MMP-2 (Sato *et al.*, 1996).

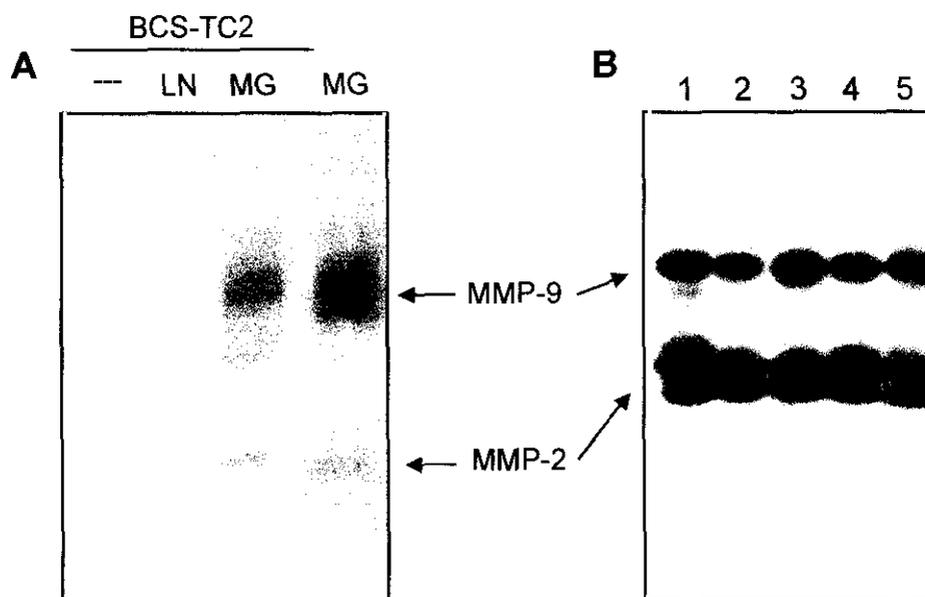


Figura 51.- Detección de actividades gelatinolíticas en el medio condicionado por células BCS-TC2 y por los tumores obtenidos tras inyección subcutánea de los diferentes tipos de células.

El medio condicionado se obtiene como se describe en Materiales y Métodos. Se cargan 40 μ g (A) o 7 μ g (B) de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS conteniendo gelatina al 0,1%. El resultado se muestra como el negativo del gelatinograma. (A) Gelatinograma de medios condicionados por las células BCS-TC2 creciendo sobre plástico (---), sobre laminina (LN), y sobre matrigel (MG) durante 24 horas. En el último pocillo (MG) se aplica matrigel como control. (B) Gelatinograma del medio condicionado de tumores producidos tras inyección subcutánea de las células BCS-TC2 (1), células BCS-TC2 en presencia de laminina (2), células BCS-TC2 en presencia de matrigel (3), células BCS-TC2.1 (4) y células BCS-TC2.2 (5).

Sin embargo, de estos resultados no se puede concluir, por tanto, si son las células transformadas humanas del tumor o bien las células del estroma del ratón, las responsables de la actividad gelatinolítica observada en los análisis de los medios condicionados por tumores. En adenocarcinomas de colon humano se ha detectado el mRNA de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 (Onisto *et al.*, 1993). La MMP-2 puede ser sintetizada tanto por las células malignas (Garbisa *et al.*, 1990; Grigioni *et al.*, 1994) como por las células del estroma adyacente al tumor (Poulsom *et al.*, 1992; Pyke *et al.*, 1993), siendo este último caso más frecuente. En el caso de la MMP-9, se ha descrito la expresión de su mRNA en los macrófagos o neutrófilos que rodean al epitelio maligno, pero no se detecta mRNA en las células epiteliales del colon (Pyke *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1996).

Por tanto, se procedió a analizar la actividad presente en el medio condicionado de las células BCS-TC2 y de las sublíneas tumorigénicas. Los resultados se recogen en la figura 52. En los medios condicionados por ambas sublíneas se detectan dos bandas en torno a los 92 kDa, que corresponden a la forma latente y activada de la MMP-9, así como

dos bandas de 68-72 kDa y 64-62 kDa, que corresponden a las formas latente y activada, de la MMP-2. Estos resultados indican que las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 son capaces de secretar ambas enzimas degradativas. Las células BCS-TC2 no presentan, o presentan muy baja, actividad gelatinolítica MMP-2 y MMP-9 (Figura 52A).

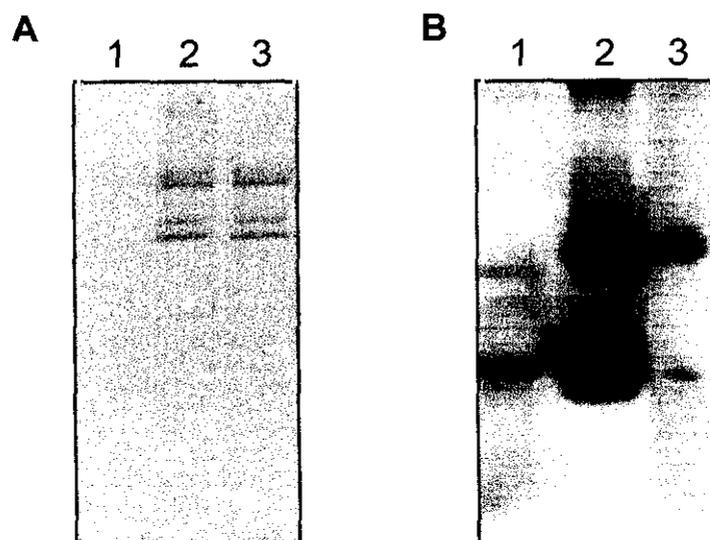


Figura 52.- Análisis de la actividad gelatinolítica presente en el medio condicionado por las células parentales y las sublíneas creciendo *in vitro*. Influencia del cocultivo con fibroblastos.

El medio condicionado se obtiene como se describe en Materiales y Métodos. Se aplicaron 40 μ g de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS conteniendo gelatina al 0,1%. El resultado se muestra como el negativo del gelatinograma. (A) Medio condicionado por células BCS-TC2 (1), células BCS-TC2.1 (2) o células BCS-TC2.2 (3). (B) Medio condicionado por células BCS-TC2.1 solas (1), por células BCS-TC2.1 cocultivadas con fibroblastos (2), o por fibroblastos (3).

Cuando las células BCS-TC2.1 se cocultivan con fibroblastos, se observa un gran incremento de la actividad gelatinolítica, como se observa en la figura 52B, siendo el efecto ejercido por las células del estroma sobre la producción de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 sinérgico. Esto sugiere que las células tumorales y las del estroma cooperan en la producción de colagenasas. Cocultivos de células tumorales y del estroma han mostrado que las MMPs pueden ser inducidas por contactos célula-célula (Himmelstein *et al.*, 1994) y por factores solubles (Ito *et al.*, 1995). De este modo, se ha descrito que las células del estroma pueden inducir la secreción de MMPs por las células invasivas (Lengyel *et al.*, 1995; Kurogi *et al.*, 1996) o bien, las células tumorales pueden aumentar la secreción de estas enzimas por las células del estroma (Poulsom *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1996).

Numerosos estudios han descrito una correlación entre la producción por células transformadas de las formas precursoras de las MMP-2 y/o MMP-9 y el potencial invasivo y metastático (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Tryggvason *et al.*, 1993; Naylor *et al.*, 1994;

Kawamata *et al.*, 1995). Además, se ha conseguido prevenir la invasión tumoral y la metástasis *in vitro* e *in vivo* inhibiendo las MMPs, lo que ha demostrado la implicación de estas enzimas en dichos procesos (Albini *et al.*, 1991; Melchiori *et al.*, 1992).

Tanto las células BCS-TC2.1 como las BCS-TC2.2 secretan MMP-9 y MMP-2 en forma latente y activada. La producción de la MMP-9 en células de cáncer de colon es diversa. Algunos autores indican que las células epiteliales de adenocarcinoma de colon no producen la MMP-9 o lo hacen en muy baja cantidad como para ser detectada (Nielsen *et al.*, 1996). Otros, sin embargo, consiguen ver inmunoreactividad con anticuerpos policlonales frente a la MMP-9 en las células tumorales (Jeziorska *et al.*, 1994). En este sistema, los niveles del mRNA de esta proteína no se han podido detectar por *Northern Blot*, lo que sugiere la existencia de muy bajos niveles de mRNA en las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2.

El análisis mediante *Northern Blot* de la expresión del mRNA de MMP-2 muestra un transcrito de 3,1 Kb, con una intensidad similar de la banda en la línea parental y en las sublíneas (Figura 53). Estos datos indican que las células parentales BCS-TC2 expresan el mismo nivel de mRNA para MMP-2 que las sublíneas tumorigénicas. Sin embargo, la actividad de MMP-2 sólo se detecta en el medio condicionado de las sublíneas con capacidad tumorigénica.

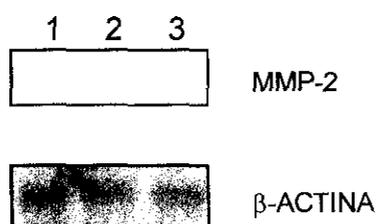


Figura 53.- Expresión del mRNA de MMP-2 mediante *Northern Blot*.

7µg de mRNA de las muestras obtenidas de cultivos subconfluentes de (1) células BCS-TC2, (2) células BCS-TC2.1 y (3) células BCS-TC2.2 se sometieron a análisis mediante *Northern Blot* como se indica en Materiales y Métodos. Cada pocillo contiene cantidades equivalentes de mRNA como se determinó por hibridación con β-actina.

Puesto que la expresión de MMPs está sometida a un estricto control, se podrían considerar distintas posibilidades para explicar el resultado obtenido para la MMP-2 en las células BCS-TC2:

- a) La línea parental podría secretar MMP-2 como forma precursora inactiva; en el zimograma, se detectaría actividad, ya que ésta se activa por el tratamiento con SDS (Stetler-Stevenson *et al.*, 1989; Springman *et al.*, 1990).

b) La MMP-2 se podría encontrar inactiva por unión a su inhibidor específico TIMP-2. Pero la MMP-2 se activaría en el zimograma ya que el inhibidor se disocia de ella en las condiciones en que se realiza la electroforesis (Rice y Banda, 1995). Estas dos posibilidades se podrían descartar, puesto que en el zimograma no se detecta ninguna banda correspondiente a la MMP-2.

c) En las células BCS-TC2, el proceso de traducción del mRNA de MMP-2 podría estar bloqueado. En este sentido se ha descrito que no se traducen ciertos mRNAs en algunos tipos celulares, como el mRNA del activador de plasminógeno tisular en oocitos primarios (Huarte *et al.*, 1992). Se trataría de un bloqueo selectivo en las células BCS-TC2.

d) En las sublíneas el mRNA de la MMP-2 podría estar más estabilizado, incrementándose su vida media, lo que origina la producción de MMP-2. Este hecho se ha observado en células epiteliales bronquiales humanas tratadas con lipopolisacáridos lo que hace que se incrementen los niveles de proteína activa MMP-9 (Yao *et al.*, 1996).

e) La secreción de MMP-2 podría estar bloqueada en la línea parental.

Las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 secretan MMP-9 y MMP-2 al medio de cultivo tanto en forma de proenzima como parcialmente activa. La MMP-2 no se activa por acción de proteinasas exógenas, como ocurre con otras MMPs. El mecanismo de activación *in vivo* no se conoce, pero se piensa que tiene lugar en la membrana plasmática tras la unión de la pro-MMP-2 a activadores o receptores específicos de la superficie celular (Young *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1996). Entre ellos se encuentran metaloproteinasas de membrana (MT-MMP-1 y MT-MMP-2) capaces de activar a MMP-2 (Sato *et al.*, 1994; Takino *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996). La forma activada de MMP-2 se encuentra enriquecida en las membranas de células malignas, en particular en los "invadopodia", o sitios de invasión celular (Monsky *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Azzam *et al.*, 1993). Además, en estas localizaciones se ha descrito que MMP-2 puede interactuar con la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Brooks *et al.*, 1996).

Por ello, se procedió a analizar, mediante zimograma, la actividad gelatinolítica asociada a la membrana celular en las tres líneas estudiadas (Figura 54). En todos los casos aparece una banda que corresponde a una proteína de 62 kDa, masa molecular que coincide con la forma activa de la MMP-2. Por tanto, en la superficie de las células existen receptores/activadores de la MMP-2. La activación en la membrana celular podría tener lugar a través de una cascada de activación en la que esté implicada una metaloproteinasa de membrana (Atkinson *et al.*, 1995; Will *et al.*, 1996).

Las células parentales, que no secretaban al medio de cultivo MMP-2, también

presentan esta forma activa en su membrana, hecho que se puede explicar considerando que: a) la poca proteína secretada queda en la superficie celular en concentración local suficiente como para detectarse, o b) esta proteína no se secreta al medio de cultivo por un bloqueo del proceso de secreción, posibilidad que se ha comentado anteriormente, aunque en este caso probablemente la MMP-2 aparecería como forma latente.

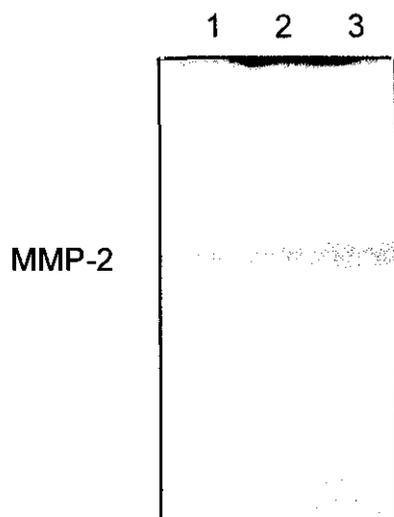


Figura 54.- Análisis mediante zimograma de la actividad gelatinolítica asociada a la membrana celular de células creciendo *in vitro*.

La fracción de membrana de (1) células BCS-TC2, (2) células BCS-TC2.1 y (3) células BCS-TC2.2 se obtiene por extracción con Triton X-114 como se indica en Materiales y Métodos. Igual cantidad de proteína de cada muestra se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, conteniendo gelatina al 0,1% (p/v). El resultado se muestra como el negativo del gelatinograma.

La matrilisina, metaloproteínasa es específica de células epiteliales (Wilson *et al.*, 1995), también induce específicamente la activación de las pro-MMPs (Crabbe *et al.*, 1994). Su mRNA se detecta en el 75% de los cánceres de colon humano (McDonnell *et al.*, 1991), y es expresado por las propias células transformadas (Pyke *et al.*, 1993), lo que sugiere que puede participar en la invasión de las células de cáncer de colon. La expresión de su mRNA se correlaciona con la progresión de tumores colorrectales y puede participar en el desarrollo de metastasis en el hígado (Ishikawa *et al.*, 1996). Por ello, se procedió a estudiar la expresión del mRNA de esta metaloproteínasa en las tres líneas estudiadas. El análisis por *Northern Blot* (Figura 55A) indica que las células parentales no expresan el mRNA de matrilisina, mientras que sí lo hacen las líneas tumorigénicas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2, siendo esta última la que presenta la mayor expresión. Aunque no se puede descartar el hecho de que el mRNA sintetizado no sea traducido a proteína, en estudios previos en tejidos humanos se ha visto una correlación entre la expresión del mRNA y la

proteína matrilisina (McDonnell *et al.*, 1991; Powel *et al.*, 1993; Rodgers *et al.*, 1993). Así, se puede suponer que la relación que existe en los niveles de mRNA sintetizados se mantendrá en la proteína secretada. Este hecho se ha verificado evaluando, mediante transferencia electroforética e inmunodetección, los niveles de matrilisina presentes en el medio condicionado por las células (Figura 55B)

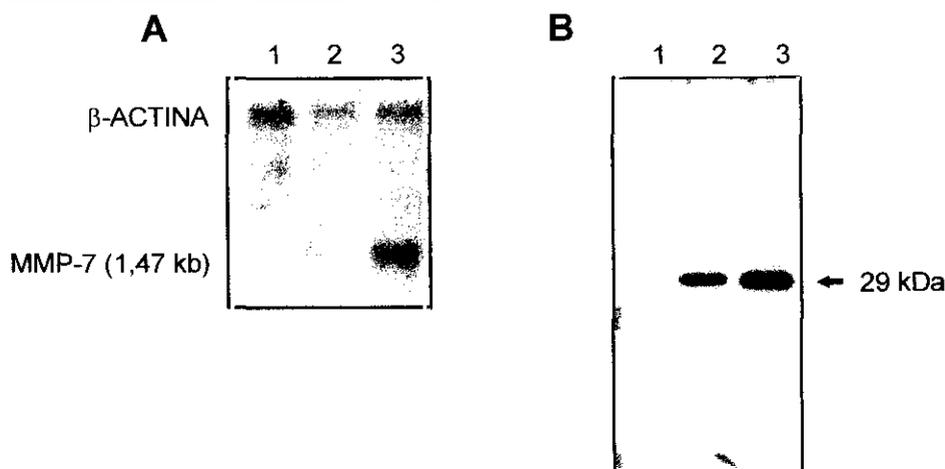


Figura 55.- Expresión de matrilisina (MMP-7) en células BCS-TC2 y en las sublíneas celulares.

(A) Expresión del mRNA de MMP-7 mediante *Northern Blot*. 7 μ g de mRNA de las muestras obtenidas de cultivos subconfluentes de las diferentes líneas [(1) BCS-TC2, (2) BCS-TC2.1 y (3) BCS-TC2.2] se sometieron a análisis mediante *Northern Blot* como se indica en Materiales y Métodos. Como control se utilizó la hibridación con β -actina. (B) Expresión de MMP-7 mediante *Western Blot*. 20 μ g de proteína de los medios condicionados por las células se analizan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en presencia de SDS, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y se someten a inmunodetección como se indica en Materiales y Métodos. El anticuerpo antimatrilisina se emplea a una dilución 1:1000 y el anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa a 1:3000. El revelado se lleva a cabo por ECL.

La expresión de la matrilisina en el sistema de estudio, se correlacionan con el potencial tumorigénico de las células (Figura 55). La matrilisina, incluso a bajas concentraciones, influye altamente en el potencial invasivo de las células que la expresan (Witty *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995) debido principalmente al amplio rango de sustratos que degrada (incluso entactina) (Sires *et al.*, 1993) además de su capacidad para activar a la uroquinasa. La expresión de matrilisina en las células de adenocarcinoma de colon SW480 incrementa su capacidad tumorigénica, sugiriéndose que esta enzima puede estar implicada en el crecimiento y la proliferación celular (Witty *et al.*, 1994). Puesto que las células BCS-TC2 no expresan matrilisina, o la expresan en pequeñas cantidades como para poder ser detectada, es probable que la interacción con matrigel origine la selección de células que expresen la enzima, lo que representaría una ventaja para su crecimiento y proliferación frente al resto de las células.

La participación de las proteinasas en el desarrollo inicial de un tumor no se conoce. Sin embargo, una hipótesis propone la selección de clones de células epiteliales que no sufren apoptosis en respuesta a la proteólisis de su lamina basal, como ocurre con las células normales (Boudreau *et al.*, 1995). Un segundo modelo sugiere que la proteólisis de componentes de la ECM genera fragmentos proteicos que son capaces de incrementar la viabilidad de las células tumorales (Montgomery *et al.*, 1994).

Por lo tanto, la selección de una subpoblación de células BCS-TC2 por la interacción de las células con el matrigel, con un diferente patrón de integrinas y con mayor potencial tumorigénico puede también asociarse con la inducción de mecanismos que promueven la síntesis de metaloproteinasas. Estos mecanismos podrían ser iniciados por las integrinas, puesto que ellas son capaces de modular los niveles de MMPs, lo que facilitaría el proceso tumorigénico (Huhtala *et al.*, 1995; Tremble *et al.*, 1995; Chintala *et al.*, 1996).

3.5.7. ESTUDIOS RELATIVOS AL GEN *p53*

Uno de los cambios genéticos más frecuente en los procesos tumorales que afectan al colon son las mutaciones en el gen *p53*. Con objeto de verificar si la diferencia en la capacidad tumorigénica se refleja en alteraciones en el gen *p53* se procedió a determinar la presencia de mutaciones en la línea parental y si se producen diferencias en las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2. La secuenciación del gen *p53* en diversos sistemas ha puesto de manifiesto la existencia de cinco dominios altamente conservados, cuatro de los cuales se encuentran en los exones 5 al 8. Por este motivo, la mayor parte de los análisis se han limitado a esos exones, ya que la existencia de mutaciones fuera de los mismos es poco frecuente. El análisis del exón 8 del gen *p53* mediante estudios de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y secuenciación pone de manifiesto la existencia de una mutación en dicho exón, en las tres líneas celulares objeto de estudio (Figura 56), afectando esta mutación a uno de los alelos. La secuenciación del exón 8 de este gen ha permitido detectar un cambio CGG (Arg) a TGG (Trp) en el codon 282, respecto de la secuencia control (Figura 56C). Los resultados obtenidos para estas células están de acuerdo con los datos descritos en la bibliografía que indican que el 79% de las mutaciones en el gen *p53* en cáncer de colon son sustituciones de las bases G:C por A:T, estando presentes la mayoría en dinucleótidos CpG. Esto conduce a la sustitución de aminoácidos en cuatro regiones de la proteína conservadas entre diferentes especies (residuos 117-142, 171-181, 234-258 y 270-286). Dado que se obtiene la misma mutación en las células no tumorigénicas que en las sublíneas, la mutación en este gen no es responsable de la inducción de la capacidad tumorigénica en estas células. Se ha descrito que las mutaciones en el gen *p53* pueden ocurrir durante el establecimiento de células en cultivo. De esta

manera, durante la propagación *in vitro* de las células, el gen *p53* podría adquirir mutaciones no presentes en la línea celular parental. En estas líneas, la mutación probablemente no es el resultado del cultivo continuado de las células, sino que debía existir en el tumor original del que se obtuvieron las células.

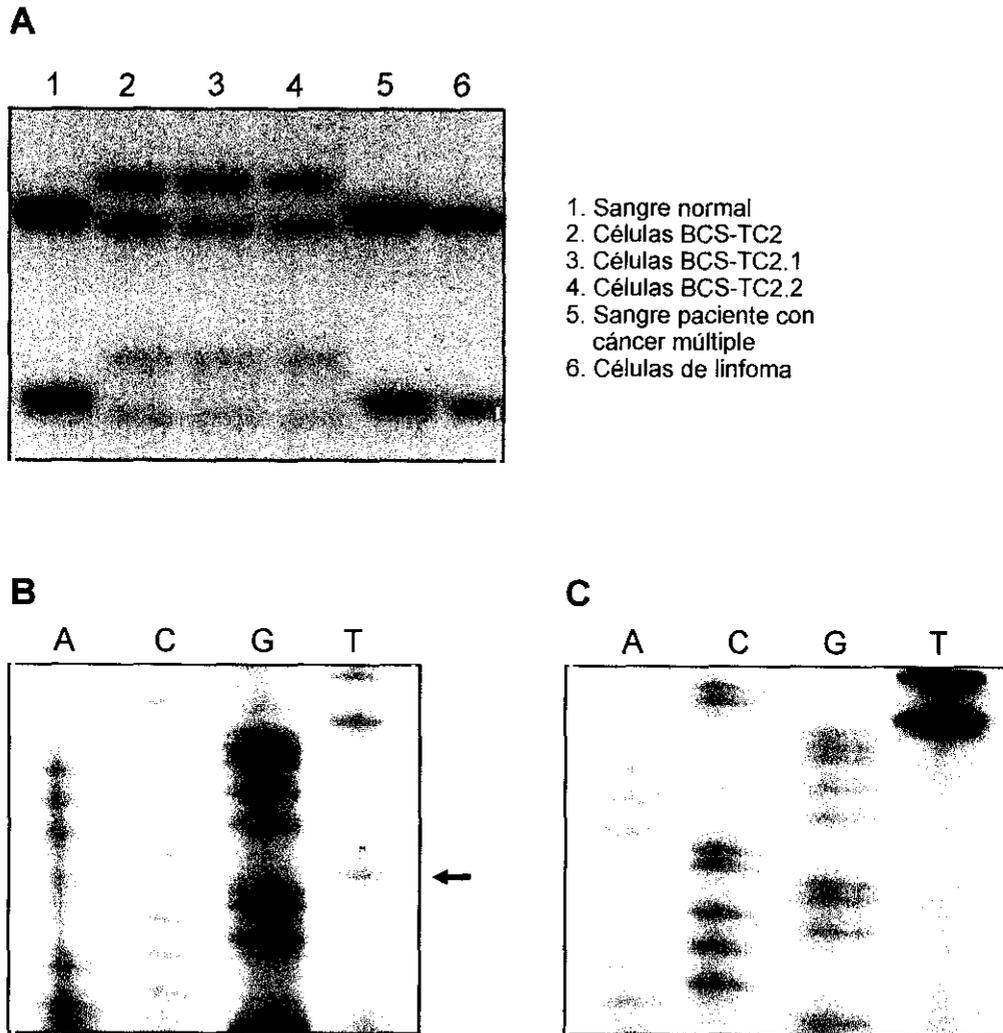


Figura 56.- Análisis de mutaciones en el gen *p53*

(A) Análisis por estudios de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de mutaciones en el gen *p53* de (1) las células parentales, (2) células BCS-TC2.1 y (3) células BCS-TC2.2 respecto de células control (1, 5 y 6). (B) Secuencia del exón 8 del gen *p53* de las células BCS-TC2.1. La flecha indica la sustitución de C por T. La misma sustitución se detecta en las células BCS-TC2 y BCS-TC2.2. (C) Secuencia del exón 8 del gen *p53* no mutado.

La pérdida de la función de la proteína *p53* por mutación en el gen o por otras causas, daría lugar a una alteración de la reparación del DNA y, en consecuencia, a una mutagénesis incrementada después de la entrada en la fase S. No todas las mutaciones son funcionalmente equivalentes. Las que ocurren en dominios conservados en la evolución

muestran un peor pronóstico que las que ocurren fuera de estos dominios. Además, la diseminación linfática y la metástasis en órganos distantes también se asocia con mutaciones dentro de estas regiones. En particular, las mutaciones en el codón 175 son particularmente agresivas (Goh *et al.*, 1995).

3.5.8. INESTABILIDAD GENÉTICA

Una característica común de las células malignas es la presencia de un genoma inestable. Esta inestabilidad origina una serie de mutaciones que contribuyen a evitar los mecanismos de control del crecimiento normal y a la adquisición de un fenotipo maligno. Por este motivo, se planteó estudiar si la expresión del fenotipo tumorigénico en las sublíneas celulares BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 se encontraba asociado con la inestabilidad genética en microsatélites, alteración que se produce en ciertos tipos de adenocarcinomas de colon.

Inestabilidad de microsatélites en la línea celular parental y en las sublíneas

Para determinar posibles diferencias entre las células parentales y las sublíneas, se analizaron las posibles alteraciones genéticas en secuencias de microsatélites localizadas en diferentes cromosomas. Para ello se utilizaron marcadores de repeticiones de dinucleótidos $(CA)_n$ y de trinucleótidos $(CAG)_n$, y una región VNTR rica en secuencias A/T.

La inestabilidad genética en microsatélites origina una alteración en el número de repeticiones de la secuencia de microsatélites básica. Esto se traduce en un cambio en el tamaño de los alelos que se identifica por una diferente movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Como se observa en la figura 57, las dos sublíneas presentan un diferente patrón de bandas al analizar los marcadores de dinucleótidos $(CA)_n$, cuando se comparan con la línea parental BCS-TC2. Se observa una menor movilidad de las bandas cuando se analizan los marcadores RHO y D6S105, lo que indica la presencia de alelos de mayor tamaño que en las células parentales. Por el contrario, en las localizaciones DMD44, DMD45 y D4S127 se observan alelos de menor tamaño (Figura 57). En algunos casos, (marcadores DMD44 y DMD45) las dos sublíneas tumorigénicas presentan un patrón de bandas similar que difiere del obtenido para las células BCS-TC2. Sin embargo, cuando se estudia el marcador D4S127 se aprecian diferencias entre las tres líneas (Figura 57). Las alteraciones en marcadores localizados en el cromosoma 2 son frecuentes en cáncer colorrectal familiar, y también en cánceres colorrectales esporádicos, aunque con una menor incidencia. Se sugiere que mutaciones en un gen, relacionado con el marcador D2S123 podría conferir alta susceptibilidad al cáncer colorrectal (Aaltonen *et al.*, 1993). Por ello se analizó la inestabilidad genética de las sublíneas usando los marcadores D2S123

y D2S119 (ambos localizados en el cromosoma 2). Sólo se detectan diferencias en la movilidad de los alelos en el caso del marcador D2S123 cuando se comparan las células parentales con ambas sublíneas, no existiendo diferencias entre las últimas (Figura 58).

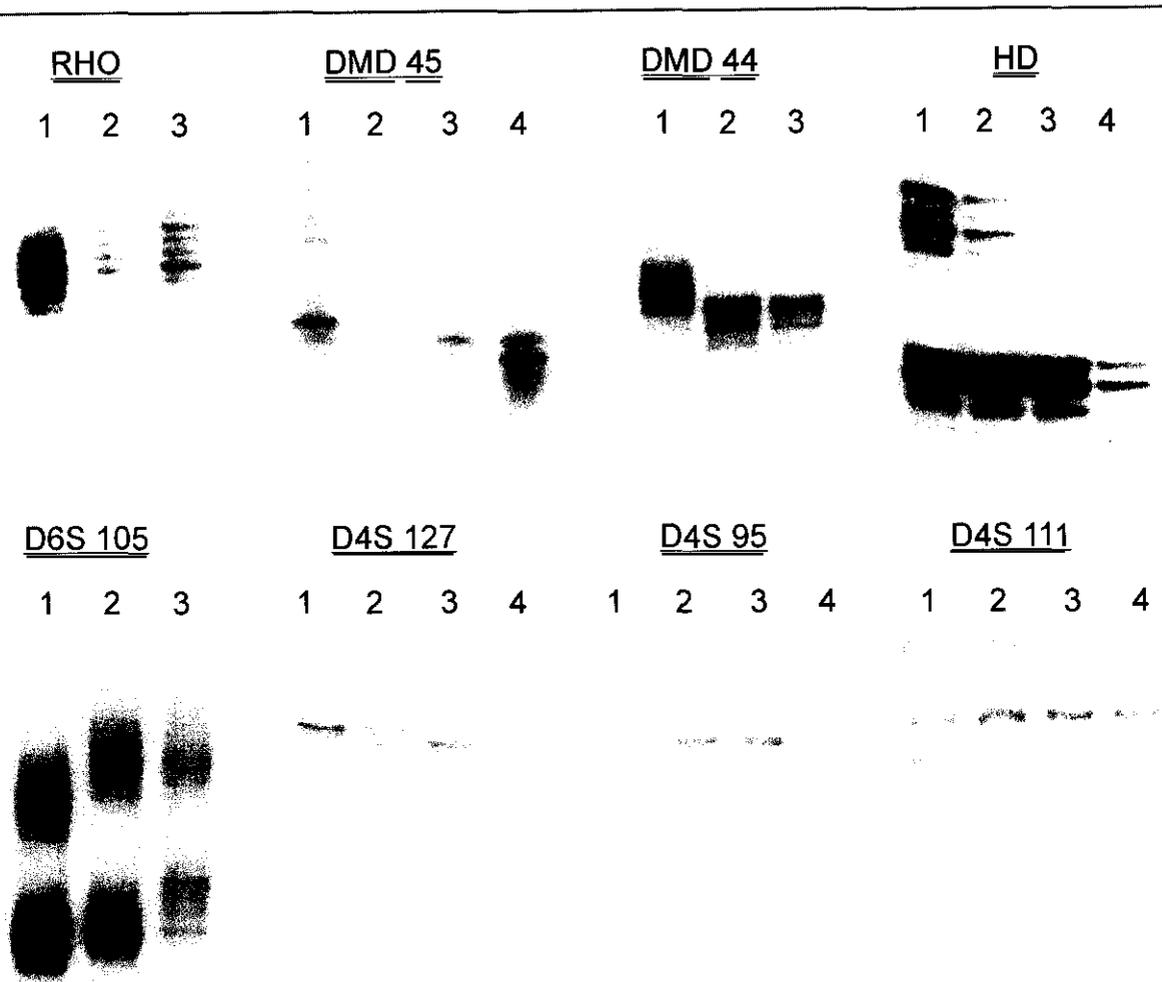


Figura 57.- Análisis de la inestabilidad genética de microsatélites en las células parentales y en las sublíneas.

El DNA genómico de las diferentes líneas celulares [(1) células BCS-TC2, (2) células BCS-TC2.1, (3) células BCS-TC2.2 (pasaje 2-4) y (4) células BCS-TC2.2 (pasaje 19)] se somete a amplificación por PCR usando los marcadores de repetición indicados en la figura. Los productos de amplificación por PCR se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6-9% de acuerdo al tamaño del fragmento. Estos resultados fueron confirmados al menos en 3 amplificaciones por PCR distintas.

Normalmente muchas de las alteraciones en microsatélites suelen ser silenciosas, pero algunas pueden originar alteraciones en las proteínas codificadas por los genes; las repeticiones de trinucleotidos, por ejemplo, se encuentran frecuentemente en regiones

codificadoras (Caskey *et al.*, 1992; Yoshitaka *et al.*, 1996). Para determinar si las alteraciones observadas en las sublíneas están relacionadas únicamente con repeticiones en dinucleotidos, se estudió el marcador HD, una repetición de tipo trinucleotido (CAG)_n. En este caso, el patrón de bandas observado para la línea parental y para las células BCS-TC2.1 es similar, aunque existen diferencias en la intensidad de las bandas. Sin embargo, en las células BCS-TC2.2 se observa la pérdida de un alelo (Figura 57). Estas alteraciones en repeticiones de trinucleotidos se han descrito en tumores de cáncer colorrectal familiar (Aaltonen *et al.*, 1993) y en líneas celulares de cáncer de colon humanas (Shibata *et al.*, 1994). También se llevaron a cabo estudios con el marcador VNTR (D4S95), rico en secuencias A/T. Como se puede observar en la figura 57, las células BCS-TC2 y la sublínea BCS-TC2.1 también presentan en este caso un patrón de bandas similar (aunque existe diferencia en la intensidad), mientras que en las células BCS-TC2.2 se observa la desaparición de un alelo. Por tanto, es posible que las alteraciones en repeticiones de dinucleotidos y de trinucleotidos estén reguladas por el mismo mecanismo sin que influya el tamaño de la unidad o la secuencia que se repite.

Los resultados indican que las células BCS-TC2.1 muestran diferencias en varias secuencias de microsatélites con respecto a la línea parental, lo que indica la existencia de inestabilidad genética. Como ocurre en otros casos (Thibodeau *et al.*, 1993), las alteraciones son bastante variables, teniendo lugar desde cambios en dos pares de bases a cambios mayores en la longitud. Esto se traduce en un diferente desplazamiento de bandas como resultado de alelos de mayor o menor tamaño, e incluso la desaparición de alelos. La inestabilidad genética se mantiene a través de pasajes *in vivo* e *in vitro*, como se observa cuando se comprueba la inestabilidad genética en la sublínea BCS-TC2.2. Las diferencias observadas entre las dos sublíneas se podría justificar considerando que, durante la propagación *in vivo*, el número de replicaciones de las células tumorales es más elevado, por lo que es probable que tengan lugar errores en la replicación. Kobayashi *et al.* han estudiado el mantenimiento de las características genéticas de melanomas humanos en estadio temprano, durante su pasaje *in vivo* en presencia de matrigel. Utilizando una sonda de DNA humana específica para la secuencia de satélites α en el cromosoma 17, han comprobado que algunas de las variantes tumorigénicas muestran un patrón de bandas similar, pero no idéntico, al de la línea celular parental. Estos autores sugieren que durante los pasajes *in vivo* tienen lugar alteraciones en el DNA (Kobayashi *et al.*, 1994).

Los estudios realizados de inestabilidad genética con líneas celulares establecidas son, hasta la fecha, escasos. Varias líneas celulares de cáncer de colon (DLD-1, HCT15, LoVo, LS174-T, LS180 y HCT116) muestran una frecuencia de mutación unas mil veces superior que las células normales o las células tumorales sin fenotipo mutador (Shibata *et al.*, 1994). Al contrario, fibroblastos y otras líneas celulares de tumor de colon (SW480 y

SW620) no presentan inestabilidad genética. Estos estudios proponen que la inestabilidad es un hecho inicial en la oncogénesis y que puede persistir después de la transformación maligna (Shibata *et al.*, 1994).

Inestabilidad de microsatélites durante la propagación *in vitro*

Es posible que la inestabilidad de microsatélites surja durante el cultivo de las células y que no sea el resultado directo de la coinyección de las células con matrigel. Por ello, se estudió la inestabilidad genética de las sublíneas durante su propagación *in vitro*. Como se observa en la figura 58, una vez estabilizado el cultivo, no se produce desplazamiento de bandas a lo largo de los sucesivos pasajes de tripsinización, en ninguna de las sublíneas para los 5 marcadores estudiados. Únicamente se observan ligeras modificaciones durante los estadios iniciales del establecimiento de las líneas celulares. Por tanto, aunque el pasaje *in vivo* induce inestabilidad genética, las sublíneas tumorigénicas no la muestran durante su propagación *in vitro*. La fidelidad de replicación de los microsatélites por las células progenitoras del colon puede ser mantenida en condiciones normales por al menos 10.000 replicaciones. Pese a ello, la incidencia de las mutaciones puede estar linealmente relacionada con el número de replicaciones de las células tumorales (Ionov *et al.*, 1993).

Hay que considerar que los nuevos alelos observados en las sublíneas tumorigénicas podrían ser simplemente el reflejo de una inestabilidad inherente en la línea parental. Para comprobar este aspecto, se realizó un análisis comparativo de las células BCS-TC2 establecidas y mantenidas en cultivo durante varios años, con respecto a células procedentes de los pasajes 5 a 8, 30, 60 y 80. Los resultados se recogen en la figura 59.

Como se puede apreciar, el análisis de 7 marcadores diferentes indica que no se producen diferencias en el tamaño de los alelos a lo largo del cultivo continuado, incluso cuando se utilizan marcadores con los que se aprecian diferencias entre la línea parental y las sublíneas obtenidas *in vivo*. Sólo con algún marcador (DMD45 y D2S123) se pueden apreciar ligeras diferencias entre los alelos. Sin embargo, a partir del establecimiento de las células en cultivo (aproximadamente el pasaje 30 de tripsinización) la posible inestabilidad desaparece. Por tanto, estos experimentos sugieren que no existe inestabilidad genética durante el cultivo *in vitro* de las células BCS-TC2. Este resultado se podría explicar considerando diferentes posibilidades. Es probable que las células parentales no presenten inestabilidad genética en secuencias de microsatélites, como se ha indicado que ocurre en otras líneas celulares de carcinoma de colon, como SW480 o SW620 (Shibata *et al.*, 1994). Otra posibilidad puede ser que la velocidad de mutación de las células BCS-TC2 sea extremadamente baja, aunque no parece muy probable, puesto que estas células se han

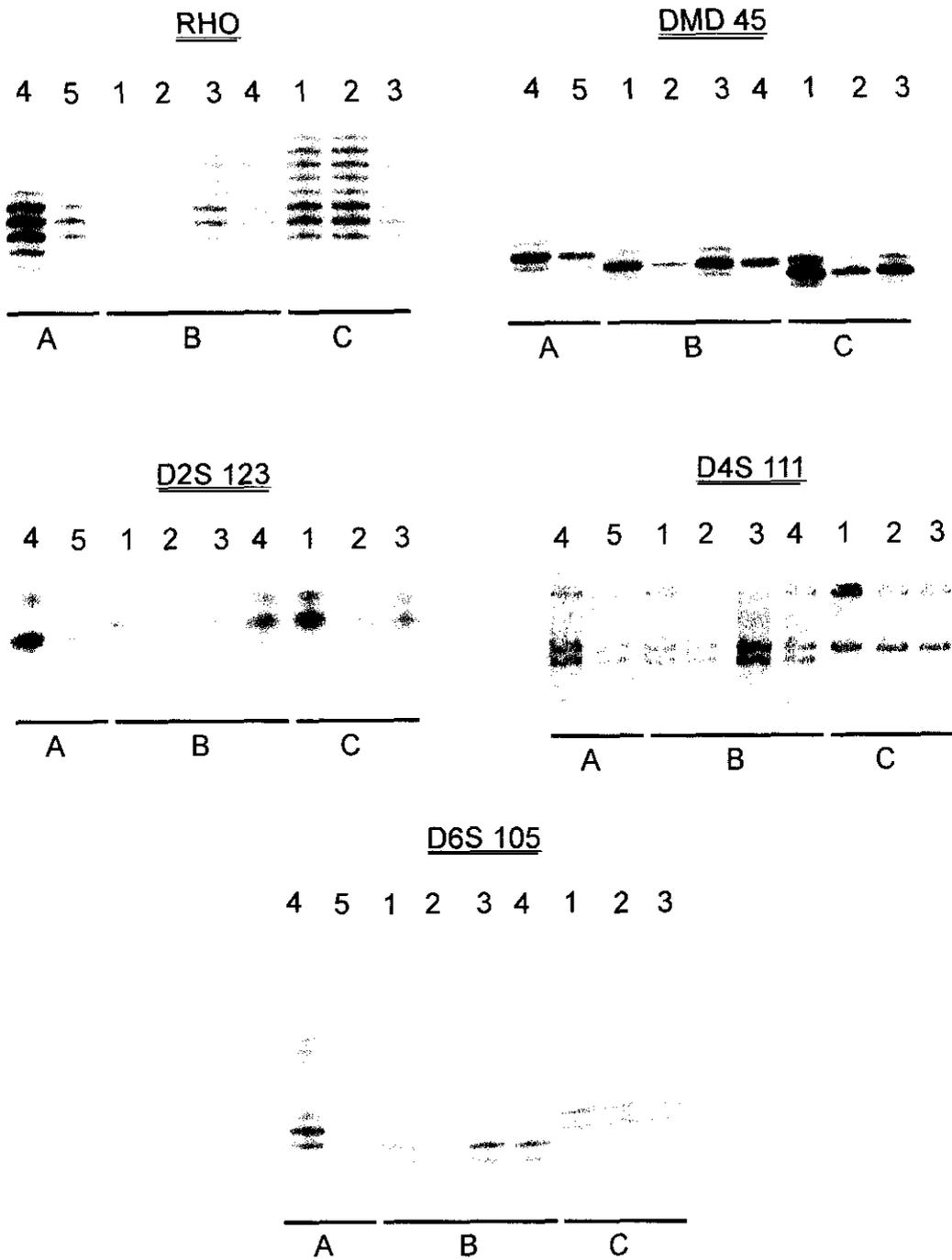


Figura 58.- Inestabilidad de microsatélites durante la propagación *in vitro*.

El DNA genómico de las células [(A) BCS-TC2, (B) BCS-TC2.1 y (C) BCS-TC2.2], en diferente pasaje de tripsinización, se somete a amplificación por PCR utilizándose los marcadores indicados en la figura. Los productos de amplificación se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6-9% de acuerdo al tamaño del fragmento. (1) Células del pasaje 20, (2) del pasaje 30, (3) del pasaje 60, (4) del pasaje 80, o (5) células obtenidas tras más de 100 pasajes de tripsinización. Los resultados fueron confirmados al menos en 3 amplificaciones por PCR distintas.

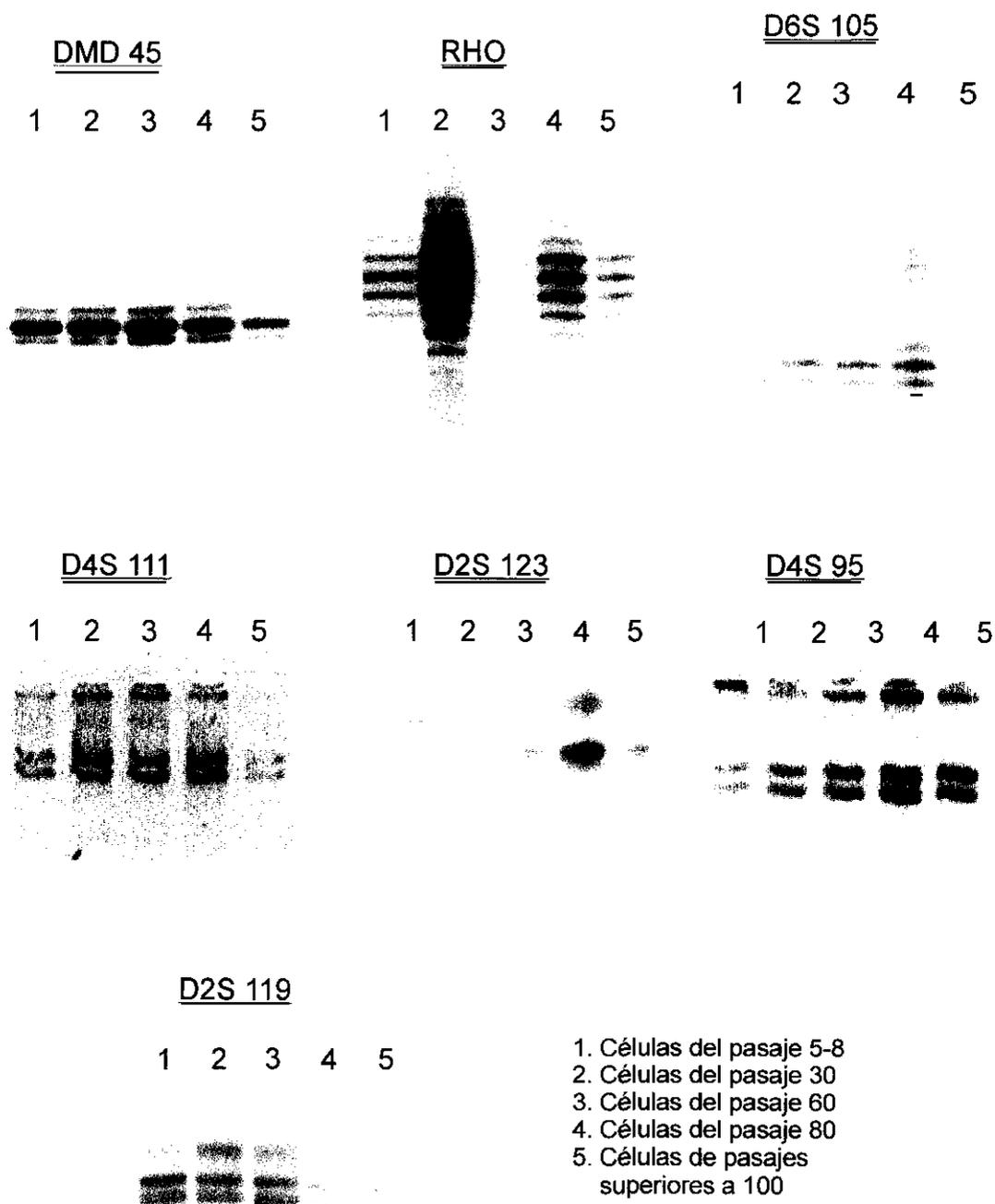


Figura 59.- Análisis de la inestabilidad genética de microsatélites en las células BCS-TC2.

El DNA genómico correspondiente a células BCS-TC2 obtenidas en diferentes pasajes de tripsinización se somete a amplificación por PCR. Se utilizan los marcadores indicados en la figura. Los productos de amplificación por PCR se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6-9% de acuerdo al tamaño del fragmento. [(1) Células BCS-TC2 del pasaje 5-8, (2) del pasaje 30, (3) del pasaje 60, (4) del pasaje 80, o (5) células obtenidas tras más de 100 pasajes de tripsinización]. Los resultados fueron confirmados en, al menos, 3 amplificaciones por PCR distintas.

cultivado de manera continua durante años y el número de replicaciones ha sido muy elevado. Una tercera posibilidad consiste en que el fenotipo mutador, original de estas células, haya revertido por otra mutación en los primeros estadios después de la transformación y, así, las células obtenidas del tumor muestran un fenotipo aparentemente estable. En este sentido, en tumores de cáncer de colon se ha descrito una aparente estabilización de la inestabilidad de microsatélites (Shibata *et al.*, 1994).

Inestabilidad genética en el tejido tumoral

Para comprobar este aspecto, se analizó el comportamiento de secuencias de microsatélites comparando el tejido normal (colon) y tumoral (adenocarcinoma de colon) del paciente a partir del cual se estableció en cultivo la línea celular BCS-TC2. En la figura 60 se observa un desplazamiento de bandas en el DNA del tumor respecto del DNA del tejido de colon control. Estas alteraciones en las movilidades electroforéticas incluyen alelos de mayor tamaño, como ocurre para los marcadores RHO o D6S105, o de menor tamaño, como en los marcadores DMD45 y D2S123 (Figura 60). Los resultados indican, por tanto, que las células que forman el tumor presentan inestabilidad genética, puesto que se produce alteración en más de dos marcadores. De acuerdo con otros resultados descritos (Aaltonen *et al.*, 1993), el tumor sería de tipo RER⁺ (*replication errors*), que indica la existencia de errores durante la replicación. Estas diferencias en dinucleótidos entre el tejido normal y el tumoral se ha encontrado tanto en HNPCC (Aaltonen *et al.*, 1993; Cama *et al.*, 1996), como en cánceres relacionados con HNPCC y tumores esporádicos en otros órganos (Han *et al.*, 1993; Risinger *et al.*, 1993). La presencia de inestabilidad se correlaciona inversamente con mutaciones en los genes *p53* y *k-ras* y con tumores que presentan metástasis en el momento de la diagnosis. Sin embargo, se correlaciona directamente con tumores poco diferenciados y con los localizados en el colon proximal (Thibodeau *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993; Shibata *et al.*, 1994; Watatani *et al.*, 1996). Coincidiendo con estas observaciones, el tumor original del que provienen las células BCS-TC2 es poco diferenciado y localizado en el colon proximal. Por el contrario, las células procedentes del tumor presentan, al menos, una mutación en una secuencia conservada del gen *p53* (Figura 56). Se ha sugerido que la inestabilidad genética puede deteriorar a las células, lo que explicaría la evolución menos maligna de tumores con múltiples mutaciones y el relativo buen pronóstico de tumores de HNPCC (Risinger *et al.*, 1993; Shibata *et al.*, 1994). En nuestro sistema, la inestabilidad de microsatélites detectada en el tumor se podría relacionar con la baja capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2 obtenidas a partir de él.

También se comparó el tejido de adenocarcinoma de colon con las células BCS-TC2. Como se aprecia en la figura 60 las células BCS-TC2 muestran un diferente patrón

de bandas que el tejido de adenocarcinoma de colon. Por tanto, los resultados indican que las células BCS-TC2 inicialmente presentan inestabilidad genética, pero sufren un proceso de adaptación, lo que origina su estabilidad *in vitro* (Figura 60).

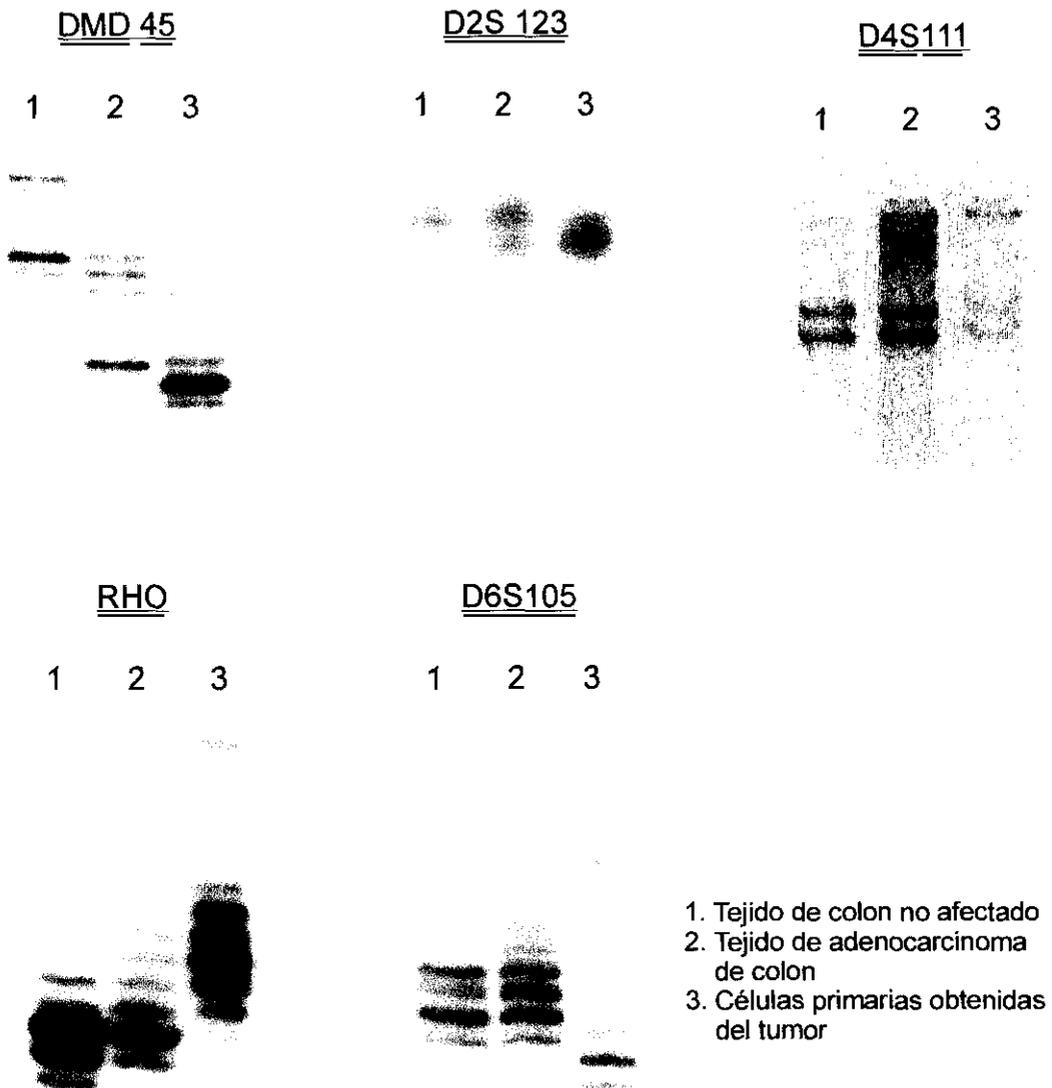


Figura 60.- Inestabilidad genética del tejido tumoral.

El DNA genómico aislado del tejido de colon normal (1), de tejido de adenocarcinoma de colon (2) y de células primarias obtenidas del tumor (3), se amplificó por PCR. Para ello se utilizaron los cebadores propios de los marcadores indicados en la figura. Los resultados se confirman en, al menos, 3 amplificaciones por PCR distintas.

Mutaciones en el gen *MSH2*

Las alteraciones en la longitud de los microsatélites que tiene lugar durante la carcinogénesis colorrectal se han asociado con mutaciones en los genes de reparación de errores *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*, que originan proteínas de reparación defectuosas incapaces de corregir los errores en la replicación (Bronner *et al.*, 1994; Loeb, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Peltomäki, 1994; Eshleman y Markowitz, 1995).

De entre todos estos genes se ha comprobado la implicación de mutaciones puntuales en el gen *MSH2*, localizado en el cromosoma 2p (Fishel *et al.*, 1993), sobre la inestabilidad genética observada en las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2. Para ello se ha analizado una de las regiones conservadas del gen mediante estudios de polimorfismo conformacional de banda sencilla (SSCP) y secuenciación. Los resultados obtenidos indican que no hay mutaciones en la región analizada. Sin embargo, se aprecia un polimorfismo, con sustitución de C por T, localizada 6 pares de bases hacia arriba del exón que comienza en el codon 669 del cDNA (Figura 61). Este polimorfismo se ha detectado tanto en la línea celular parental BCS-TC2 como en las dos líneas tumorigénicas.

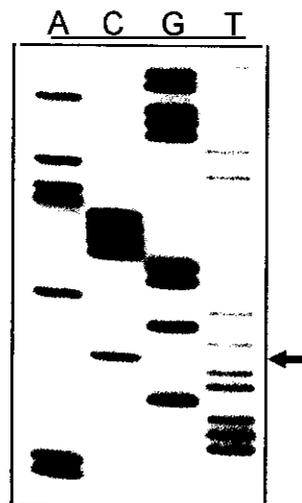


Figura 61.- Polimorfismo de *MSH2* en las células BCS-TC2, BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2.

La secuencia que codifica para los nucleótidos 2020-2225 del cDNA y las regiones próximas del DNA genómico que contienen la unión intrón/exón fueron amplificadas por los cebadores 16324 y 16340 mediante PCR. En la figura se muestra la autorradiografía de los gels de secuencia derivados de los productos de PCR. Como se puede apreciar (flecha) se observa una sustitución de C por T, 6 pares de bases por encima del exón comenzando en el codon 669.

En algunos casos se ha detectado esta sustitución C por T exclusivamente en el tejido tumoral, y no en el normal, de un mismo individuo (Fishel *et al.*, 1993), por lo que estos autores consideran el cambio como una mutación y no como polimorfismo. Sin embargo, Leach *et al.* (1993) describen esta misma alteración en algunos individuos normales. Por ello, parece más correcto considerar la sustitución como polimorfismo no relacionado con la aparición de los tumores. Recientemente, se ha descrito que en cáncer colorrectal, sin diagnóstico HNPCC, no hay mutación en el gen *MSH2* en la línea germinal (Brassett *et al.*, 1996). Puesto que no se han secuenciado todas las regiones conservadas, este resultado no permite ni afirmar ni excluir que el gen *MSH2*, u otro gen relacionado con los mecanismos de replicación/reparación, pueda ser el responsable de la inestabilidad genética observada.

Para poder explicar la relación existente entre la tumorigenicidad y la adquisición o manifestación de inestabilidad genética en las sublíneas, se pueden postular dos hipótesis. En primer lugar, es posible que las mutaciones se originen debido a una velocidad elevada de crecimiento *in vivo* en presencia de matrigel, como se ha propuesto para células de melanoma con baja capacidad de metástasis (Kobayaski *et al.*, 1994). Sin embargo, esta hipótesis implica la existencia de inestabilidad genética en la línea parental, lo que no ocurre durante el cultivo continuado de las células BCS-TC2.

En segundo lugar, el crecimiento *in vivo* en presencia de matrigel podría seleccionar o inducir una subpoblación de células con inestabilidad genética. La selección de una subpoblación celular parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento (cariotipo, etc.). Hay que considerar que los carcinomas de colon primario y las líneas obtenidas de ellos, incluyendo las células BCS-TC2, presentan gran heterogeneidad (Fidler, 1985; Turnay *et al.*, 1990; Fidler, 1995), conteniendo subpoblaciones celulares con diferentes grados de diferenciación.

Distintos agentes, como el matrigel, pueden inducir alteraciones celulares. Así, células de próstata de rata cultivadas en matrigel, originan variantes celulares no preexistentes dentro de la población parental que se originan como resultado de un proceso de diferenciación (Freedman *et al.*, 1994). Agentes, tales como aminos heterocíclicas, originan en ratas tumores de colon con inestabilidad genética (Canzian *et al.*, 1994). Por otro lado, en diferentes líneas celulares, el tratamiento con drogas, origina la selección de células resistentes que presentan inestabilidad genética (Anthony *et al.*, 1996). De acuerdo con estos estudios se podría pensar que el matrigel induce la inestabilidad genética en las células BCS-TC2. Sin embargo, distintos resultados apuntan a que el matrigel por sí mismo, no es capaz de inducir la formación de tumores, a menos que la población celular tenga una predisposición. En este sentido se ha descrito que células epiteliales normales de

próstata y genéticamente estables no pueden ser transformadas por el matrigel *in vivo* (Marengo y Chung, 1992).

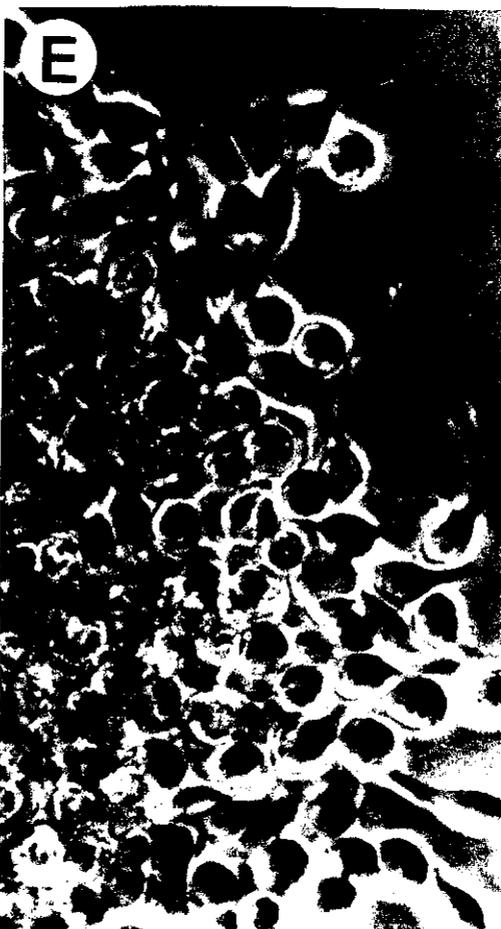
Por tanto, es posible que en el caso de las células BCS-TC2 la interacción con el extracto de basamento membranoso conduzca a la selección de una subpoblación celular que tenga o adquiriera la capacidad de proliferar *in vivo* y que manifiesta inestabilidad genética (López-Conejo *et al.*, 1996, 1997).

3.6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LOS TUMORES INDUCIDOS POR COINYECCIÓN DE CÉLULAS BCS-TC2 CON LAMININA Y CON FIBRONECTINA Y ESTUDIO DE SU CAPACIDAD TUMORIGÉNICA

3.6.1. EFECTO DE LA LAMININA EN LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS BCS-TC2.

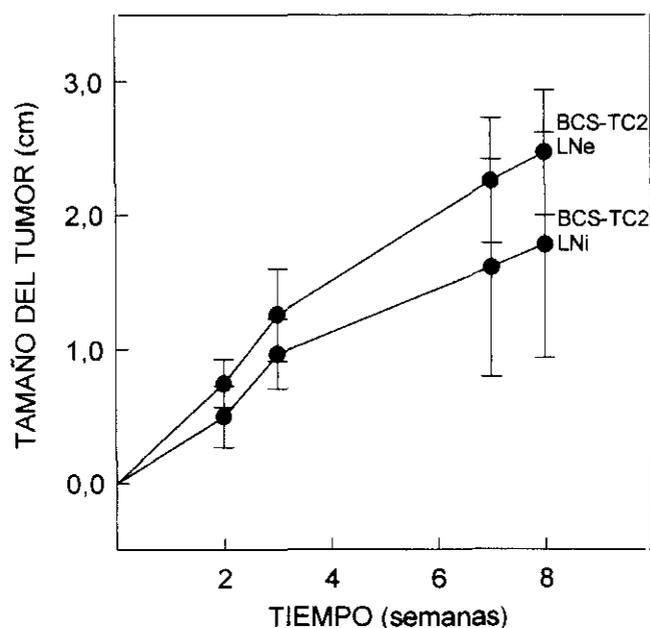
La coinyección subcutánea de las células BCS-TC2 con laminina induce la formación de tumores en ratones atímicos. Como se comprobó por estudios inmunohistoquímicos de los tumores se observan dos zonas bien diferenciadas. La capa externa, más compacta, presenta un menor grado de diferenciación pero una mayor actividad proliferativa respecto de la zona interna. Por ello, se planteó la obtención de las células de ambas zonas, para proceder a su comparación y establecer así las posibles diferencias existentes entre ellas.

La obtención de las células se realizó como se ha descrito anteriormente. En ambos casos, tras 4-5 días se observa la aparición de células con morfología redondeada a partir de los explantes del tumor (Figura 62). Transcurridos 5 o 7 días, las células se han extendido y comienzan a formar monocapas. En los cultivos de las células procedentes de la zona externa del tumor se observan fibroblastos, que van desapareciendo del cultivo con el tiempo (Figura 62 A,B,C). Sin embargo, no se aprecian fibroblastos en el cultivo de las células procedentes de la zona interna. Cuando las células han alcanzado una densidad celular adecuada, se lleva a cabo una ligera tripsinización, y las células levantadas se siembran en nuevos frascos. La apariencia morfológica de las células provenientes de la zona externa o interna del tumor (BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi, respectivamente) es bastante diferente. Por microscopía óptica se aprecia que las células BCS-TC2.LNe, presentan una morfología redondeada con un bajo grado de extensión, mientras que las células BCS-TC2.LNi presentan forma bipolar muy extendida. Ambas líneas celulares se mantienen en cultivo en condiciones estándar, procediendo a su subcultivo cuando alcanzan la confluencia. Cuando se observa que las células mantienen las características morfológicas, con los pases de tripsinización, se considera que el cultivo es estable y se



procede a su caracterización. En apartados posteriores se recogen algunos de los parámetros característicos valorados para ambas sublíneas.

Se comprobó si estas células eran capaces de desarrollar tumores en ausencia de laminina. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de tumorigenicidad *in vivo*, cuyos resultados, recogidos en la figura 63, indican que ambas sublíneas presentan capacidad tumorigénica intrínseca, siendo la incidencia de formación de tumores del 100% en ambos casos.



Línea celular	Latencia (semanas)	Incidencia (2 semanas)	Incidencia (7 semanas)	Tamaño tumor (cm) ^a
BCS-TC2.LNe	1	8(8)	8(8)	2,47±0,47
BCS-TC2.LNi	1	4(8)	8(8)	1,78±0,84

Figura 63.- Tumorigenicidad de las células BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi.

En la parte superior de la figura se representa la variación con el tiempo del tamaño de los tumores originados por células BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi. El tamaño del tumor, la incidencia, y el período de latencia se determinó a diferentes tiempos después de la inyección subcutánea de 1×10^6 células en ratones atímicos. En la parte inferior se recoge el período de latencia expresado en semanas y la incidencia de formación de los tumores a las 2 y 7 semanas, respectivamente. (^a) Se indica el tamaño de los tumores 8 semanas después de la inyección. Los datos representan los valores medios de dos experimentos, en cada uno de los cuales se utilizan 4 ratones.

La fase de latencia del tumor es similar en las dos sublíneas, aunque existen diferencias en cuanto a su capacidad proliferativa. Así, las células BCS-TC2.LNe presentan una mayor capacidad tumorigénica puesto que a las dos semanas de la inoculación la incidencia de formación de tumores es del 100%, mientras que en las células BCS-TC2.LNi esta incidencia no se alcanza hasta después de 7 semanas. Además, los tumores originados por las células BCS-TC2.LNe son de mayor tamaño que los originados por la línea BCS-TC2.LNi (Figura 63). Este resultado se correlaciona con la mayor actividad proliferativa observada en la capa externa de los tumores, zona de la que proceden las células BCS-TC2.LNe.

3.6.2. EFECTO DE LA FIBRONECTINA EN LA CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS CÉLULAS BCS-TC2

Dado que las células BCS-TC2 son capaces de interactuar con fibronectina, e influir en procesos como la adhesión y la proliferación celular, se planteó estudiar el efecto de dicha proteína sobre la capacidad tumorigénica de estas células. Para ello se coinyectan subcutáneamente células BCS-TC2 con fibronectina en ratones atímicos. Los resultados de dichos experimentos se recogen en la figura 64.

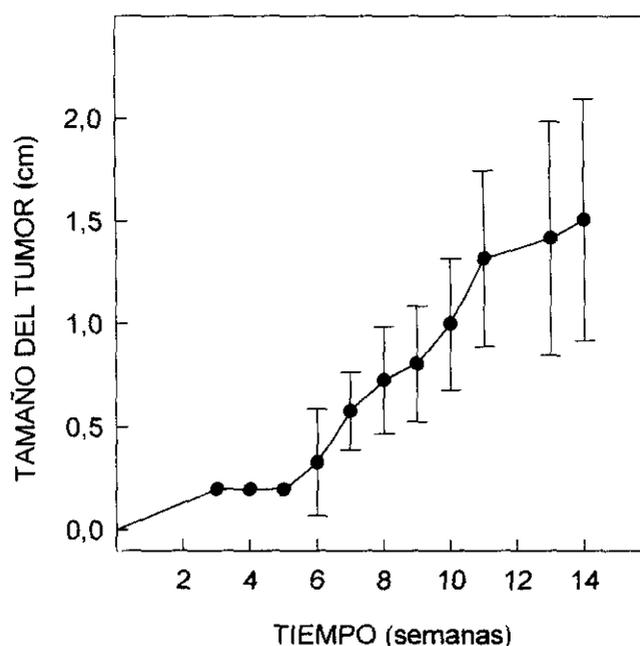


Figura 64.- Efecto de la fibronectina sobre la capacidad tumorigénica de las células BCS-TC2.

El efecto de la fibronectina se estudia coinyectando subcutáneamente en ratones atímicos 1×10^6 células BCS-TC2 en presencia de 125 μg de fibronectina. El tamaño de los tumores se mide a distintos tiempos. Los experimentos se realizaron dos veces, utilizando en cada uno de ellos una media de 4 ratones.

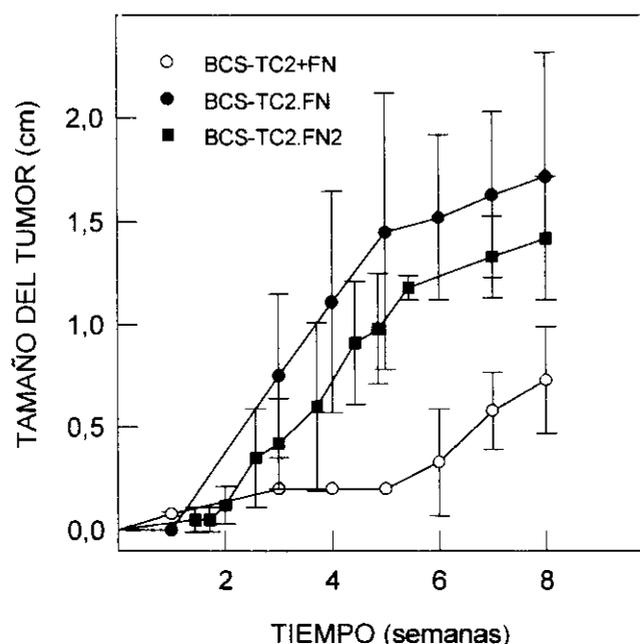
Estos datos indican que la fibronectina es capaz de inducir la formación de tumores por las células BCS-TC2. La fase de latencia es de 6 semanas, tiempo en el cual se han desarrollado tumores en 6 de los 8 ratones inyectados. Este período de latencia es superior al tiempo requerido para detectar tumores cuando las células se coinyectan con laminina o matrigel. Sin embargo, el tamaño de los tumores desarrollados por la inducción de laminina y fibronectina a las 8 semanas son similares. Después de 14 semanas, la incidencia de formación de tumores en presencia de fibronectina es del 100%.

Como se ha comentado anteriormente, la interacción de las células BCS-TC2 con fibronectina tiene lugar principalmente a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$. La interacción de este receptor con su ligando transmite la señal al interior de la célula, dando lugar a la regulación de la adhesión y migración celular, al ensamblaje de la matriz y a la organización del citoesqueleto (Akiyama *et al.*, 1989; Ruoslahti, 1994). En general, se ha postulado que un incremento en la expresión de $\alpha_5\beta_1$ se traduce en una menor capacidad tumorigénica de las células (Giancotti y Ruoslahti, 1990; Schreiner *et al.*, 1991; Stallmach *et al.*, 1994), así como que la incubación con fibronectina revierte el fenotipo maligno de ciertos tipos de células. Sin embargo, en otros casos, la adhesión de células epiteliales inmortalizadas sobre fibronectina se correlaciona con tumorigenicidad, ya que sólo células epiteliales bronquiales cultivadas sobre fibronectina, pero no sobre laminina, colágeno de tipo IV o plástico, forman tumores en ratones atímicos (Schiller y Bittner, 1995). Además, en estos casos la función clave de esta integrina en el proceso tumorigénico se ha puesto de manifiesto al comprobarse que la tumorigenicidad se inhibe por anticuerpos anti-integrinas α_5 y β_1 (Schiller y Bittner, 1995).

La interacción de $\alpha_5\beta_1$ con fibronectina puede inducir la proliferación en células de carcinoma de colon, mientras que la expresión de $\alpha_5\beta_1$ en ausencia de adhesión a fibronectina disminuye la proliferación (Varner *et al.*, 1995). Probablemente la interacción de las células BCS-TC2 con la fibronectina coinyectada, a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$, origine un incremento en la actividad proliferativa de las células que favorece su crecimiento *in vivo*. Hay que considerar que los experimentos realizados *in vitro* indican que la fibronectina es capaz de incrementar la capacidad proliferativa de las células BCS-TC2 (Tabla VII; Figura 20). Por tanto, la interacción de células BCS-TC2 con fibronectina a través del receptor $\alpha_5\beta_1$ favorecerá probablemente la proliferación celular.

De los tumores obtenidos por coinyección de la línea parental con fibronectina se aislaron células y se establecieron en cultivo. Las nuevas células, denominadas BCS-TC2.FN, se inyectaron subcutáneamente en ausencia de fibronectina, con objeto de determinar su capacidad tumorigénica. Estas células son capaces de proliferar *in vivo* y se desarrollan tumores con una incidencia del 100% (Figura 65). Esta capacidad tumorigénica intrínseca se mantiene tanto tras múltiples pases *in vitro* como tras un segundo pase *in vivo*

en ratones atímicos. Así, las células BCS-TC2.FN2, procedentes de tumores desarrollados por las células BCS-TC2.FN, también presentan capacidad para formar tumores por sí solas (Figura 65).



Línea celular	Latencia (semanas)	Incidencia	Tamaño tumor (cm)
BCS-TC2.FN	2	8(8)	1,72±0,60
BCS-TC2.FN2	2	8(8)	1,32±0,50
BCS-TC2+FN	6	6(8)	0,73±0,26

Figura 65.- Tumorigenicidad de las células BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2.

En la parte superior de la figura se representa el crecimiento *in vivo* de las células parentales coinyectadas con 125µg de fibronectina, y de las sublíneas BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2, después de la inyección subcutánea de 1×10^6 células en ratones atímicos. En la parte inferior se recoge el período de latencia, así como la incidencia y el tamaño de los tumores 8 semanas después de la inyección. Los datos representan los valores medios de dos experimentos, en cada uno de los cuales se utilizan 4 ratones.

La laminina, la fibronectina y los colágenos modifican *in vitro*, el comportamiento de las células BCS-TC2 de una manera similar. Sin embargo, su repercusión *in vivo* es diferente, ya que ninguno de los colágenos ensayados (colágenos de tipo I, IV y V) inducen el crecimiento tumoral. Este comportamiento se podría justificar teniendo en cuenta que en

la interacción de las células BCS-TC2 con las proteínas estudiadas participan diferentes tipos de receptores que, una vez que interaccionan con el ligando adecuado, pueden desencadenar la transmisión de la señal al interior celular originando distintas respuestas celulares. Además, se ha sugerido que la progresión tumoral *in vivo* depende de que se induzca un incremento en la proliferación celular así como de la supervivencia de células aberrantes que resultan de la supresión de la apoptosis (Fisher, 1994). Es probable que la interacción de las células BCS-TC2 con laminina o fibronectina, por interacción con $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ respectivamente, induzca la supresión de la apoptosis, lo que favorecería el desarrollo tumoral. En este sentido se ha postulado que la expresión de α_5 suprime la apoptosis (Zhang *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 1996). Por otro lado, la interacción de $\alpha_6\beta_4$ con laminina-5 parece desencadenar una señal esencial para la supervivencia celular (Dowling *et al.*, 1996).

3.6.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBLÍNEAS BCS-TC2.LNe, BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2

Para caracterizar las nuevas sublíneas tumorigénicas establecidas, se analizó el cariotipo, el grado de diferenciación y la expresión de integrinas y de metaloproteinasas. Los resultados quedan recogidos en la tabla XIV.

Cariotipo

El estudio de los cariotipos indica que, en todas las sublíneas, se mantienen los dos marcadores cromosómicos detectados en las células parentales, los derivados del cromosoma 15 y del 16, junto con una alteración en el cromosoma 9 que no se encuentra en la línea parental. Este mismo resultado se obtuvo para las líneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 caracterizadas con anterioridad. Estos resultados sugieren que todas las sublíneas establecidas provienen de una subpoblación, presente en el cultivo heterogéneo original, que presenta esta nueva alteración genética. Dicha alteración podría ser la responsable de la capacidad tumorigénica detectada en todas estas sublíneas. Puesto que el derivado del cromosoma 9 aparece independientemente del factor con el que se coinyectan las células (matrigel, laminina o fibronectina), podría ser que, en todos los casos, se selecciona la misma subpoblación por su mayor capacidad proliferativa/tumorigénica. Para poder determinar este aspecto se procedió a estudiar otros parámetros que permitieran confirmar o descartar dicha posibilidad.

Grado de diferenciación

Generalmente, un menor grado de diferenciación es indicativo de mayor malignidad. Por este motivo, se realizaron estudios morfológicos de las diferentes sublíneas por

microscopía electrónica de transmisión, y se analizaron de los niveles de actividad de fosfatasa alcalina. Las células epiteliales diferenciadas se encuentran polarizadas, distinguiéndose dos zonas en la membrana plasmática. La membrana apical forma el denominado borde en cepillo, y se orienta hacia el lumen intestinal. La membrana basolateral es la responsable de establecer los contactos célula-célula y célula-sustrato. La existencia de estas dos regiones se puede mantener gracias a una disposición especial del citoesqueleto (Peterson y Mooseker, 1993).

La morfología se ha analizado mediante microscopía electrónica de transmisión (Figuras 66 y 67).

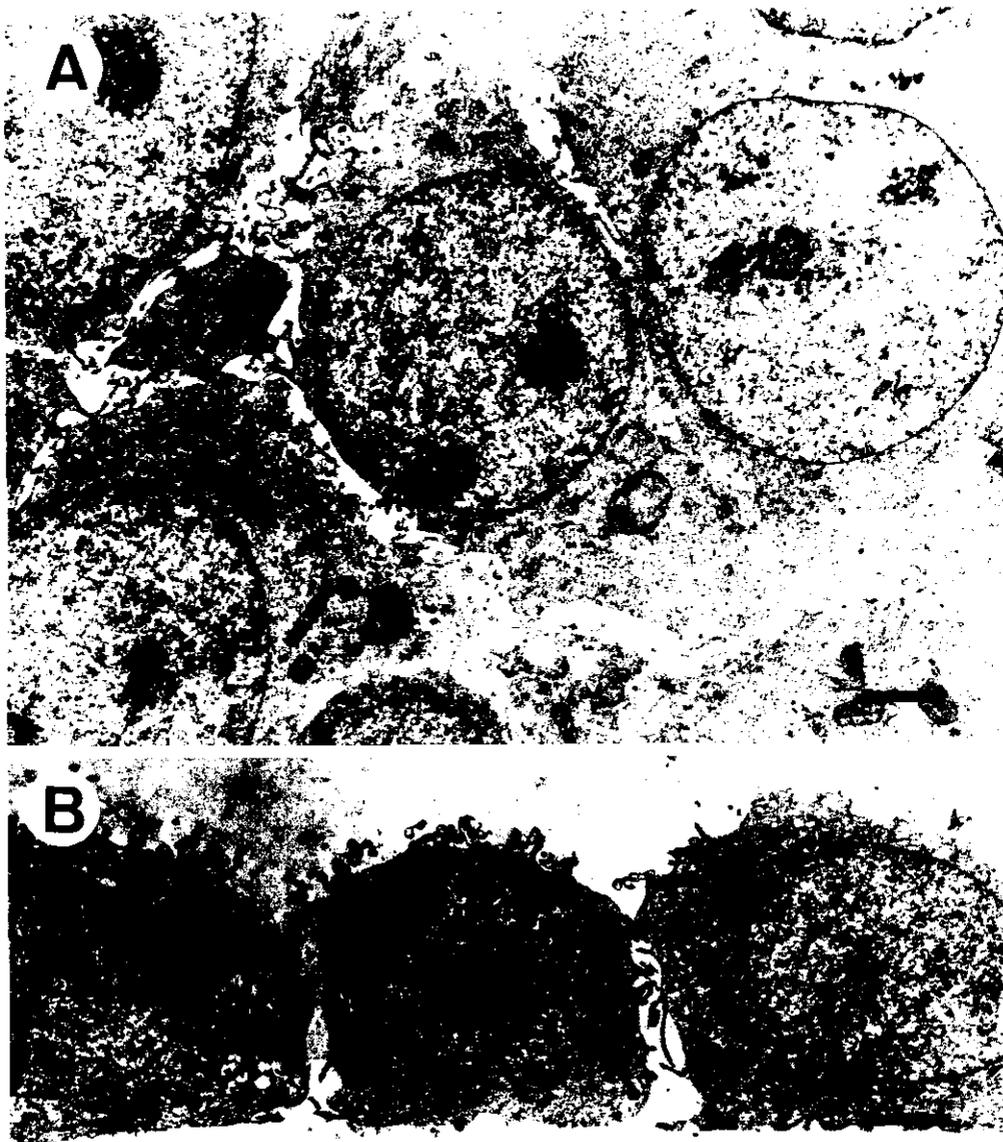


Figura 66.- Microscopía electrónica de transmisión de las células BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi.

Las células creciendo en condiciones estándar se preparan para visualizarse por microscopía electrónica como se indica en Métodos. Células BCS-TC2.LNe (A) y BCS-TC2.LNi (B) (Barra, 2,5 μ m).

Las sublíneas BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2 presentan una membrana polarizada, lo que es indicativo de su naturaleza diferenciada (Figura 66B y 67), distinguiéndose la membrana apical, que contiene casi la totalidad de las microvellosidades, y la membrana basolateral, que aparece más lisa. Por el contrario, las células BCS-TC2.LNe presentan la misma morfología que las células parentales (Figura 45), no apreciándose polarización de la membrana (Figura 66A).



La actividad de fosfatasa alcalina en las células BCS-TC2.LNe es similar a la de la línea parental (Tabla XIV), sin que exista además polarización en su membrana (Figura 66A), lo que confirma su naturaleza poco diferenciada. Por el contrario, las células BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2 presentan un mayor grado de diferenciación que la línea parental, según los datos de actividad de fosfatasa alcalina (Tabla XIV), y la polarización de sus membranas (Figura 66B y 67). Las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 son menos diferenciadas que las células BCS-TC2 (Tabla XII). Por tanto, el análisis de las sublíneas, todas con capacidad tumorigénica pero con diferente grado de diferenciación, indican que en este sistema no se pueden correlacionar estos dos parámetros. Sin embargo, hay que considerar que, en cualquiera de los casos, las diferencias de actividad existentes entre las líneas celulares son pequeños ya que las células BCS-TC2 diferenciadas con butirato sódico presentan una actividad de fosfatasa alcalina de 350 mU/mg tras 9 días de cultivo (Navarro *et al.*, 1997). Los resultados también indican que las sublíneas establecidas provienen de diferentes subpoblaciones celulares ya que cada una presenta un diferente grado de diferenciación. Incluso las células BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi, procedentes del mismo tumor, tienen propiedades diferentes.

Expresión de integrinas

En las sublíneas BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 hay diferencias en los niveles de integrinas con respecto a los de la línea parental. Se procedió a estudiar la expresión de estos receptores en las nuevas sublíneas para comprobar si se mantenían estas mismas alteraciones, lo que podría sugerir una correlación entre ellas y la adquisición de un fenotipo tumorigénico. Como queda recogido en la tabla XIV, en todas las sublíneas se produce un incremento en la expresión de las integrinas β_1 y α_2 y una disminución en la expresión de la subunidad β_4 respecto de la línea parental. Sin embargo, no se producen modificaciones en los niveles de la integrina α_5 .

Los niveles de expresión de la integrina α_6 se incrementan en las células BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2, lo que indicaría un incremento de la integrina $\alpha_6\beta_1$. Sin embargo, en las sublíneas BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi se produce una disminución en los niveles de esta subunidad, principalmente en las células procedentes del interior del tumor. Puesto que en estas líneas celulares disminuyen los niveles de β_4 en mayor medida que para las otras sublíneas, es probable que la disminución de α_6 sea reflejo de la existencia de menor cantidad del heterodímero $\alpha_6\beta_4$, aunque los niveles de integrina $\alpha_6\beta_1$ se mantengan o sean superiores a los de la línea parental. En este caso, la expresión incrementada de la integrina $\alpha_6\beta_1$ estaría relacionada con la capacidad tumorigénica de las células.

Por tanto, el análisis de los niveles de expresión de integrinas en estas sublíneas

Tabla XIV. Características de las células BCS-TC2.LNe, BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2

	<u>BCS-TC2</u>	<u>BCS-TC2.LNe</u>	<u>BCS-TC2.LNi</u>	<u>BCS-TC2.FN</u>	<u>BCS-TC2.FN2</u>						
CARIOTIPO	46XXder(15) der(16)	46XXder(15) der(16)der(9)	46XXder(15) der(16)der(9)	46XXder(15) der(16)der(9)	46XXder(15) der(16)der(9)						
DIFERENCIACION CELULAR											
ALP ^a	15,60	18,24	46,25	135,51	70,00						
Polarización ^b	NO	NO	SI	SI	SI						
INTEGRINAS ^c											
β_1 (ALEX1/4)	100(224)	100(380)	100(339)	100(425)	100(472)						
α_2 (P1E6)	100(132)	100(222)	100(201)	100(173)	100(208)						
α_5 (BIIG2)	100 (28)	100 (33)	100 (34)	100 (28)	100 (39)						
α_6 (GoH3)	100 (64)	100 (62)	100 (41)	100 (69)	100 (97)						
β_4 (3E1)	100(180)	100 (65)	100 (29)	100 (96)	100(124)						
METALOPROTEINASAS											
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
MMP-9											MMP-7
MMP-2											MMP-2 asociada a membrana
	1. BCS-TC2		4. BCS-TC2.FN								
	2. BCS-TC2.LNe		5. BCS-TC2.FN2								
	3. BCS-TC2.LNi										

El cariotipo de las células BCS-TC2 y de las sublíneas se ha realizado mediante bandeo G de varias metafases de las células en diferentes pases de tripsinización. ^aLa actividad de fosfatasa alcalina (ALP) se determinó 9 días después de la siembra, como se indica en Materiales y Métodos, y se expresa en mU/mg de proteína. El error experimental es inferior al 10%. ^bEl grado de polarización se determinó por microscopía electrónica de transmisión. ^cLas células se procesan para citometría de flujo como se detalla en Materiales y Métodos. Las diluciones del primer anticuerpo utilizado son 1:100 para ALEX1/4, P1E6 y BIIG2, 1:50 para GoH3 y 1:1000 para 3E1. Se indica el porcentaje de células positivas y, entre paréntesis, el valor de la intensidad media de fluorescencia. ^dLas actividades gelatinolíticas en el medio condicionado se detectaron por gelatinograma (MMP-2, MMP-9 y asociada a membrana) o por inmunodetección (MMP-7) como se indica en Materiales y Métodos.

confirmaría que el incremento en la expresión de la subunidad β_1 , α_2 y probablemente α_6 , junto con una disminución de los niveles de β_4 , esté relacionado con el aumento de la capacidad tumorigénica.

Metaloproteinasas

Para intentar establecer una relación entre la secreción de MMPs y la capacidad tumorigénica se ha procedido a la detección de MMPs en el medio condicionado por las diferentes líneas celulares.

El gelatinograma de los medios condicionados de las sublíneas indica que todas presentan actividad gelatinolítica MMP-2 y MMP-9 (Tabla XIV). La intensidad de estas bandas es inferior en las sublíneas BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi que en las sublíneas BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2, siendo en todos los casos superior a la detectada para las células parentales. Además, en todas las líneas celulares, incluida la línea parental, se detecta actividad gelatinolítica asociada a la membrana celular (Tabla XIV), lo que sugiere la presencia en la superficie de las células de receptores/activadores de la MMP-2.

En la tabla XIV también se recoge la inmunodetección de MMP-7 por *Western Blot* en las diferentes líneas. Las células parentales no secretan esta enzima, mientras que sí lo hacen las líneas BCS-TC2.LNi, BCS-TC2.LNe, BCS-TC2.FN y BCS-TC2.FN2, siendo estas dos últimas las que expresan niveles más altos. Este hecho confirma la hipótesis de la participación de la matrilisina en la proliferación celular, ya que se ha encontrado una correlación entre la expresión del antígeno Ki67 y dicha metaloproteinasa (Sires *et al.*, 1993). Las células que proceden de la zona más proliferativa del tumor (BCS-TC2.LNe) expresan mayores niveles de MMP-7 y desarrollan tumores de mayor tamaño que las células procedentes de la zona menos proliferativa.

Por tanto, las sublíneas tumorigénicas aquí estudiadas presentan unos niveles incrementados en la expresión de las MMP-2, MMP-7 y MMP-9 respecto de la línea parental, coincidiendo con los resultados anteriormente obtenidos para las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2. Por tanto, estos resultados sugieren la existencia de una relación directa entre la expresión de estas metaloproteinasas y el potencial tumorigénico de las sublíneas.

3.7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD METASTÁTICA DE LAS SUBLÍNEAS CELULARES

Numerosos estudios indican una correlación entre la producción de MMPs y el potencial tumorigénico e invasivo de las células (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993; Witty *et al.*, 1994; Kawamata *et al.*, 1995). Puesto que las sublíneas establecidas expresan diferentes

MMPs, y ya se ha comprobado su capacidad tumorigénica, se procedió a analizar su posible capacidad metastática.

La producción de metástasis en ratones atímicos depende de numerosos factores, entre ellos, de las propiedades intrínsecas de las células tumorales, de la respuesta del huésped, de la técnica experimental utilizada y de la salud y el mantenimiento de los ratones (Fidler, 1991; 1995). Hay que considerar que la metástasis tiene lugar como consecuencia de una serie de etapas secuenciales. Cualquier factor que afecte a una de estas etapas puede influir en el comportamiento de las células tumorales y en su capacidad para establecer metástasis. La mayor parte de los tumores sólidos implantados subcutáneamente en ratones crecen localmente pero muestran un grado de invasividad muy limitado (Fidler, 1991). Este hecho, se asocia frecuentemente con el desarrollo de una densa cápsula fibrosa alrededor del tumor. Como se ha comentado con anterioridad en la Memoria, dicha cápsula también se observa en todos los tumores formados tras la inyección subcutánea de las distintas sublíneas tumorigénicas, así como en los tumores ocasionales o inducidos por matrigel en las células parentales.

La elección del sitio de inoculación de las células es fundamental en el desarrollo de modelos de metástasis. El comportamiento metastático se incrementa cuando las células se implantan ortotrópicamente, puesto que la expresión del fenotipo maligno depende del sitio de crecimiento e implica interacciones específicas con la matriz de tejido conectivo local (Fidler, 1995). Frecuentemente las células se inyectan directamente en el hígado, el ciego o la vena porta. Sin embargo, estos métodos llevan consigo efectos laterales, tales como desarrollo de adhesiones perihepáticas, siembra de células en el peritoneo, obstrucción intestinal, trombosis en la vena porta o desangramiento (Brand *et al.*, 1996).

Para comprobar la capacidad metastática de las diferentes líneas celulares se ha seleccionado la inyección de las células en el bazo de ratones atímicos, ya que se ha descrito este sitio de inoculación como el más adecuado para estudios con células de carcinoma de colon (Giavazzi *et al.*, 1986; Morikawa *et al.*, 1988; Fidler, 1995). La red sinusoidal del bazo proporciona acceso directo al sistema portal, siendo el porcentaje de células que sobreviven 24 horas después de la inoculación relativamente alto (Fidler, 1975; Brand *et al.*, 1996). Este modelo de metástasis "espontánea" reproduce fielmente el proceso metastático, ya que permite estudiar todos los pasos de dicho proceso, incluidas las etapas iniciales (angiogénesis, liberación de las células de la masa tumoral e invasión de los vasos). Los experimentos se realizan a tiempos largos dado que, en algunos casos, se requieren tiempos mínimos de seis meses para poder detectar la existencia de metástasis.

Se estudió la capacidad metastática intrínseca de las células parentales y de las sublíneas tumorigénicas. Los resultados, recogidos en la tabla XV, indican que en ninguno

de los ratones inyectados con células BCS-TC2 se detectan metástasis incluso tras largos períodos de tiempo después de la inyección (5-10 meses). Por tanto, las células BCS-TC2 no presentan capacidad metastática, lo que se correlaciona con el carácter no tumorigénico de las células.

Las sublíneas tumorigénicas obtenidas por selección con matrigel (BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2), son capaces por sí solas de originar metástasis hepáticas, con una incidencia del 20% y 66% respectivamente. Las sublíneas obtenidas por selección con laminina (BCS-TC2.LNe y BCS-TC2.LNi) o fibronectina (BCS-TC2.FN) desarrollan focos secundarios en el hígado en el 60% y 50% de los ratones inyectados, respectivamente. Ninguna de estas sublíneas origina la formación de metástasis pulmonar.

Tabla XV. Capacidad metastática de las células parentales y sublíneas tumorigénicas.

Línea celular	Metástasis hepática	Metástasis pulmonar
BCS-TC2	0(8) ---	0(8)
BCS-TC2.1	1(5) 20%	0(5)
BCS-TC2.2	4(6) 66%	0(6)
BCS-TC2.LNe/ LNi	3(5) 60%	0(5)
BCS-TC2.FN	2(4) 50%	0(4)

Se inyectan 5×10^6 células en el bazo de ratones atímicos y éstos se sacrifican cuando se observan indicios de posibles metástasis (3 meses para las células BCS-TC2.LNe/LNi, 4 para las BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 y 6 meses para las células BCS-TC2.FN) y se realiza la autopsia. En la tabla se indica la incidencia de formación de metástasis (número de ratones con metástasis respecto del total) y el porcentaje que representa.

La metástasis requiere interacciones de las células tumorales con la ECM en diferentes etapas del proceso metastático. Estas interacciones dependen de la expresión de receptores de la familia de las integrinas, además de otras moléculas de adhesión. Las sublíneas celulares establecidas, tumorigénicas y metastáticas, presentan cambios en la expresión de integrinas respecto de la línea parental (incremento en la expresión de las subunidades β_1 , α_2 y α_6 y disminución en los niveles de β_4 ; tablas XIII y XIV). Puesto que dichos cambios son cualitativamente semejantes en todas las sublíneas, éstos se podrían correlacionar con su comportamiento invasivo.

Niveles incrementados de β_1 se han encontrado en células invasivas y tumorigénicas, respecto de células no tumorigénicas y poco invasivas (Dedhar y Saulnier, 1990). Los niveles de expresión incrementados de la subunidad β_1 sugieren que este incremento puede ser importante para la formación de metástasis hepáticas, como se ha descrito en células de carcinoma gástrico (Yasoshima *et al.*, 1996). Por otro lado, la expresión incrementada de la integrina $\alpha_2\beta_1$ se ha demostrado que potencia la capacidad metastática de células de rhabdomyosarcoma humano (Chan *et al.*, 1991; 1992).

Estudios *in vitro* indican una correlación entre la invasión y la expresión de la integrina α_6 (Dedhar y Saulnier, 1990; Rabinovitz *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1996). Su localización en los sitios de invasión, donde puede interaccionar y ser regulada por la nueva matriz disponible, justificaría que su expresión favorezca el proceso invasivo (Rabinovitz *et al.*, 1995). Así, en fibroblastos humanos, la transformación maligna lleva asociada un incremento en los niveles de la integrina $\alpha_6\beta_1$ (Lin *et al.*, 1993). En pacientes con carcinoma de mama se ha encontrado una relación entre la expresión de integrinas que contienen α_6 , la formación de metástasis y el tiempo de supervivencia (Friedrichs *et al.*, 1995). La supresión de la expresión de α_6 , o el bloqueo con anticuerpos frente a esta integrina, inhiben la metástasis pulmonar de células de carcinoma de pulmón, de fibrosarcoma y de melanoma (Ruiz *et al.*, 1993; Danen *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1996). Se ha indicado que la integrina α_6 puede desempeñar una doble función en el proceso metastático, mediando la adhesión de células tumorales al endotelio a través de la unión a un ligando desconocido, y a la laminina de la matriz extracelular subendotelial durante la extravasación (Yamamoto *et al.*, 1996).

De esta manera, es probable que los niveles de expresión incrementados de las subunidades α_2 , α_6 y β_1 en las células metastáticas faciliten la interacción de éstas con los ligandos de la matriz subendotelial (laminina y colágeno de tipo IV) a través de los receptores $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$. La disminución de la expresión de la cadena β_4 podría relacionarse con la pérdida de interacciones célula-célula y célula-matriz en las fases iniciales de la invasión (Chammas *et al.*, 1991b; Bossman, 1993), lo que favorecería la formación de metástasis distantes (Daèmi *et al.*, 1995). La disminución en la expresión de esta integrina también se correlaciona con una mayor motilidad (Bretscher, 1992; Falcioni *et al.*, 1994; Nagle *et al.*, 1995). De cualquier modo, a causa de la complejidad de la cascada metastática, la contribución de las integrinas al mecanismo metastático es difícil de interpretar.

Concluyendo, se han obtenido líneas celulares, derivadas de subpoblaciones presentes en la línea parental, que difieren de estas en su capacidad metastática, lo que confirma la hipótesis de que no todas las células del tumor primario presentan capacidad para formar focos secundarios. El comportamiento invasivo de estas sublíneas

probablemente sea debido a que presentan una mayor actividad gelatinolítica, un diferente patrón de integrinas y una mayor capacidad de proliferación *in vivo* que las células parentales.

3.7.1. INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD METASTÁTICA DE LAS CÉLULAS BCS-TC2

Las sublíneas tumorigénicas, seleccionadas por su interacción con laminina, fibronectina o matrigel presentan capacidad metastática intrínseca. Teniendo en cuenta todos estos hechos, se analizó si la laminina, la fibronectina o el matrigel eran capaces de inducir la capacidad metastática de las células BCS-TC2.

Inicialmente se estudió la capacidad metastática de la línea parental BCS-TC2, comparándola con las células HT-29, en ausencia y en presencia de matrigel. Como ya se ha comentado anteriormente, las células BCS-TC2 no son capaces por sí solas de inducir metástasis. Sin embargo, en todos los ratones inyectados con células HT-29 se aprecia el inicio de metástasis hepática tan sólo dos meses después de la inoculación de las células (Tabla XVI).

Tabla XVI. Efecto del matrigel en la capacidad metastática de las células BCS-TC2 y HT-29

Línea celular	Matrigel (mg)	Metástasis hepática	Metástasis pulmonar	Tiempo ^a (meses)
BCS-TC2	---	0(8) ---	0(8) ---	5-10
BCS-TC2	0,2	3(7) 43%	0(7) ---	5-10
BCS-TC2.1	---	1(5) 20%	0(5) ---	4
BCS-TC2.1	0,2	4(4) 100%	0(4) ---	2
BCS-TC2.2	---	4(6) 66%	0(6) ---	4
BCS-TC2.2	0,2	3(3) 100%	0(3) ---	2
HT-29	---	2(2) 100%	0(2) ---	2
HT-29	0,1	2(3) 66%	2(3) 66%	2

En la tabla se recoge la incidencia de formación de metástasis hepática y/o pulmonar cuando se inyectan en el bazo de ratones atímicos células BCS-TC2, BCS-TC2.1, BCS-TC2.2 (5×10^6 por ratón) o HT-29 (5×10^5 por ratón) en presencia (+) o en ausencia (---) de matrigel (MG). Los ratones se sacrifican, cuando se observan indicios de posibles metástasis y se realiza la autopsia. ^a Se indica el tiempo mínimo requerido para observar la formación de metástasis.

Por otro lado, cuando las células BCS-TC2 se coinyectan con el matrigel se incrementa considerablemente la capacidad metastática de las células. Estos resultados indican que el matrigel no sólo favorece la capacidad tumorigénica de las células parentales sino también la capacidad invasiva y metastática de las mismas. Hasta la fecha se había descrito que el matrigel es capaz de inducir el fenotipo metastático en líneas celulares no metastáticas a producir metástasis (Bao *et al.*, 1994), contrariamente a lo que ocurre con las células BCS-TC2. Además, los resultados sugieren que la capacidad metastática de las células depende no sólo de las propiedades intrínsecas de las propias células, sino que también puede ser modulada por factores locales medioambientales.

La inyección de las células HT-29 en bazo en presencia de matrigel origina dos meses después metástasis hepáticas e inicio de metástasis pulmonar en 2 de cada 3 ratones. En el caso de las células BCS-TC2 se observa metástasis en el 40% de los ratones, pero no se observa en ningún caso la existencia de metástasis pulmonar. Cuando las células BCS-TC2.1 y BCS-TC2.2 se coinyectan con matrigel en el bazo de los ratones atímicos (Tabla XVI), se produce un incremento en la incidencia de formación de metástasis hepáticas, que llega a ser del 100% para ambas líneas. Por tanto, el matrigel es capaz de incrementar de forma muy significativa la incidencia de metástasis en aquellas líneas celulares que ya presentaban una tendencia a la formación de las mismas, como también se ha descrito en células de cáncer de mama (Bao *et al.*, 1994).

El efecto de laminina y fibronectina sobre la capacidad metastática de las células parentales se recoge en la tabla XVII. El 20% de los ratones coinyectados con células BCS-TC2 en presencia de laminina desarrollan metástasis hepática o pulmonar, mientras que la fibronectina coinyectada con las células origina, en el 66% de los ratones, metástasis hepática (en ningún caso metástasis pulmonar). Las metástasis se detectan en ambos casos entre los 3 y los 10 meses.

Tabla XVII. Efecto de componentes de la ECM sobre la capacidad metastática de las células BCS-TC2

Metástasis	Control	Matrigel	Laminina	Fibronectina
Hepática	0(8)	3(7)	1(5)	2(3)
Pulmonar	0(8)	0(7)	1(5)	0(3)

Se indica la incidencia de formación de metástasis, tras inyección en el bazo de ratones atímicos de 5×10^6 células solas (control) o en presencia de 0,2 mg de MG, 0,1 mg de LN o 0,15 mg de FN. Los ratones se sacrifican cuando se observan indicios de posibles metástasis y se realiza la autopsia.

Por tanto, la laminina, la fibronectina y el matrigel son capaces de inducir el fenotipo maligno en las células BCS-TC2. Estos resultados sugieren que la interacción de las células con cada uno de estos tres factores probablemente origine la selección de una subpoblación celular con una mayor capacidad metastática, independientemente del sitio de inoculación.

Cuando las células BCS-TC2 se inoculan en el bazo en presencia de laminina, fibronectina o matrigel, se origina la formación de tumores en este órgano. Así, los componentes de la matriz que favorecen el crecimiento tumoral subcutáneo también producen el desarrollo de tumores en bazo cuando se inoculan para estudiar su efecto sobre la capacidad invasiva de las células. Por tanto, la inducción de la capacidad proliferativa de las células podría influir en las primeras etapas de la metástasis (en el sitio primario) así como en el crecimiento de las células en el foco secundario. En este sentido se ha descrito en células de carcinoma gástrico que la capacidad metastática se relaciona con las diferencias existentes en el potencial de crecimiento de estas células (Yashiro *et al.*, 1995; Yasoshima *et al.*, 1996). Además, hay que considerar que el incremento en la capacidad invasiva de las células se puede deber también en parte a la secreción, por parte de las poblaciones celulares seleccionadas, de metaloproteinasas de la matriz.

Los péptidos G, con secuencias que se encuentran en el dominio globular de la cadena α_1 de la laminina-1, a través de la integrina $\alpha_6\beta_1$, activan las señales que provocan la invasión por estimulación de la formación de estructuras denominadas *invadopodia* (Nakahara *et al.*, 1996). Por otro lado, las células seleccionadas por coinyección con laminina probablemente interaccionen de forma más fácil con la matriz subendotelial (que contiene laminina). Así, se ha postulado que la adhesión de células cancerosas circulantes a la laminina presente en la matriz subendotelial es una de las etapas clave en el proceso metastático (Taraboletti *et al.*, 1993). La coinyección del péptido IKVAV, derivado de la cadena α de la laminina, estimula la colonización del hígado por células de cáncer de colon, probablemente por favorecer interacciones célula-célula o célula-sustrato en el hígado (Bresalier *et al.*, 1996).

La fibronectina está presente en la superficie sinusoidal del hepatocito, rodeando los capilares en el hígado. Por tanto, la probable selección producida por la interacción de las células BCS-TC2 con fibronectina podría favorecer más tarde la adhesión celular en el hígado. Se ha encontrado que la fibronectina asociada a la superficie de los hepatocitos es la responsable de la adhesión de células TA3/St, de carcinoma de mama murino (Kemperman *et al.*, 1994). Se ha indicado que la interacción con la fibronectina, presente en esta localización, puede tener una importancia crucial para la metástasis hepática de ciertos tumores (Kemperman *et al.*, 1995). Además, hay que considerar que la fibronectina plasmática del huésped puede interaccionar con las células tumorales, formándose un

agregado que incrementa la permanencia (alojamiento) de las células en los capilares y/o preservar la viabilidad de la célula tumoral contra el stress mecánico (o de otro tipo) en los vasos. También, hay que considerar que, tanto la laminina como la fibronectina, junto con trombospondina y proteoglicanos, son las principales proteínas de adhesión que participan en la captación de células en el lecho vascular (Tuszynski *et al.*, 1997).

En la mayor parte de nuestros estudios se observa la formación de metástasis después de largos períodos de tiempo (8-10 meses). Este resultado sugiere que la capacidad invasiva de las células es considerablemente inferior a la descrita para otras células de adenocarcinoma de colon. Como ejemplo, la línea HT-29, origina metástasis hepática en el 100% de los ratones sólo dos meses después de la inoculación (Tabla XVI). Un procedimiento general para la obtención de líneas celulares tumorales con capacidad metastática incrementada consiste en seleccionar las células metastáticas *in vivo*. Para ello, se obtienen células procedentes de los focos metastáticos y éstas se establecen en cultivo o bien se coinyectan de nuevo para producir nuevas metástasis. De esta manera se obtienen, normalmente, células con una capacidad metastática muy superior a la que presenta la línea parental de la que proceden (Fidler, 1995). Por este motivo se planteó la posibilidad de establecer nuevas sublíneas celulares a partir de los focos secundarios.

De manera general, en los casos en que se ha desarrollado un foco metastático en el hígado, se aprecia un número discreto de colonias que se distribuyen por los distintos lóbulos hepáticos, predominando en la periferia del órgano (Figura 68A). El examen histológico de todas las metástasis hepáticas obtenidas muestra unos resultados similares, independientemente del tipo de células inyectadas en bazo o del factor coinjectado con éstas. En el tejido hepático invadido por las células de carcinoma de colon se observa crecimiento tumoral en forma de nódulos compactos (Figura 68B). Se visualiza una zona con células con mayor capacidad proliferativa y una zona más acelular, localizada en la región interna de la masa tumoral (Figura 68C).

Para conseguir células que presenten, al menos a priori, la mayor capacidad metastática posible, se seleccionaron las dos metástasis hepáticas que se habían originado en el menor período de tiempo desde la inyección de las células (2-3 meses). Estas metástasis hepáticas corresponden a las formadas por células BCS-TC2 inyectadas en presencia de fibronectina (denominadas BCS-TC2.FNH) y células BCS-TC2.2 coinjectadas con matrigel (denominadas BCS-TC2.2.MGH).

En ambos casos, 7 días después de la siembra de los explantes se observa la salida de células a partir de éstos. Las células son tanto de naturaleza epitelial como fibroblástica, siendo el número de estas últimas muy bajo en comparación al de las células epiteliales. Las células con morfología fibroblástica desaparecen después de 15 días en cultivo.

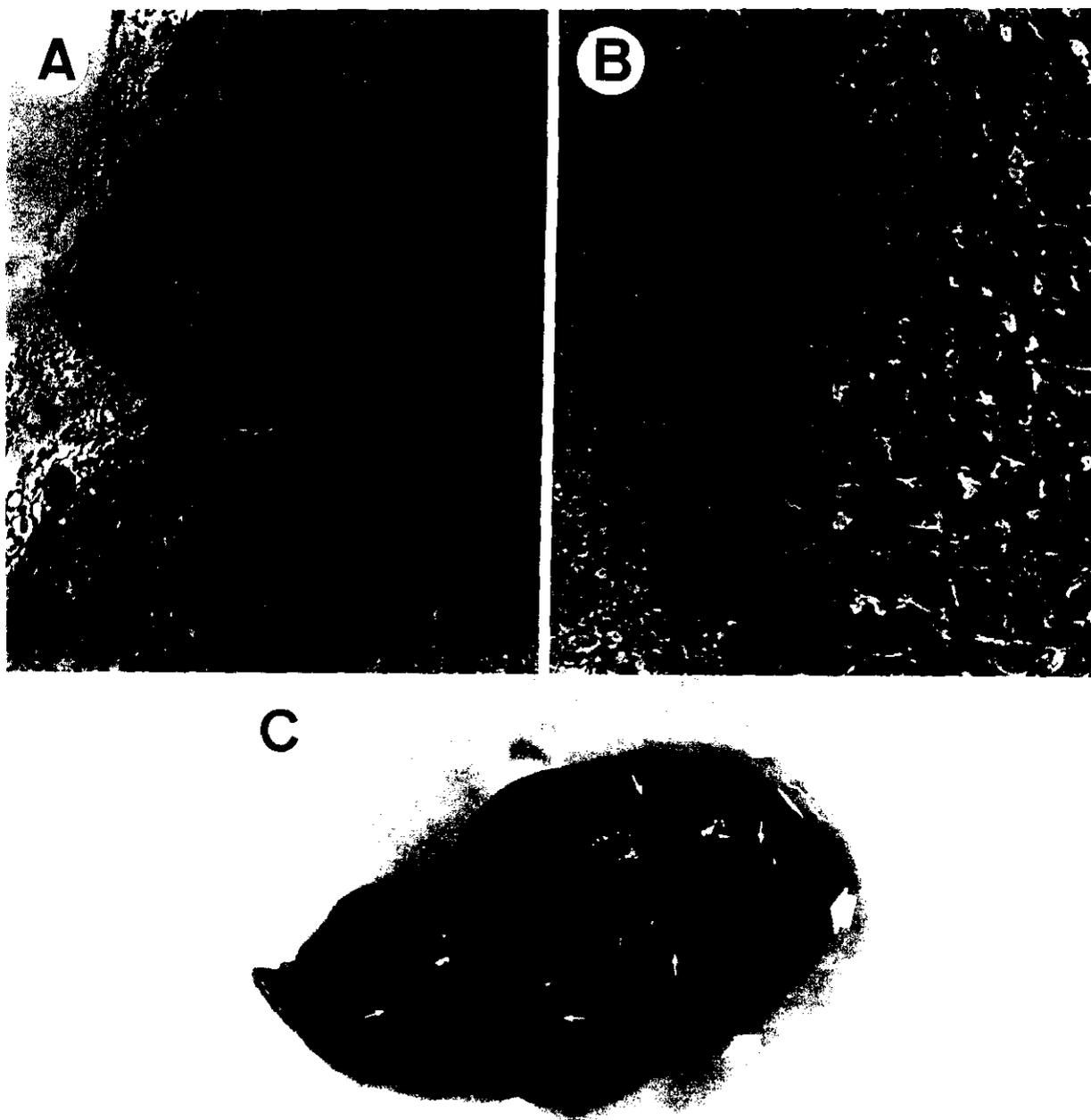


Figura 68.- Formación de metástasis hepáticas en ratones atímicos.

Análisis histológico de las metástasis hepáticas (A,B) tras tinción de secciones del tumor con eosina/hematoxilina. (h) hepatocitos; (p) zona proliferativa de la masa tumoral; (i) región interna del foco metastático. (A, x100; B,x200). (C) Metástasis hepática tras la inoculación de células BCS-TC2 en presencia de fibronectina en el bazo de ratones atímicos. Las colonias se localizan en la periferia del órgano (se indican con flechas).

Las células epiteliales proliferan formando monocapas semejantes a las formadas por las células BCS-TC2. Sin embargo, se pueden destacar algunas diferencias. Las células BCS-TC2.FNH presentan un incremento en el grado de extensión celular y una mayor facilidad para ser liberadas de la superficie de cultivo durante el proceso de tripsinización.

Este hecho no se observa en las células BCS-TC2.2.MGH, pero presentan una morfología considerablemente más bipolar que las células parentales de las que proceden.

3.7.2. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PROCEDENTES DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

Estudios morfológicos

Puesto que, mediante microscopía óptica de contraste de fase, se han observado diferencias morfológicas entre las células parentales y las células BCS-TC2.FNH y BCS-TC2.2.MGH, se han realizado estudios morfológicos por microscopía óptica de contraste de fase y microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Los resultados quedan recogidos en las figuras 69 y 70.

Por microscopía electrónica de barrido se observa que las células BCS-TC2.FNH presentan un diámetro medio de $14,25 \pm 1,62 \mu\text{m}$ superior a los aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro de la línea parental. Además, presentan una membrana polarizada, localizándose la totalidad de las microvellosidades en la zona apical, como se observa en la figura 69C. Las células BCS-TC2 diferenciadas por tratamiento con butirato sódico se caracterizan por un tamaño celular incrementado, una morfología más extendida y polarización celular (Navarro *et al.*, 1997). En este caso, por tanto, el mayor grado de diferenciación (Figura 69C) también se correlaciona con el incremento del tamaño celular (Figura 69A,B) y la morfología más extendida que presentan las células BCS-TC2.FNH.

El análisis morfológico de las células BCS-TC2.2.MGH indica un alto porcentaje de células bipolares y un tamaño ligeramente menor ($9,56 \pm 1,02 \mu\text{m}$ de diámetro) respecto de las células parentales BCS-TC2 (Figura 70A,B). Por microscopía electrónica de transmisión (Figura 70C) no se detecta polarización celular, lo que sugiere que estas células presentan un bajo grado de diferenciación, al igual que las células parentales.

Estudios de cariotipo

Los estudios de cariotipo indican, en primer lugar, que las células obtenidas a partir de las metástasis hepáticas son de origen humano y no de ratón. En estas células se mantienen las dos alteraciones presentes en las células parentales [der(15), der(16)] y se aprecia además la alteración en el cromosoma 9, detectado en todas las sublíneas obtenidas en los estudios de tumorigenicidad. Estos resultados confirman que este cambio genético pueda estar relacionado, al menos en parte, con la capacidad tumorigénica y metastática de estas células.

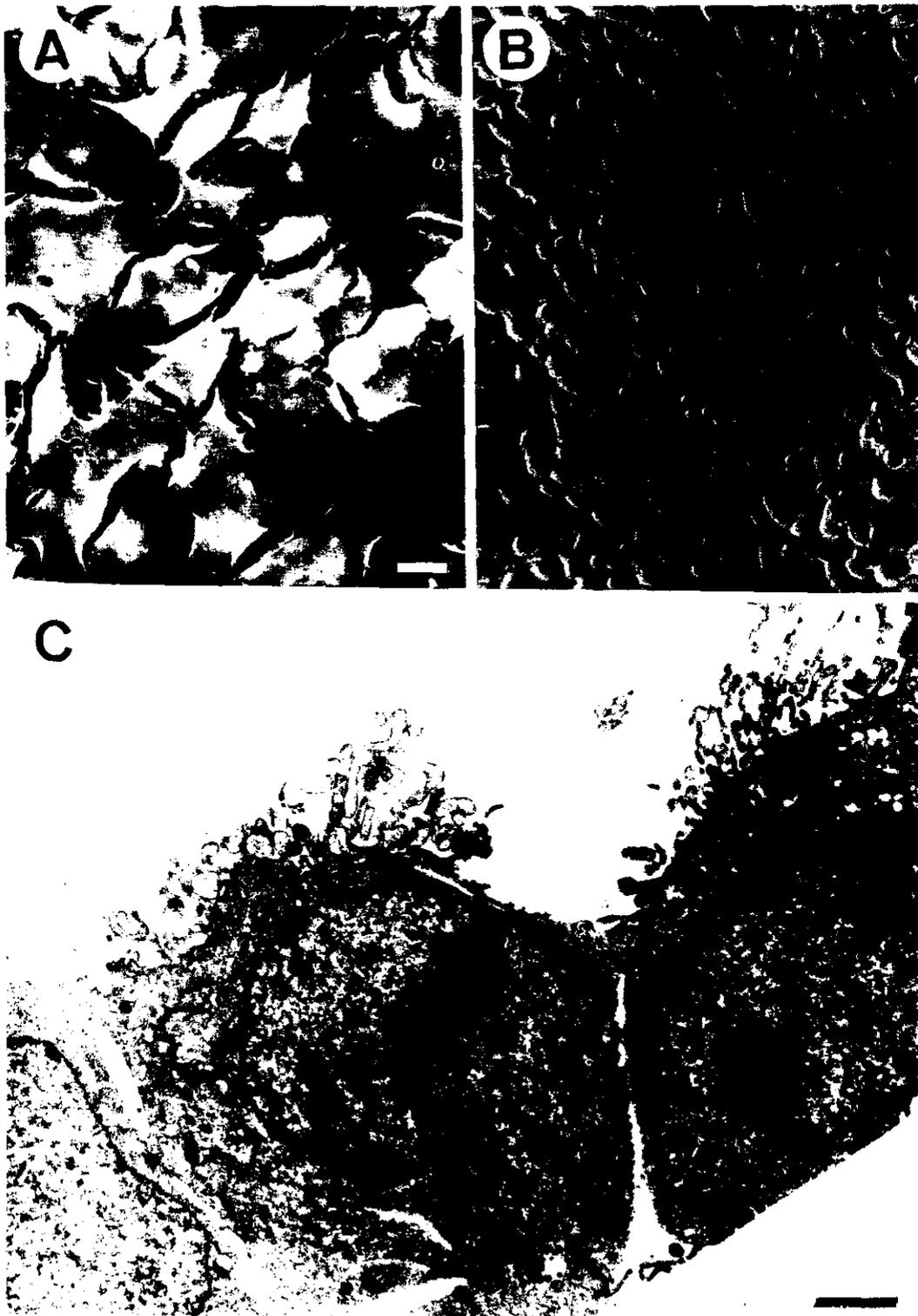


Figura 69.- Caracterización morfológica de las células BCS-TC2.FNH

La morfología de las células se analiza por microscopía electrónica de barrido (A; barra 10 μm), microscopía óptica de contraste de fase (B; x20) y microscopía electrónica de transmisión (C; barra 1,7 μm).

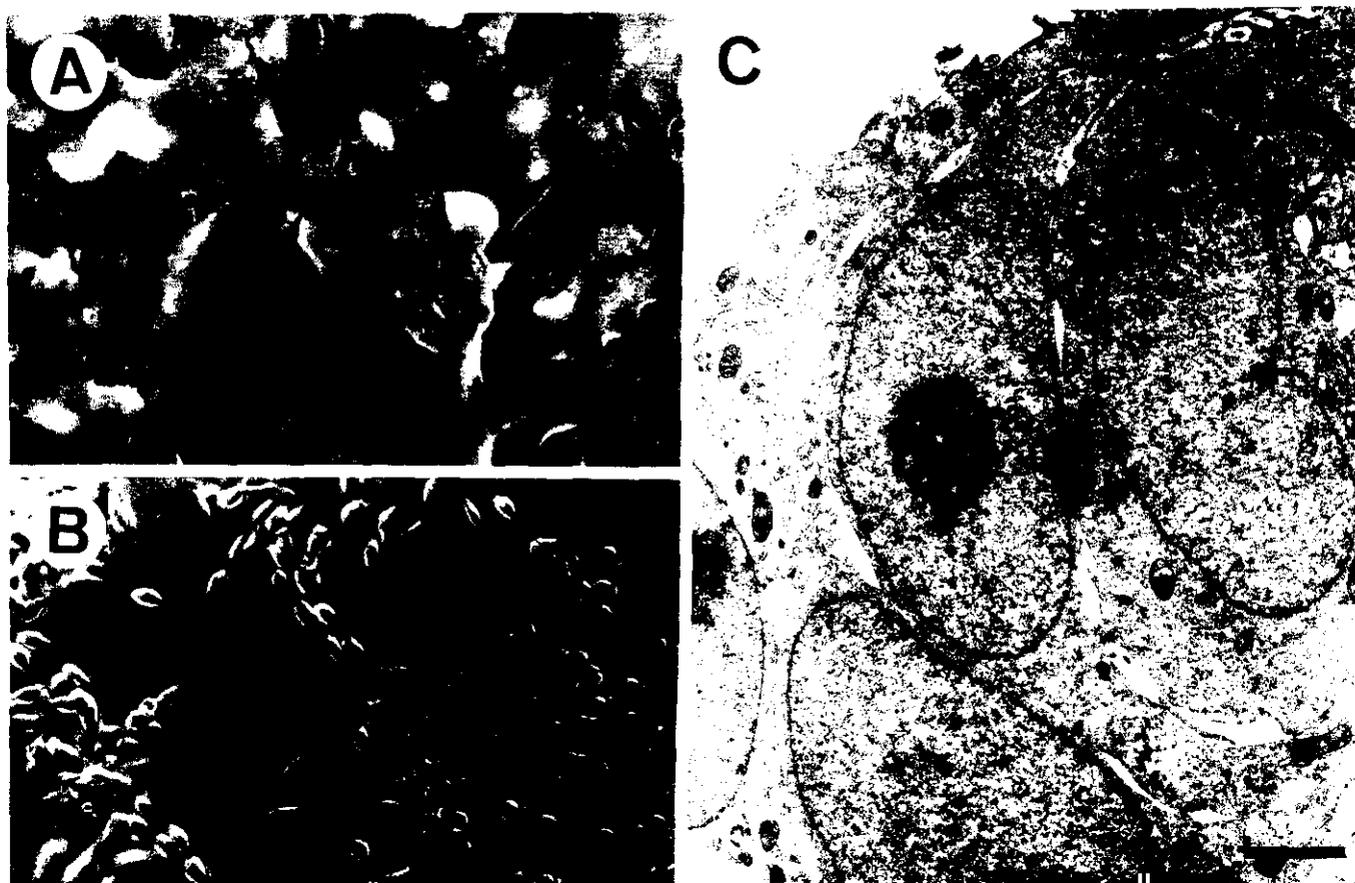


Figura 70.- Caracterización morfológica de las células BCS-TC2.2.MGH.

La morfología de las células se analiza por microscopía electrónica de barrido (A; barra 10 µm), microscopía óptica de contraste de fase (B; x20) y microscopía electrónica de transmisión (C; barra 1,7 µm).

Estudios de tumorigenicidad

Para comparar estas nuevas sublíneas con las ya establecidas, se ha procedido a determinar su capacidad tumorigénica, inyectándolas subcutáneamente en ratones atímicos. Los resultados quedan recogidos en la figura 71.

Las células BCS-TC2.FNH desarrollan tumores por sí solas, con una incidencia del 100% (Figura 71A). La capacidad tumorigénica de estas células es bastante similar a la que presentan la sublínea BCS-TC2.FN obtenida por selección tras la inyección subcutánea de las células parentales en presencia de fibronectina. Por tanto, estos resultados sugieren que la interacción con esta glicoproteína permite que las células sobrevivan y proliferen tanto en el sitio primario como en una localización secundaria, originando la metástasis.

Las células BCS-TC2.2.MGH muestran una menor capacidad tumorigénica de las células que las que proceden, como se aprecia en la figura 71B. La formación de tumores por las células BCS-TC2.2.MGH tiene lugar en el 60-70% de los ratones, mientras que las

células BCS-TC2.2 presentan una incidencia del 100%. Además, el tamaño de los tumores desarrollados por las células BCS-TC2.2.MGH, para un mismo tiempo desde la inoculación de las células, es considerablemente inferior al de las células BCS-TC2.2.

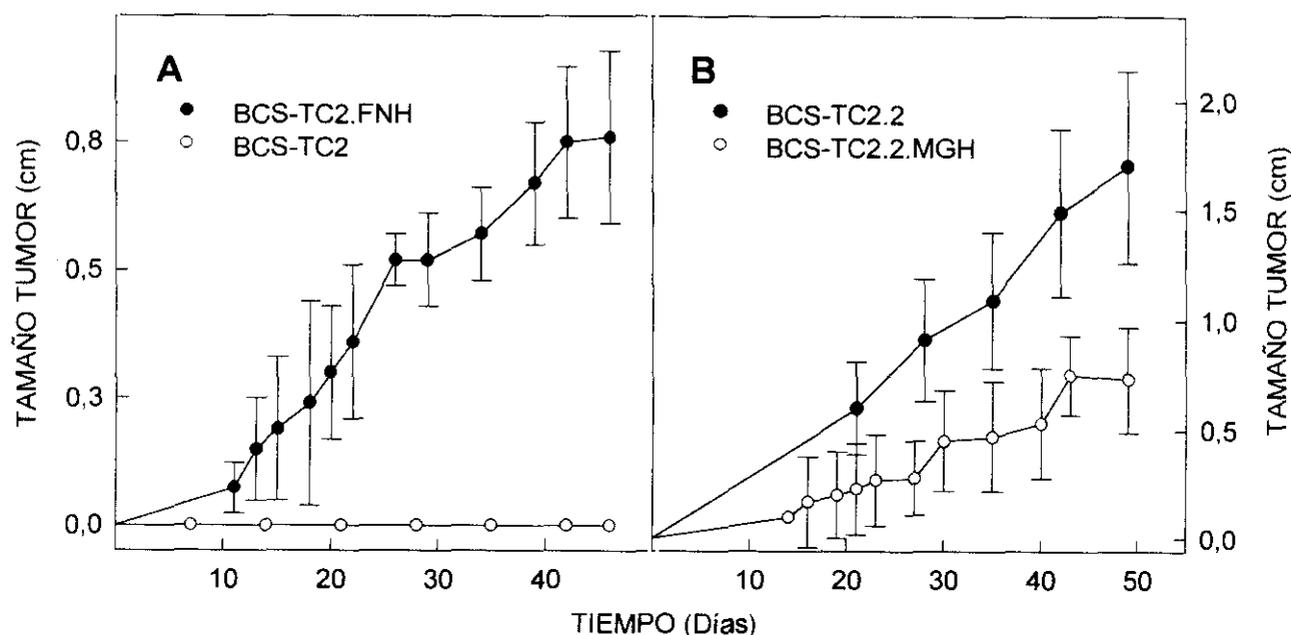


Figura 71.- Crecimiento *in vivo* de las células BCS-TC2.FNH y BCS-TC2.2.MGH.

La tumorigenicidad se estudia inyectando subcutáneamente en ratones atímicos 1×10^6 células BCS-TC2.FNH (A) y BCS-TC2.2.MGH (B). El tamaño de los tumores se mide a distintos tiempos desde la inoculación. La incidencia se determina 8 semanas después de la inyección. Como control se inyectan, en cada caso, las células de las cuales proceden (BCS-TC2 y BCS-TC2.2). Los experimentos se realizan dos veces, utilizando en cada experimento 4 ratones, representándose los valores medios.

Con el establecimiento de estas dos nuevas líneas celulares procedentes de metástasis hepáticas, se ha desarrollado un sistema modelo muy completo, células no invasivas del sitio primario y las derivadas de ellas con diferente capacidad tumorigénica y metastática. Así, se dispone de una base para el estudio de los cambios fenotípicos y genotípicos asociados a la adquisición del carácter maligno de células de adenocarcinoma de colon y para la identificación de potenciales biomarcadores de pronóstico.

CONCLUSIONES

Los estudios *in vitro* de interacción de las células BCS-TC2 con componentes de la matriz extracelular permiten concluir que:

- El comportamiento de las células BCS-TC2 se altera tras su interacción con la ECM o con sus componentes individuales (colágenos de tipo I y IV, laminina y fibronectina). En presencia de estos sustratos se incrementa la capacidad adhesiva de las células. Las secuencias -RGD- de la fibronectina e -IKVAV- de la laminina median en este proceso de adhesión. La extensión celular se favorece por fibronectina y colágenos, mientras que la laminina promueve tanto la extensión como la agregación, posiblemente a través de señales desencadenadas por distintos receptores celulares. Todos los ligandos de la ECM estudiados incrementan la capacidad proliferativa y mitótica de las células.
- La interacción de estas células con la ECM tiene lugar principalmente a través de receptores de tipo integrina. Se han identificado las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ como los principales receptores para fibronectina y colágenos, respectivamente. La integrina $\alpha_6\beta_1$ constituye el principal receptor para laminina, aunque no se puede descartar la participación de otras proteínas, tales como integrinas ($\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_3\beta_1$), galactosil-lectinas, 5'-nucleotidasa y la proteína de unión a laminina de 67 kDa, en la adhesión celular mediada por esta glicoproteína.
- La interacción con la ECM induce la formación de contactos focales y la reorganización del citoesqueleto en las células BCS-TC2. Con todos los sustratos se observa la fosforilación de residuos de tirosina de una proteína de 125 kDa, que posiblemente corresponda a la tirosina quinasa pp125^{FAK}, que participaría en la transmisión de la señal desde la matriz extracelular al interior celular.

Los estudios *in vivo* relativos a la modificación del fenotipo tumorigénico/metastático de las células BCS-TC2 por su interacción con la matriz extracelular han permitido concluir que:

- Las células BCS-TC2 no presentan capacidad tumorigénica intrínseca, aunque ésta se induce en presencia de matrigel o por componentes de la matriz tales como fibronectina y laminina. La coinyección de las células con distintos colágenos (tipos I, IV y V) no induce el fenotipo tumorigénico de las células.

- A partir de los tumores ha sido posible el establecimiento y caracterización de nuevas sublíneas celulares. Estos estudios sugieren que la propagación *in vivo* de las células en presencia de componentes específicos de la ECM conduce a la selección de subpoblaciones celulares que presentan las dos alteraciones cromosómicas observadas en las células parentales [der(15), der(16)], además de una alteración adicional en el cromosoma 9, manifestando todas ellas capacidad tumorigénica intrínseca.
- Las distintas sublíneas celulares, de naturaleza epitelial, presentan distinto grado de diferenciación celular, sin que se observe una correlación entre éste y el fenotipo tumorigénico de las células.
- La adquisición del fenotipo tumorigénico se correlaciona con alteraciones en los niveles de expresión de integrinas. Las sublíneas tumorigénicas expresan niveles más elevados de las subunidades β_1 , α_2 , α_3 y α_6 , mientras que no se modifican los niveles de α_5 y bajan los de β_4 . Estas diferencias no se reflejan en cambios significativos en la adhesión celular.
- En el medio condicionado por los tumores obtenidos tras la inyección subcutánea de los distintos tipos de células se detecta la presencia tanto de la MMP-2 como la MMP-9. Estas actividades proteolíticas pueden ser secretadas tanto por las células del estroma como por las células transformadas. Las células parentales BCS-TC2 no expresan actividades gelatinolíticas, ni se inducen tras interacción *in vitro* con laminina y matrigel. Únicamente se detecta actividad MMP-2 asociada a la membrana. A diferencia de las células parentales, en los medios condicionados por las sublíneas tumorigénicas se detectan las actividades de MMP-2, MMP-7 y MMP-9. Este hecho, junto con el análisis de los niveles de expresión de estas enzimas por parte de los distintos tipos de células, sugiere la implicación de éstas en la progresión maligna.
- El análisis de mutaciones en el gen *p53* no refleja diferencias entre las células parentales y las sublíneas tumorigénicas.
- El tumor de donde proceden las células BCS-TC2 es de tipo RER⁺. Esto se manifiesta en la inestabilidad genética observada en el tejido tumoral y en los cultivos primarios de las células. Sin embargo, el establecimiento en cultivo de las células produce una aparente reversión del fenotipo mutador. La comparación de secuencias de microsatélites entre las células parentales y las sublíneas tumorigénicas

indica la reactivación de la inestabilidad genética por la propagación *in vivo* de las células. El matrigel puede desempeñar un papel importante en la reaparición del fenotipo mutador.

- Las células parentales no presentan capacidad para inducir la formación de focos secundarios. La matriz extracelular influye en el fenotipo metastático de las células BCS-TC2. Así, las sublíneas celulares, obtenidas por selección con componentes de la ECM, producen metástasis hepáticas. Por otro lado, la coinyección de las células en presencia de laminina, fibronectina o matrigel conduce a la formación de focos secundarios en el hígado y ocasionalmente en el pulmón. A partir de metástasis hepáticas se han establecido en cultivo dos nuevas sublíneas celulares lo que permite ampliar el sistema modelo de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- * Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen, Mecklin JP, Järvinen, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B y de la Chapelle A (1993) "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer" *Science* **260**:812-816.
- * Adams JC y Watt FM (1990) "Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface" *Cell* **63**: 425-435.
- * Akiyama SK (1992) "The role of glycosylation of integrins" *Trends Glycosc Glycotech* **4**:346-356.
- * Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM y LaFlamme SE (1994) "Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras" *J Biol Chem* **269**: 15961-15964.
- * Akiyama SK, Aota S y Yamada KM (1995a) "Function and receptor specificity of a minimal 20 kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin" *Cell Adhes Commun* **3**:13-25.
- * Akiyama SK, Olden K y Yamada KM (1995b) "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis" *Cancer Metast Rev* **14**:173-189.
- * Albelda SM (1993) "Biology of disease. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis" *Lab Invest* **68**:4-17.
- * Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD y Stetler-Stevenson WG (1991) "Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2". *J Natl Cancer Inst* **83**: 779-784.
- * Albini A, Melchiori A, Garofalo A, Noonan DM, Basolo F, Taraboletti G, Chader GJ y Giavazzi R (1992) "Matrigel promotes retinoblastoma cell growth *in vitro* and *in vivo*" *Int J Cancer* **52**:234-240.
- * Allitto BA, Horn GT, Altherr MR, Richards B, McClatchey AI, Wasmuth JJ y Gusella JF (1991) "Detection by PCR of the VNTR polymorphism at the D4S95" *Nucleic Acids Res* **19**: 4015.
- * Anthony DA, McIlwraith AJ, Gallagher WM, Edlin ARM y Brown R (1996) "Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells" *Cancer Res* **56**:1374-1381.
- * Anzano M, Rieman D, Pritchett W, Bowen-Pope DF y Grieg R (1989) "Growth factor production by human colon carcinoma cell lines" *Cancer Res* **49**:2898-2904.
- * Aota S, Nomizu M y Yamada KM (1994) "The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function" *J Biol Chem* **266**: 24756-24761.
- * Arroyo AG, Sánchez-Mateos P, Campanero MR, Martín-Padura I, Dejana E y Sánchez-Madrid F (1992) *J Cell Biol* **117**:659-670.
- * Astrin SM y Costanzi C (1989) "The molecular genetics of colon cancer" *Semin Oncol* **16**:138-147.
- * Aumailley M, Nurcombe V, Edgar D, Paulsson M y Timpl R (1987) "The cellular interactions of laminin fragments. Cell adhesion correlates with two fragment-specific high affinity binding sites" *J Biol Chem* **262**: 11532-11538.
- * Aumailley M, Wiedemann H, Mann K, y Timpl R (1989) *Eur J Biochem* **184**: 241.
- * Aumailley M, Mann K, von der Mark H y Timpl R (1989b) "Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its alpha 2(VI) and alpha 3(VI) chains" *Exp Cell Res* **181**:463-474.
- * Aumailley M, Timpl R y Sonnenberg A (1990a) "Antibody to integrin α_6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8" *Exp Cell Res* **188**: 55-60.
- * Aumailley M, Gerl M, Sonnenberg A, Deutzmann R y Timpl R (1990b) "Identification of the Arg-Gly-Asp sequence in laminin A chain as a latent cell-binding site being exposed in fragment P1" *FEBS Lett* **262**: 82-86.
- * Aumailley M y Krieg T (1994) "Structure and function of the cutaneous extracellular matrix" *Eur J Dermatol* **4**:271-280.
- * Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, Höyhty M, Kauppila A y Tryggvason K (1993) "Expression of 72 kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors" *Lab Invest* **69**:312-321.
- * Azzam HS, Arand GA, Lippman ME y Thompson EW (1993) "MMP-2 activation potential associates with metastatic progression in human breast cancer cell lines, and is independent of MMP-2 production" *J Natl Cancer Inst* **85**:1758-1764.
- * Bao L, Matsumura Y, Baban D, Sun Y y Tarin D (1994) "Effects of inoculation site and matrigel on growth and metastasis of human breast cancer cells" *Brit J Cancer* **70**:228-232.

- * Baretton G, Vogt M, Müller C, Diebold J, Schmidt M, Schneiderbanger K, Schmidt M, Lohrs V (1996) "Prognostic significance of *p53* expression, chromosome 17 copy number, and DNA ploidy in non-metastasized colorectal carcinomas (stage IB and II)" *Scand J Gastroenterol* **31**:481-489.
- * Bartolazzi A, Kaczmarek J, Nicoló G, Risso AM, Tarone G, Rossino P, Defilippi P y Castellani P (1993) "Localization of the $\alpha_3\beta_1$ integrin in some common epithelial tumors of the ovary and in normal equivalents" *Anticancer Res* **13**:1-12.
- * Basbaum CB y Werb Z (1996) "Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface" *Curr Opin Cell Biol* **8**:731-738.
- * Bateman FJ, Lamandé SR y Ramshaw JAM (1996) "Collagen superfamily" *Extracellular Matrix* pp 23-67. Ed WD Comper. Harwood Academic Publishers.
- * Beck K, Hunter I, y Engel J (1990) "Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein" *FASEB J* **4**: 148-160.
- * Benezra M, Vlodyasky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G y Bar-Shavit R (1993) "Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix" *Blood* **81**:3324-3331.
- * Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M y Taylor-Papadimitriou J (1992) "Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: The role of the $\alpha_2\beta_1$ integrin" *J Cell Sci* **102**: 437-446.
- * Bevilacqua MP y Nelson RM (1993) "Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis" *Thromb Hemost* **70**:152-154.
- * Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A y Engler JA (1993) "Matrix Metalloproteinases: A Review" *Crit Rev Oral Biol Med* **4**:197-250.
- * Birkedal-Hansen H (1995) "Proteolytic remodeling of extracellular matrix" *Curr Opin Cell Biol* **7**:728-735.
- * Blystone SD, Graham IL, Lindberg FP y Brown EJ (1994) "Integrin $\alpha_v\beta_3$ differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor $\alpha_5\beta_1$ " *J Cell Biol* **127**:1129-1137.
- * Bockholt SM y Burridge K (1993) "Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin" *J Biol Chem* **268**:14565-14567.
- * Boland CR (1996) "Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis" *Int J Cancer* **69**: 47-49.
- * Bonfil RD, Vinyals A, Bustuoabad OD, Llorens A, Benavides FJ, Gonzalez-Garrigues M y Fabra A (1994) "Stimulation of angiogenesis as an explanation of matrigel-enhanced tumorigenicity" *Int J Cancer* **58**: 233-239.
- * Bosman T (1993) "Integrin: Cell adhesive and modulators of cell function" *Histochem J*:**25**:469-477.
- * Boudreau N, Myers C y Bissell MJ (1995) *Trends Cell Biol* **5**:1-4.
- * Boudreau N, Sympon CJ, Werb Z y Bissell MJ (1995) "Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix" *Science* **267**: 891-893.
- * Bouzon M, Dussert Ch, Lissitzky JC *et al* (1990) "Spreading of B16F1 cells on laminin and its proteolytic fragments P1 and E8: involvement of laminin carbohydrate chains" *Exp Cell Res* **190**:47-56.
- * Boyer JC, Thomas DC, Maher VN, McCormick JJ y Kunkel TA (1993) "Fidelity of DNA replication by extracts of normal and malignant transformed human cells" *Cancer Res* **53**: 3270-3275.
- * Bradford MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal Biochem* **64**:624-627.
- * Brand MI, Casillas S, Dietz D, Milson JW y Vladisavjevic A (1996) "Development of a reliable colorectal cancer liver metastasis model" *J Surgical Res* **63**:425-432.
- * Brassett C, Joyce JA, Froggatt NJ, Williams G, Furniss D, Walsh S, Miller R, Evans DGR y Maher ER (1996) "Microsatellite instability in early onset and familial colorectal cancer" *J Med Genet* **33**:981-985.
- * Bresalier RS, Schwartz B, Kim YS, Duh QY, Kleinman HK y Sullam PM (1995) "The laminin α_1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells" *Cancer Res* **55**: 2476-2480.
- * Bretscher MS (1992) "Circulating integrins: $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ and Mac-1, but not $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ or LFA-1" *EMBO*

- J* 11:405-410.
- * Bronner CE, Baker SM, Morrison PT *et al* (1994) "Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer" *Nature* 368:258-261.
 - * Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Gatter KC y Carmichael J (1993) "Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma" *J Natl Cancer Inst* 85: 574-578.
 - * Brown JC y Timpl R (1995) "The collagen superfamily" *Int Arch Allergy Immunol* 107:484-490.
 - * Buard A, Zipfel PA, Frey RS y Mulder KM (1996) "Maintenance of growth factor signaling through Ras in human colon carcinoma cells containing K-ras mutations" *Int J Cancer* 67:539-546.
 - * Buras RR, Shabahang M, Davoodi F, Schumaker LM, Cullen KJ, Byers S, Nauta RJ y Evans SRT (1995) "The effect of extracellular calcium on colonocytes: evidence for differential responsiveness based upon degree of cell differentiation" *Cell Prolif* 28:245-262.
 - * Burgeson RE (1993) "Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa" *J Invest Dermatol* 101: 252-255.
 - * Burgeson RE *et al* (1994) *Matrix Biol* 14:209-211.
 - * Burrige K, Turner CE y Romer LH (1992) "Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly" *J Cell Biol* 119:893-903.
 - * Burt RW, DiSario JA y Cannon-Albright L (1995) "Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk" *Annu Rev Med* 46: 371-379.
 - * Burt RW (1996) "Familial risk and colon cancer" *Int J Cancer* 69: 44-46.
 - * Busk M, Pytela R y Sheppard D (1992) "Characterization of the integrin $\alpha_v\beta_6$ as a fibronectin-binding protein" *J Biol Chem* 267: 5790-5796.
 - * Calvete JJ, Henschen A y Gonzalez-Rodriguez J (1991) "Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family" *Biochem J* 274: 63-71.
 - * Cama A, Genuardi M, Guanti G, Radice P y Varesco L (1996) "Molecular genetics of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) *Tumori* 82:122-135.
 - * Campanero MR, Arroyo AG, Pulido R, Ursa A, S de Matías M, Sánchez-Mateos P, Kassner PD, Chan BMC, Hemler ME, Corbí AL, O de Landázuri M y Sánchez-Madrid F (1992) "Functional role of $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common β_1 subunit" *Eur J Immunol* 22:3111-3119.
 - * Canete-Soler R, Litzky K, Lubensky I y Muschel RJ (1994) "Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using *in situ* hybridization" *Am J Pathol* 144:518-527.
 - * Canzian F, Ushijima T, Serikawa T, Wakabayashi K, Sugimura T y Nagao M (1994) "Instability of microsatellites in rat colon tumors induced by heterocyclic amines" *Cancer Res* 54:6315-6317.
 - * Cardarelli PM, Yamagata S, Taguchi I, Gorscan F, Chiang SL y Lobl T (1992) "The collagen receptor $\alpha_2\beta_1$ from MG-63 and HT-1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide" *J Biol Chem* 267:23159-23164.
 - * Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ y Wayner EA (1990) "Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes" *J Cell Biol* 111:3141-3154.
 - * Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG y Nelson DL (1992) "Triplet repeat mutations in human disease" *Science* 256:784-789.
 - * Caspari T, Friedl W, Mandl M *et al* (1994) "Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer" *Lancet* 343:629-632.
 - * Caspersen T, Zedi L y Johansson J (1970) "Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes" *Exp Cell Res* 60: 315-319.
 - * Castronovo V (1993) "Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis" *Invas Metas* 13:1-30.
 - * Chammas R, Veiga SS, Line S, Potocnjak P y Brentani RR (1991a) "Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140" *J Biol Chem* 266: 3349-3355.

- * Chammas R y Brentani R (1991b) "Integrins and metastases: An overview" *Tumour Biol* **12**:309-320.
- * Chan BMC, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR y Hemler ME (1991) "In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells" *Science* **251**:1600-1602.
- * Chan BMC, Kassner PD, Schiro JA, Byers HR, Kupper TS y Hemler MS (1992) "Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin α subunit cytoplasmic domains" *Cell* **68**:1051-1060.
- * Chandrasekaran S, Dean III JW, Giniger MS y Tanzer ML (1991) "Laminin carbohydrates are implicated in cell signaling" *J Cell Biochem* **46**: 115-124.
- * Chao C, Lotz MM, Clarke AC y Mercurio AM (1996) "Function for the integrin $\alpha(6)\beta(4)$ in the invasive properties of colorectal carcinoma cells" *Cancer Res* **56**:4811-4819.
- * Charonis AS, Skubitz APN, Koliakos GG, Reger LA, Dege J, Vogel AM, Wohlhueter T, y Furcht LT (1988) *J Cell Biol* **107**: 1253-1260.
- * Chiang H-S, Peng H-C y Huang T-F (1994) "Characterization of integrin expression and regulation on SW-480 human colon adenocarcinoma cells and the effect of rhodostomin on basal and upregulated tumor cell adhesion" *Bioch Biophys Acta* **1224**:506-516.
- * Chintala SK, Sawaya R, Gokaslan ZL y Rao JS (1996) "Modulation of matrix metalloproteinase-2 and invasion in human glioma cells by $\alpha_3\beta_1$ integrin" *Cancer Lett* **103**: 201-208.
- * Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD y Giavazzi R (1995) "Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor" *Int J Cancer* **58**:460-464.
- * Chomczynsky P y Sacchi N (1987) "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal Biochem* **162**:156-159.
- * Chung LWK (1993) "Implications of stromal-epithelial interaction in human prostate cancer growth, progression and differentiation" *Semin Cancer Biol* **4**:183-192.
- * Cioce V, Castronovo V, Shmookler BM *et al* (1991) "Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer" *J Natl Cancer Inst* **83**:29-36.
- * Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, de Andrade M, Chakraborty R y Caskey CT (1991) "Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphism" *Am J Hum Genet* **49**: 951-960.
- * Clyman RI, Mauray F y Kramer RH (1992) "Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix" *Exp Cell Res* **200**: 272-284.
- * Colognato-Pyke H, O'Rear JJ, Yamada Y, Carbonetto S, Cheng Y-S y Yurchenco PD (1995) *J Biol Chem* **270**: 9398-9406.
- * Conforti G, Zanetti A, Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D Jr, Neyroz P y Dejana E (1990) "Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition" *J Biol Chem* **265**:4011-4019.
- * Cooper HM, Tamura RN y Quaranta V (1991) "The major laminin receptor of mouse embryonic stem cells is a novel isoform of the alpha 6 beta 1 integrin" *J Cell Biol* **115**:843-850.
- * Corcoran ML, Kibbey MC, Kleinman LM y Wahl LM (1995) "Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases" *J Biol Chem* **270**: 10365-10368.
- * Cortés H, Díaz-Rubio E, García A, Herranz C, Martínez C, Muñoz A, Petschen I, Santos JA, Soler D, Valladares Y (1995) "Libro blanco de la oncología en España" Ed Federación de Sociedades Españolas de Oncología.
- * Cossins J, Dudgeon TJ, Catlin G, Gearing AJH y Clements JM (1996) "Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase" *Biochem Biophys Res Comm* **228**: 494-498.
- * Couchman JR (1983) "Adhesion, growth and matrix production by fibroblasts on laminin substrates" *J Cell Biol* **96**: 177-183.
- * Coussens LM y Werb Z (1996) "Matrix metalloproteinases and the development of cancer" *Chem Biol* **3**:895-904.
- * Crabbe T, Smith B, O'Connell J y Docherty A (1994) *FEBS Lett.* **345**: 14-16.
- * Crawford HC y Matrisian LM (1994-95) "Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression" *Invasion Metastasis* **14**:234-245.

- * Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH y Reid BJ (1995) "A p53-dependent mouse spindle checkpoint" *Science* **267**:1353-1356.
- * Daëmi N, Vallet T, Thomasset N, Jacquier MF, Zebda N, Doré JF, Sordat B y Remy L (1995) "Expression of the $\alpha_6\beta_1$ and β_4 integrin subunits, basement membrane organization and proteolytic capacities in low and high metastatic human colon carcinoma xenografts" *Invasion Metastasis* **15**:103-115.
- * Damsky CH y Werb Z (1992) "Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information" *Curr Opin Cell Biol* **4**:772-781.
- * Danen EH, van Muijen GN, van de Wiel-van Kemenade E, Jansen KF, Ruiter DJ, Figdor CG (1993) "Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells" *Int J Cancer* **54**:315-321.
- * Davis GE (1992) "Affinity of integrins for damaged extracellular matrix alpha v beta 3 binds to denatured collagen-type I through RGD" *Biochem Biophys Res Commun* **182**:1025-1031.
- * Davies B, Miles DW, Happerfield KC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD y Balkwill F (1993a) "Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease" *Br J Cancer* **67**: 1126-1131.
- * Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Nezl D, Thomas D, Hanby A y Balkwill F (1993b) "Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion" *Cancer Res* **53**: 5365-5369.
- * Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ y Balkwill FR (1993) "A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts" *Cancer Res* **53**: 2087-2091.
- * Dean III JW, Chandrasekaran S, y Tanzer ML (1990) "A biological role of the carbohydrate moieties of laminin" *J Biol Chem* **265**: 12553-12562.
- * De Benedetti K, Varesco L, Pellegata NS *et al* (1994) "Genetic events in sporadic colorectal adenomas: K-ras and p53 heterozygous mutations are not sufficient for malignant progression" *Anticancer Res* **13**:667-670.
- * Decloitre F, Cassingena R, Estrade S y Martin M (1991) "Concomitant alterations of microfilaments and microtubules in human epithelial cells (HBL-100) in relation to their malignant conversion" *Tumor Biol* **12**:111-119.
- * Dedhar S, Ruoslahti E y Pierschbacher MD (1987) "A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes Arg-Gly-Asp sequence" *J Cell Biol* **104**:585-593.
- * Dedhar S (1990) "Integrins and tumor invasion" *BioEssays* **12**:583-590.
- * Dedhar S y Saulnier R (1990) "Alterations in integrin receptor expression on chemically transformed human cells: Specific enhancement of laminin and collagen receptor complexes" *J Cell Biol* **110**:481-489.
- * Dedhar S, Saulnier R, Nagle R y Overall CM (1993) "Specific alterations in the expression of $\alpha_3\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$ integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by *in vitro* invasion through reconstituted basement membrane" *Clin Exp Metastasis* **11**:391-400.
- * Dedhar S y Hanningan GE (1996) "Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling" *Curr Opin Cell Biol* **8**:657-669.
- * Dejana E, Colella S, Conforti G, Abbadini M, Gaboli M y Marchisio PC (1988) "fibronectin and vitronectin regulate the organization of their respective Arg-Gly-Asp adhesionreceptors in cultured human endothelial cells" *J Cell Biol* **107**: 1215-1223.
- * De Luca M, Tamura RN, Kajiji S, Bondanza S, Rossino P, Cancedda R, Marchisio PC y Quaranta V (1990) "Polarized integrin mediates human keratinocyte adhesion to basal lamina" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:6888-6892.
- * Dowling J, Yu Q-C y Fuchs E (1996) " β_4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival" *J Cell Biol* **134**:559-572.
- * D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR y Plow EF (1991a) "A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition" *Nature* **350**:66-68.
- * D'Souza SE, Ginsberg MH y Plow EF (1991b) "Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif" *Trends Biochem Sci* **16**:246-250.
- * East JA, Langdon SP, Townsend KMS, Hickman JS (1992) "The influence of type I collagen on the

- growth and differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line HT-29 *in vitro*" *Differentiation* **50**:179-188.
- * Eble JA, Golbrik R, Mann K y Kühn K (1993) "The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [α 1(IV)] α 2(IV)]" *EMBO J* **12**:4795-4802.
 - * Ekblom P (1993) "Basement membranes in development" *Molecular and cellular aspects of basement membranes* Ed. by Rohrbach DH y Timpl R, Academic Press, San Diego, CA, pp.359-383.
 - * Ekblom P, Ekblom M, Fecker L, Klein G, Zhang HY, Kadoya Y, Chu ML, Mayer U y Timpl R (1994) "Role of mesenchymal nidogen in epithelial basement membrane assembly and in organogenesis" *Development* (BUSCAR CITA)
 - * Elices MJ y Hemler ME (1989) "The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others" *Proc Nat Acad Sci USA* **86**:9906-9910.
 - * Elices MJ, Urry LA y Hemler MW (1991) "Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations" *J Cell Biol* **112**:169-181.
 - * Engel J (1996) "Domain organizations of modular extracellular matrix proteins and their evolution" *Matrix Biol* **15**:295-299.
 - * Engvall E y Wewer UM (1996) "Domains of laminin" *J Cell Biochem* **61**: 493-501.
 - * Enomoto M, Leboy PS, Menko AS y Boettiger D (1993) "Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin" *Exp Cell Res* **205**: 276-285.
 - * Ess K, Chen H, Kier A y Brackenbury R (1995) "Suppression of tumorigenicity, but not invasion, in glioblastoma/HeLa cell hybrids" *J Cell Physiol* **162**:241-347.
 - * Falcioni R, Kennel SJ, Giacomini P, Zupi G y Sacchi A (1986) *Cancer Res* **46**:5772-5778.
 - * Falcioni R, Perrotti N, Piaggio G, Kennel SK y Sacchi A (1989) *Mol Carcinog* **2**:361-368.
 - * Falcioni R, Turchi V, Vitullo P *et al* (1994) "Integrin β_4 expression in colorectal cancer" *Int J Oncol* **5**:573-578.
 - * Farber RA, Petes TD, Dominska M, Hudgens SS y Liskay RM (1994) "Instability of simple sequence repeats in a mammalian cell line" *Human Mol Genet* **3**: 253-256.
 - * Farina AR, Tiberio A, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A y Mackay AR (1996) "Identification of plasminogen in Matrigel (TM) and its activation by reconstitution of this basement membrane extract" *Biotechniques* **21**:904-909.
 - * Fearon ER y Vogelstein B (1990) "A genetic model for colorectal tumorigenesis" *Cell* **61**:759-767.
 - * Fidler IJ (1975) "Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2-deoxyuridine" *J Natl Cancer Inst* **45**:773.
 - * Fidler IJ y Talmadge JE (1986) "Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell" *Cancer Res* **46**:5167-5171.
 - * Fidler IJ (1986) "Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis" *Cancer Metastasis Rev* **5**:29-49
 - * Fidler IJ y Radinsky R (1990) "Genetic control of cancer metastasis" *J Natl Cancer Inst* **82**: 166-168.
 - * Fidler IJ (1990) "Special Lecture. critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H.A. Clowes Memorial Lecture" *Cancer Res* **50**:6130-6138.
 - * Fidler IJ (1991) "Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis" *Cancer Metastasis Rev* **10**:229-243.
 - * Fidler IJ (1995) "Biological determinants of invasion and metastasis" *Cancer of the colon, rectus and anus* McGraw-Hill, NY.
 - * Fiedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ y Imhof BA (1995) "High expression level of α_6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival" *Cancer Res* **55**:901-906.
 - * Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS *et al* (1993) "The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer" *Cell* **75**:1027-1038.
 - * Fisher DE (1994) "Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold" *Cell* **78**:539-542.
 - * Fogerty FJ, Akiyama SK, Yamada KM y Mosher DF (1990) "Inhibition of binding of fibronectin to

- matrix assembly sites by anti-integrin ($\alpha_5\beta_1$) antibodies" *J Cell Biol* **111**:699-708.
- * Folkman J y Klagsburn M (1987) "Angiogenic factors" *Science* **235**:444-447.
 - * Folkman J *et al* (1988) "A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor-is stored within basement membrane" *Am J Pathol* **130**:393-400.
 - * Folkman J (1995) "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease" *Nature Med* **1**: 27-31.
 - * Fong KM, Zimmerman PV y Smith PJ (1995) "Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* **55**: 28-30.
 - * Fosang AJ y Hardingham TE (1996) "Matrix proteoglycans" *Extracellular Matrix* pp 200-229. Ed WD Comper. Harwood Academic Publishers.
 - * Freedman MR, Bagli DJ, Lamb CC *et al* (1994) "Culture of a prostatic cell line in basement membrane gels results in an enhancement of malignant properties and constitutive alterations in gene expression" *J Cell Physiol* **158**:325-336.
 - * Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar A y Mulshine JJ (1990) "Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and drug resistance of small cell lung carcinoma cell lines" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:6698-6702.
 - * Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, Yannelli JR, Martin FR, y Kleinman HK (1991) "Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel" *J Natl Cancer Inst* **83**: 769-774.
 - * Fridman R, Sweeney TM, Zain M, Martin GR y Kleinman HK (1992) "Malignant transformation of NIH-3T3 cells after subcutaneous co-injection with a reconstituted basement membrane (Matrigel)" *Int J Cancer* **51**: 740-744.
 - * Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Guille I, Terpe HJ y Imhof BA (1995) "CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer" *Cancer Res* **55**:901-906.
 - * Fujii H, Komazawa H, Mori H, Kojima M, Itoh I, Murata J, Azuma I y Saito I (1995) "Antimetastatic activities of synthetic Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) and Arg-Leu-Asp-Ser (RLDS) peptide analogues and their inhibitory mechanisms" *Biol Pharm Bull* **18**:1681-1688.
 - * Fujita S, Suzuki H, Kinoshita M y Hirohashi S (1992) "Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of human carcinoma cells by anti-integrin β_1 subunit antibody" *Jpn J Cancer Res* **83**:1317-1326.
 - * Fujita S, Watanabe M, Kubota T, Teramoto T y Kitajima M (1995) "Alteration of the expression in integrin β_1 -subunits correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer" *Cancer Lett* **91**:145-149.
 - * Gailit J y Ruoslahti E (1988) "Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations" *J Biol Chem* **263**: 12927-12933.
 - * Gallick GE, Kurzrock RK, Loetzer WS, Arlinghaus RB y Gutterman JV (1985) "Expression of *p21ras* in fresh primary and metastatic human colorectal tumors" *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1795-1799.
 - * Garbisa S, D'Errico A, Grigioni WF, Biagni G, Caenazzo C, Fastelli G, Stetler-Stevenson W y Liotta LA (1990) "Type IV collagenase augmentation associated with colorectal and gastric cancer progression" In: CC Harris y LA Liotta (eds), *Genetic mechanisms in carcinogenesis and tumor progression*, pp. 203-212, Wiley-Liss, New York.
 - * Gehlsen KR, Dillner L, Engvall E y Ruoslahti E (1988) *Science* **241**:1228-1229.
 - * Gehlsen KR, Dickerson K, Argraves WS, Engvall E y Ruoslahti E (1989) "Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin" *J Biol Chem* **264**:19034-19038.
 - * Gehlsen KR, Davis GE y Sriramarao P (1992) "Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties" *Clin Exp Metastasis* **10**:111-120.
 - * Gentry MK y Olson RA (1975) "A simple specific radioisotopic assay for 5'-nucleotidase" *Anal Biochem* **64**: 624-627.
 - * Giacchetti F y Ruoslahti E (1990) "Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells" *Cell* **60**:849-859.
 - * Giacchetti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E y Ruoslahti E (1992) "Proteolytic processing of endogenous and recombinant β_4 integrin subunit" *J Cell Biol* **118**:951-959.
 - * Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K y Fidler IJ (1986) "Metastatic behavior of tumor cells

- isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice" *Cancer Res* **46**:1928-1933.
- * Giovannucci E y Willett WC (1994) "Dietary factors and risk of colon cancer" *Ann Med* **26**:443-452.
 - * Glanville RW, Rauter A y Fietzek PP (1979) "Isolation and characterization of a native placental basement membrane collagen and its component α chains" *Eur J Biochem* **95**: 383-389.
 - * Goh H-S, Yao J y Smith DR. (1995) "p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients" *Cancer Res* **55**:5217-5221.
 - * Gong JG, Wang DH, Sun LZ, Zborowska, Willson JKV y Brattain MG (1997) "Role of alpha(5) beta(1) integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells" *Cell Growth & Differentiation* **8**:83-90.
 - * Goodman S, Deutzmann R y von der Mark K (1987) "Two distinct cell-binding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading" *J Cell Biol* **105**: 589-598.
 - * Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Robey FA y Yamada Y (1987a) "Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis and receptor binding" *Cell* **48**:989-996.
 - * Graf J, Ogle RC, Robey FA, Sasaki M, Martin GR, Yamada Y y Kleinman HK (1987b) "A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67,000 laminin receptor" *Biochemistry* **26**: 6896-6900.
 - * Grant DS, Kibbey MC, Kinsella JL, Cid MC y Kleinman HK (1994) "The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth" *Pathol Res Pract* **190**: 854-863.
 - * Gross JL, Herblin WF, Dusak BA, Czerniak P, Diamond MD, Sun T, Eidsvoog K, Dexter DL y Yayon A (1993) "Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth *in vivo*" *J Natl Cancer Inst* **85**:121-131.
 - * Grzesiak JJ, Davis GH, Kirchhofer D y Pierschbacher MD (1992) "Regulation of $\alpha_2\beta_1$ -mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg^{2+} and Ca^{2+} " *J Cell Biol* **117**:1109-1115.
 - * Gualandris A, López-Conejo T, Giunciuglio D, Albini A, Sabini E, Rusnati M, Dell'Era P y Presta M (1997) "Urokinase-type plasminogen activator overexpression enhances the invasive capacity of endothelial cells" *Microvascular Res* **53**.
 - * Guan JL, Trevithick JE y Hynes RO (1991) "Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120 kDa protein" *Cell Reg* **2**:951-964.
 - * Guillem JG, Paty PB y Rosen N (1995) "Molecular biology of colorectal cancer" *Cancer of the colon, rectum and anus* Eds. AM Cohen, SJ Winawer, MA Friedman y LL Gunderson. McGraw-Hill, NY pp 149-156.
 - * Gulino D, Boudignon C, Zhang L, Concord E, Rabiet M-J y Marguerie G (1992) " Ca^{2+} -binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interacting domain" *J Biol Chem* **267**:1001-1007.
 - * Gullberg D, Turner DC, Terracio L, Borg TK y Rubin K (1990) "Different β_1 -integrin collagen receptors on rat hepatocytes and cardiac fibroblasts" *Exp Cell Res* **190**:254-264.
 - * Gullberg D, Gehlsen K, Turner DC, Ählén K, Zijenah LS, Barnes MJ y Rubin K (1992) "Analysis of $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent $\alpha_1\beta_1$ binding sites in collagen type I" *EMBO J* **11**:3865-3873.
 - * Gullberg D y Ekblom P (1995) "Extracellular matrix and its receptors during development" *Int J Dev Biol* **39**:845-854.
 - * Gunji Y y Gorelik E (1988) "Role of fibrin coagulation in protection of murine tumor cells from destruction by cytotoxic cells" *Cancer Res* **48**: 5216-5221.
 - * Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonnenberg A y Damsky CH (1990) "The $\alpha_6\beta_1$ integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin" *J Cell Biol* **110**:2175-2184.
 - * Hamawy MM, Mergenhagen SE y Siraganian RP (1993) "Cell adherence to fibronectin and the aggregation of the high affinity immunoglobulin E receptor synergistically regulate tyrosine phosphorylation of 105-115 kDa proteins" *J Biol Chem* **268**:5227-5233.

- * Hanks SK, Calalb MB, Harper MC y Patel SK (1992) "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin" *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:8487-8491.
- * Hara M, Yaar M, Tang A, Eller MS, Reenstra W y Gilchrist BA (1994) "Role of integrins in melanocyte attachment and dendricity" *J Cell Sci* **107**:2739-2748.
- * Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH y Parsons JT (1996) "p130^{Cas}, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase" *J Biol Chem* **271**:13649-13655.
- * Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson-Johannes A, Mondal K, Ralph P y Baldwin Jr AS (1991) "Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity" *Cell* **65**:1281-1289.
- * Hautanen A, Gailit J, Mann DM y Ruoslahti E (1989) "Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor" *J Biol Chem* **264**: 1437-1442.
- * Hay ED (1991) "*Cell biology of the extracellular matrix*" ed.by ED Hay. New York:Plenum, 1991, pp 1-4.
- * Hayman EG, Pierschbacher MD, Suzuki S y Ruoslahti E (1985) *Exp Cell Res* **160**:245-258.
- * Hedman K, Korhonen M, Alitalo K, Vaheri A, Johansson S y Höök M (1979) "Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures" *J Cell Biol* **81**: 83-91.
- * Heilbronn A y Zimmermann H (1995) "5'-Nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells" *Eur J Neurosci* **7**:1172-1179.
- * Heino J (1993) "Integrin-type extracellular matrix receptors in cancer and inflammation" *Ann Med* **25**:335-342.
- * Heino J (1996) "Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation" *Int J Cancer* **65**: 717-722.
- * Hemler ME, Crouse C y Sonnenberg A (1989) "Association of the VLA α_6 subunit with a novel protein" *J Biol Chem* **264**:6529-6535.
- * Hershberger RP y Culp LA (1990) "Cell-type-specific expression of alternatively spliced human fibronectin IIICS mRNAs" *Mol Cell Biol* **10**:662-671.
- * Heussen C y Dowdle EB (1980) "Electroforetic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates" *Anal Biochem* **102**: 196-202.
- * Hiddermann W, von Bassewitz DB, Kleinemeier HJ *et al* (1986) "DNA stermline heterogeneity in colorectal cancer" *Cancer* **58**:258-263.
- * Himmelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ y Muscherl RJ (1994) "Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase/type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells" *J Cell Sci* **107**:477-486.
- * Hogervorst F, Kuikman I, von der Borne AEG y Sonnenberg A (1990) "Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain" *EMBO J* **9**:765-770.
- * Hogervorst F, Admiraal LG, Niessen C, Kuikman I, Janssen H, Daams H y Sonnenberg A (1993) "Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit" *J Cell Biol* **121**:179-191.
- * Honn KV y Tang DG (1992) "Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix" *Cancer Metastasis Rev* **11**:353-375.
- * Huarte J, Stutz A, O'Connell ML, Gubler P, Belin D, Darrow AL, Strickland S y Vassalli JD (1992) "Transient translation silencing by reversible mRNA deadenylation" *Cell* **69**: 1021-1030.
- * Huhtala P, Humphries MJ, McCarthu JB, Tremble PM, Werb Z y Damsky CH (1995) "Cooperative signaling by $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin" *J Cell Biol* **129**:867-879.
- * Humphries MJ, Olden K y Yamada KM (1986) " A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells" *Science* **233**:467-470.
- * Humphries MJ (1990) "The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions" *J Cell Sci* **97**: 585-592.

- * Humphries MJ, Mould AP y Tuckwell DS (1993) "Dynamic aspects of adhesion receptor function-integrins both twist and shout" *Bioessays* **15**:391-397.
- * Humphries MJ (1996) "Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction" *Curr Opin Cell Biol* **8**:632-640.
- * Hunter DD, Shah V, Merlie JP y Sanes JR (1989) "A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction" *Nature* **338**: 229-234.
- * Hunter DD, Cashman N, Morris-Valero R, Bullock JW, Adams SP, y Sanes JR (1991) *J Neur* **11(12)**: 3960-3971.
- * Hynes RO (1990) "Fibronectins" *Springer-Verlag* NY, 546 pp
- * Hynes RO (1992) "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion" *Cell* **69**:11-25.
- * Ingber DE y Folkman J (1989) "Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis. In vitro: Role of extracellular matrix" *J Cell Biol* **109**:317-330.
- * Ingber DE (1990) "Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:3579-3583.
- * Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D y Perucho M (1993) "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis" *Nature* **363**:558-561.
- * Ito K, Ryuto M, Ushiro S *et al* (1995) "Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on Matrigel" *J Cell Physiol* **162**:213-224.
- * Iwamoto Y, Nomizu M, Yamada Y, Ito Y, Tanaka K y Sugioka Y (1996) "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)" *Brit J Cancer* **73**:589-595.
- * Jacob K, Bosserhoff AK, Wach F *et al* (1995) "Characterization of selected strongly and weakly invasive sublines of a primary human melanoma cell line and isolation of subtractive cDNA clones" *Int J Cancer* **60**:668-675 (1995).
- * Jeziorska M, Haboubi NY, Schofield PF, Ogata Y, Nagase H y Woolley DE (1994) "Distribution of gelatinase B (MMP-9) and type IV collagen in colorectal carcinoma" *Int J Colorect Dis* **9**: 141-148.
- * Jhanwan SC y Gerdes H (1995) "Molecular biology of familial cancer and polyps" *Cancer of the colon, rectum and annus* Eds. AM Cohen, SJ Winawer, MA Friedman y LL Gunderson. McGraw-Hill, NY pp 137-148.
- * Johansson MW, Larsson E, Luning B, Pasquale EB y Ruoslahti E (1994) "Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated β_1 integrin" *J Cell Biol* **126**:1299-1309.
- * Johansson S (1996) "Non-collagenous matrix proteins" *Extracellular Matrix* pp 68-94. Ed WD Comper. Harwood Academic Publishers.
- * Jones J, Sugiyama M, Giancotti F, Speight PM y Watt FM (1996) "Transfection of beta(4) integrin subunit into a neoplastic keratinocyte line fails to restore terminal differentiation capacity or influence proliferation" *Cell Adhesion and Communication* **4**:4-5.
- * Jothy S, Munro SB, LeDuy L, McClure D y Blaschuk OW (1995) "Adhesion or anti-adhesion in cancer: what matters more?" *Cancer and Metastasis Rev* **14**:363-376.
- * Juliano RL y Haskill S (1993) "Signal transduction from the extracellular matrix" *J Cell Biol* **120**:577-585.
- * Juliano RL (1993) "The role of β_1 integrins in tumors" *Semin Cancer Biol* **4**:277-283.
- * Kadlubar FF, Butler MA, Kaderlik KR, Chou H y Land NP (1992) "Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis" *Environ Health Perspect* **98**:69-74.
- * Kajiji S, Tamura RN y Quaranta V (1989) "A novel integrin ($\alpha_E\beta_4$) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors" *EMBO J* **8**:673-680.
- * Kallunki P, Sainio K, Eddy R, Byers M, Kallunki T, Sariola H, Beck K, Hirvonen H, Shoes TB y Tryggvason K (1992) "A truncated laminin chain homologous to the B2 chain: structure, spatial expression, and chromosomal assignment" *J Cell Biol* **119**: 679-693.
- * Kammerer R y von Kleist S (1994) "CEA expression of colorectal adenocarcinoma is correlated with their

- resistance against LAK-cell lysis" *Int J Cancer* **57**: 341-347.
- * Kanemoto T, Reich R, Royce I, Grotzer D, Adler SH, Shiraishi N, Martin GR, Yamada Y y Kleinman HK (1990) "Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:2279-2282.
 - * Kanemoto T, Martin GR, Hamilton TC, y Fridman R (1991) Effects of synthetic peptides and protease inhibitors on the interaction of a human ovarian cancer cell line (NIH:OVCAR-3) with a reconstituted basement membrane (Matrigel). *Invasion & Metastasis* **11**: 84-92.
 - * Karp JE y Broder S (1995) "Molecular foundations of cancer new targets for intervention" *Nat Med* **1**: 309-320.
 - * Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B y Fornace AJ Jr (1992) "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia" *Cell* **71**:587-597.
 - * Kataoka H, DeCastro R, Zucker S y Biswas C (1993) "Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase" *Cancer Res* **53**:3154-3158.
 - * Kawamata H, Kameyama S, Kawai K, Tanaka Y, Nan L, Barch DH, Stetler-Stevenson WG y Oyasu R (1995) "Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A" *Int J Cancer* **63**: 568-575.
 - * Kawano T, Takasaki S, Tao TW y Kobata A (1993) "Altered glycosylation of β_1 integrins associated with reduced adhesiveness of fibronectin and laminin" *Int J Cancer* **53**:91-96.
 - * Keely PJ, Fong AM, Zutter MM y Santoro SA (1995) "Alteration of collagen-dependent adhesion, motility and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin in mRNA in mammary cells" *J Cell Sci* **108**:595-607.
 - * Kemperman H, Wijnands Y, Meijne AML, y Roos E (1994) "TA3/St, but not TA3/Ha mammary carcinoma cell adhesion to hepatocytes is mediated by $\alpha_5\beta_1$ interacting with surface-associated fibronectin" *Cell Adhes Commun* **2**:45-58.
 - * Kemperman H, Driessens M, La Rivière G, Meijne AML y Roos E (1995) "The role of integrins and integrin activation in liver metastasis" *Invasion Metastasis* **14**:98-108.
 - * Kennedy DW, Rohrbach DH, Martin GR, Momoi T y Yamada KM (1983) *J Cell Physiol* **114**: 257-262.
 - * Kergel, R. (1992) "Expression of multicytokine resistance and multigrowth factor independence in advanced stage metastatic cancer" *Am J Pathol* **141**: 519-524
 - * Kern SE, Pietropol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW y Vogelstein B (1992) "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression" *Science* **256**: 827-830.
 - * Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK y Waterhouse P (1992a) "Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells" *J Natl Cancer Inst* **84**:1017-1022.
 - * Khokha R, Zimmer MJ, Wilson SM y Chambers AF (1992b) "Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells suppresses their metastatic ability in chick embryo" *Clin Exp Metastasis* **10**:365-370.
 - * Kibbey MC, Grant DS y Kleinman HK (1992) "Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an *in vivo* matrigel model" *J Natl Cancer Inst* **84**:1633-1638.
 - * Kielty CM, Hopkinson I y Grant ME (1993) "The collagen family: structure, assembly and organization in the extracellular matrix". In Royce PM and Steinmann B, ed. *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. New York, Wiley-Liss, PP 103-147.
 - * Kikkawa Y, Umeda M y Miyazaki K (1994) "Marked stimulation of cell adhesion and motility by ladsin, a laminin-like scatter factor" *J Biochem* **116**:862-869.
 - * Kim WH, Jun SH, Kibbey MC, Thompson EW y Kleinman HK (1995) "Expression of β_1 integrin in laminin-adhesion-selected human colon-cancer cell lines of varying tumorigenicity" *Invasion Metastasis* **14**:147-155.
 - * Kimball PM y Brattain MG (1980) "Isolation of a cellular subpopulation from a human colonic carcinoma cell line" *Cancer Res* **40**: 1574-1579.

- * Kinzler KW y Vogelstein B (1996) "Lessons from hereditary colorectal cancer" *Cell* **87**:159-170.
- * Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslahti E, Grzesiak J y Pierschbacher MD (1990) "Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa" *J Biol Chem* **265**:18525-18530.
- * Kjellén L y Lindahl U (1991) "Proteoglycans: structures and interactions" *Annu Rev Biochem* **60**:443-475.
- * Kleiner DEJ y Stetle-Stevenson WG (1993) "Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinase" *Curr Opin Cell Biol* **5**: 891-897.
- * Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K y Martin GR (1982) "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma" *Biochemistry* **21**:6188-6193.
- * Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW y Martin GR (1986) "Basement membrane complexes with biological activities" *Biochemistry* **25**:312-318.
- * Kleinman HK, Ogle RC, Cannon FB, Little CD, Sweeney TM y Luckenbill-Edds L (1988) "Laminin receptors for neurite formation" *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1282-1286.
- * Kleinman HK, Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Schasteen CS, Yamada Y, Martin GR, y Robey FA (1989) "Identification of a second active site in laminin for promotion of cell adhesion and migration and inhibition of *in vivo* melanoma lung colonization" *Arch Biochem Biophys* **272**: 39-45.
- * Kleinman HK, Kibbey MC, Schnaper HW, Hadley MA, Dym M y Grant DS (1993) "Role of basement membrane in differentiation" *Molecular and cellular aspects of basement membranes* Ed. by Rohrbach DH y Timpl R, Academic Press, San Diego, CA, pp.309-326.
- * Knibbs RN, Perini F y Goldstein IJ (1989) "Structure of the major concanavalin A ractive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin" *Biochemistry* **28**: 6379-6392.
- * Kobayashi H, Man S, MacDougall JR, Graham CH, Lu C y Kerbel RS (1994) "Variant sublines of early-stage human melanomas selected for tumorigenicity in nude mice express a multicytokine-resistant phenotype" *Am J Pathol* **144**:776-786.
- * Kocialkowski S, Len S y Coulson AR (1995) "DNA sequencing with chain-termination inhibitors" *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5469.
- * Koop S, Khokha R, Schmidt WW, MacDonald IC, Morris VL, Chamber AF y Groom AC (1994) "Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth" *Cancer Res* **54**:4791-4797.
- * Koretz K, Schlag P, Boumsell L y Moller P (1991) "Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases" *Am J Pathol* **138** ó **183**?:741-750.
- * Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Fietz T, Laqué M y Möller P (1994) "Comparative evaluation of integrin α - and β -chain expression in colorectal carcinoma cell lines and in their tumours of origin" *Virchows Archiv* **425**:229-236.
- * Kornberg LJ, Earp HS, Turner CE, Prockop C y Juliano RL (1991) "Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering β_1 integrins" *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:8392-8396.
- * Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M y Juliano RL (1992) "Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase" *J Biol Chem* **267**:23439-23442.
- * Kramer RH, McDonald K y Vu M (1989) "Human melanoma cells express a novel integrin receptor for laminin" *J Biol Chem* **264**:15642-15649.
- * Kramer RH, Cheng YF y Clyman R (1990) "Human microvascular endothelial cells use β_1 and β_3 integrin receptor complexes to attach to laminin" *J Cell Biol* **111**:1233-1243.
- * Kramer RH, Enenstein J y Waleh NS (1993) "Integrin structure and ligand specificity in cell-matrix interactions" In *Molecular and cellular aspects of basement membranes*, ed. by Rohrbach DH y Timpl R, Academic Press, San Diego, CA, pp.239-265.
- * Kühn V (1983) "Chemical properties of collagen" *Immunochemistry of the extracellular matrix*" Vol 1 Ed H Furthmayer pp1-30, CRC Press, Boca Ratón.
- * Lafrenie RM y Yamada KM (1996) "Integrin-dependent signal transduction" *J Cell Biochem* **61**:543-553.

- * Lallier T y Bronner-Fraser M (1992) " $\alpha_1\beta_1$ integrin on neural crest cells recognizes some laminin substrata in a Ca^{2+} independent manner" *J Cell Biol* **119**:1335-1345.
- * Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E y Marchisio PC (1991) "The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity" *J Cell Biol* **112**: 479-490.
- * Larjava H, Peltonen J, Akiyama SK, Yamada SS, Gralnick HR, Uitto J y Yamada KM (1990) "Novel function for β_1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions" *J Cell Biol* **110**:803-815.
- * Larjava H, Lyons JG, Salo T, Mäkelä M, Koivisto L, Birkedal-Hansen H, Akiyama SK, Yamada KM y Heino J (1993) "Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes" *J Cell Physiol* **157**:190-200.
- * Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J *et al* (1993) "Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer" *Cell* **75**:1215-1225.
- * Lee EC, Lotz MM, Steele GD *et al* (1992) "The integrin $\alpha_6\beta_4$ is a laminin receptor" *J Cell Biol* **117**:671-678.
- * Levoy DB, Smith KJ, Beazer-Barclay Y, Hamilton SR, Vogelstein B y Kinzler KW (1994) "Inactivation of both *APC* alleles in human and mouse tumors" *Cancer Res* **54**:5953-5958.
- * Lin CS, Zhang K y Kramer R (1993) " α_6 integrin is up-regulated in step increments accompanying neoplastic transformation and tumorigenic conversion of human fibroblasts" *Cancer Res* **53**:2950-2953.
- * Lindblom A, Tannergard P, Werelius B y Nordenskjöl M (1993) "Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer" *Nature Genet* **5**:279-282.
- * Lindblom A y Paulsson M (1996) "Basement membranes" *Extracellular Matrix* pp 132-174. Ed WD Comper. Harwood Academic Publishers.
- * Liotta LA (1986) "Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **46**:1-7.
- * Liotta LA y Stetler-Stevenson WG (1991) "Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation" *Cancer Res* **51**:5054-5059.
- * Liotta LA, Steeg PS y Stetler-Stevenson WG (1991) "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation" *Cell* **64**:327-336.
- * Lochter A y Bissell MJ (1995) "Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer" *Semin Cancer Biol* **6**: 165-173.
- * Loeb LA (1994) "Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer" *Cancer Res* **54**:5059-5063.
- * Loftus JC, Plow EF, O'Toole Te, Glass A, Felinger AL y Ginsterg MM (1990) "A β_3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation" *Science* **249**:915-918.
- * Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD y Silverstein SC (1991) "CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A α chain of fibrinogen" *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1044-1048.
- * López-Conejo (1992) Tesina de licenciatura.
- * López-Conejo T, Olmo N, Turnay J, Navarro JM y Lizarbe MA (1996) "Characterization of tumorigenic sub-lines from a poorly tumorigenic human colon-adenocarcinoma cell line" *Int J Cancer* **67**:668-675.
- * López-Conejo MT, Turnay J, Olmo N, Navarro MJ y Lizarbe MA (1996) "Effects of matrigel on the tumorigenic potential of BCS-TC2 cells (human colon adenocarcinoma)" *Oncology Reports* **2**: 952.
- * López-Conejo MT, Robledo M, Olmo N, Turnay J, Martínez B, Benítez J y Lizarbe MA (1997) "Microsatellite instability in tumorigenic sublines derived from BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells" *Enviado*.
- * Lotz MM, Korzelius CA y Mercurio AM (1990) "Human colon carcinoma cells use multiple receptors to adhere to laminin: involvement of $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins" *Cell Regul* **1**:249-257.
- * Lovett E (1976) "Family studies in cancer of the colon and rectum" *Brit J Surg* **63**:13-18
- * Lukashv ME, Sheppard D y Pytela R (1994) "Disruption of integrin function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed β_1 integrin cytoplasmic domain" *J Biol Chem* **269**:18311-18314.
- * Luongo C, Moser AR, Gledhill S y Dove WF (1994) "Loss of Apc+ in intestinal adenomas from Min

- mice" *Cancer Res* **54**: 5947-5952.
- * Luparello C, Sheterline P, Pucci-Minafra I y Minafra S (1991) "A comparison of spreading and motility behaviour of 8701-BC breast carcinoma cells on type I, I-trimer and type V collagen substrata" *J Cell Sci* **100**:179-185.
 - * Lynch HT, Kimberling WJ, Albano WA, Lynch JF, Biscione K, Scheinkle GS, Sandberg AA, Lipkin M, Deschner EE, Mikol YB, Elston RC, Bailey-Wilson J y Danes BS (1985) "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndromes 1 and 2).1. Clinical description of resource" *Cancer* **56**:934-938.
 - * Lynch HT, Smyrk T y Lynch FJ (1996) "Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome)" *Int J Cancer* **69**: 38-43.
 - * MacDougall JR, Bani MR, Kin Y, Rak J y Kerbel RS (1995) "The 92 kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells" *Cancer Res* **55**:4174-4181.
 - * MacDougall JR y Matrisian LM (1995) "Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis" *Cancer Met Rev* **14**:351-362.
 - * MacPhee M, Chepenik K, Liddell R, Nelson K, Siracusa L y Buchberg A (1995) "The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the *Mom1* locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia" *Cell* **81**:957-966.
 - * Mafune K, Ravikumar TS, Wong JM, Yow H, Chen LB y Steel GD (1990) "Expression of a Mr 32,000 laminin-binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression" *Cancer Res* **50**:3888-3891.
 - * Majmudar G, Nelson BR, Jensen TC, Voorhees JJ y Johnson TM (1994) "Increased expression of stromelysin-3 in basal cell carcinomas" *Mol Carcinog* **9**:17-23.
 - * Malinda KM y Kleinman HK (1996) "The laminins" *Int J Biochem Cell Biol* **28**:957-959.
 - * Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE y Varon S (1983) *J Cell Biol* **97**: 1882.
 - * Mareel MM, Van Roy FM y De Baetselier P (1990) "The invasive phenotypes" *Cancer Metast Rev* **9**:45-62.
 - * Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR y Burgueson RE (1992) "The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant" *J Cell Biol* **119**:695-703.
 - * Marinovich MP, Varrando P, Keene DR, Meneguzzi G, Lunstrum GP, Ortonne JP y Burgueson RE (1993) "Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical" *Lab Invest* **69**:295-299.
 - * Martignone S, Pellegrini R, Villa E, Tandon NN, Mastroianni A, Tagliabue E, Ménard S y Colnaghi MI (1992) "Characterization of two monoclonal antibodies directed against the 67 kDa high affinity laminin receptor and application for the study of breast carcinoma progression" *Clin Exp Metast* **10**: 379-386.
 - * Martin-Padura I, Bazzoni G, Zanetti A, Bernasconi S, Elices MJ, Mantovani A y Dejana E (1994) "A novel mechanism of colon carcinoma cell adhesion to the endothelium triggered by β_1 integrin chain" *J Biol Chem* **269**:6124-6132.
 - * Matrisian LM (1992) "The matrix-degrading metalloproteinases" *BioEssays* **14**:455-463.
 - * Mayer U, Nischt R, Pöschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y y Timpl R (1993) "A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding" *EMBO J* **12**:1879-1885.
 - * Mayne R y Brewton RG (1993) "New members of the collagen superfamily" *Curr Opin Cell Biol* **5**:883-890.
 - * McDonnell S, Navre M, Coffey RJ y Matrisian LM (1991) "Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas" *Mol Carcinogenesis* **4**:527-533.
 - * Mechan RP (1991) "Receptors for laminin on mammalian cells" *FASEB J* **5**: 2538-2546.
 - * Mechtersheimer G, Barth T, Quentmeier A y Moller P (1994a) "Differential expression of β_1 , β_3 , β_4 integrin subunits in nonneoplastic neural cells of the peripheral and autonomic nervous system and in tumors derived from these cells" *Lab Invest* **70**:740-752.
 - * Mechtersheimer G, Barth T, Quentmeier A y Moller P (1994b) "Differential expression of β_1 integrins in nonneoplastic smooth and striated muscle cells and in tumors derived from these cells" *Am J Pathol*

- 144:1172-1182.
- * Mercurio AM (1995) "Laminin receptors: achieving specificity through cooperation" *Trends in Cell Biol* 5:419-423.
 - * Miyaki M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Konishi M y Takeichi M (1995) "Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells" *Oncogene* 11:2547-2552.
 - * Miyamoto S, Akiyama SK y Yamada KM (1995) "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function" *Science* 267:883-885.
 - * Montgomery AM, Reisfeld RA y Cheresch DA (1994) "Integrin $\alpha_v\beta_3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen" *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8856-8860.
 - * Monsky WL, Kelly T, Lin CY, Yeh Y, Stetler-Stevenson WG, Mueller SC y Chen WT (1993) "Binding and localization of M_r 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia" *Cancer Res.* 53: 3159-3164.
 - * Morikawa K, Walker SM, Jessup M y Fidler IJ (1988) "In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice" *Cancer Res* 48:1943-1948.
 - * Mosher DF (1989) "Fibronectin" *Academic Press* NY, 474 pp.
 - * Mosher DF, Sottile J, Wu C y McDonald JA (1992) "Assembly of extracellular matrix" *Curr Opin Cell Biol* 4:810-818.
 - * Mould AP, Garratt AN, Askari JA, Akiyama SK y Humphries MJ (1995a) "Regulation of integrin $\alpha_5\beta_1$ function by anti-integrin antibodies and divalent cations" *Biochem Soc Trans* 23:395S.
 - * Mould AP, Akiyama SK y Humphries MJ (1995b) "Regulation of integrin $\alpha_5\beta_1$ fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} " *J Biol Chem* 270:26270-26277.
 - * Mould AP (1996) "Getting integrins into shape: Recent insight into how integrin activity is regulated by conformational changes" *J Cell Sci* 109:2613-2618.
 - * Nagle RB, Hao JS, Knox JD, Dalkin BL, Clark V y Cross AE (1995) "Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue" *Am J Pathol* 146:1498-1507.
 - * Nakajima M, Morikawa K, Fabra A, Bucana CD y Fidler IJ (1990) "Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells" *J Nat Cancer Inst* 82: 1890-1898.
 - * Navarro JM (1996) Tesis Doctoral "Aislamiento y caracterización de 5'-nucleotidasa de células BCS-TC2 (Adenocarcinoma de colon humano). Estudios de diferenciación celular". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de CC. Químicas.
 - * Navarro JM, Olmo N, Turnay J, López-Conejo MT y Lizarbe MA (1997) "Differentiation of BCS-TC2 human colon adenocarcinoma cells by sodium butyrate: increase of 5'-nucleotidase activity" *European J Clin Invest* 27 (en prensa).
 - * Naylor MS, Stamp GW, Davies BD y Balkwill FR (1994) "Expression and activity of MMPs and their regulators in ovarian cancer" *Int J Cancer* 58: 50-56.
 - + Nebe B, Rychly J, Knopp A y Bohn W (1995) "Mechanical induction of β_1 -integrin-mediated calcium signaling in a hepatocyte cell line" *Exp Cell Res* 218: 479-484.
 - * Neeman M (1996) "The importance of blood vessels in cancer spread" *Israel J Med Sci* 32:1124-1126.
 - * Newell K, Witty J, Rodgers WH y Matrisian KM (1994) "Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis" *Mol Carcinog* 10:199-206.
 - * Newton JA, Ashwood ER, Yang KD, Augustine NH y Hill HR (1989) "Effect of pentoxifylline on developmental changes in neutrophil cell surface mobility and membrane fluidity" *J Cell Physiol* 140: 427-431.
 - * Newton SA, Reeves EJ, Gralnick H, Mohla S, Yamada KM, Olden K y Akiyama SK (1995) "Inhibition of experimental metastasis of human breast carcinoma cells in athymic nude mice by anti- $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor integrin antibodies" *Int J Oncol* 6:1063-1070.

- * Nicholson LJ y Watt FM (1991) "Decreased expression of fibronectin and the $\alpha_5\beta_1$ integrin during terminal differentiation of human keratinocytes" *J Cell Sci* **98**: 225-232.
- * Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B *et al* (1994) "Mutations of two *PMS* homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer" *Nature* **371**:75-80.
- * Nicolson GL (1988) "Cancer metastasis: Tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites" *Biochem Biophys Acta* **948**:175-224.
- * Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N y Dano K (1996) "92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer" *Int J Cancer* **65**: 57-62.
- * Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH *et al* (1994) "The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin" *Exp Cell Res* **211**:360-367.
- * Nigam AK, Savage FJ, Boulous PB, Stamp GWH, Liu D y Pignatelli M (1993) "Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer" *Br J Cancer* **68**:507-514.
- * Nista A, Mattioni M, Gismondi A, Palmieri G y Santoni A (1996) " β_1 -integrin expression and function in human bladder cancer cells: modulation by TNF α " *Anticancer Res* **16**:581-588.
- * Noël A, Callé A, Emonard E, Nusgens B, Foidart JM y Lapière CM (1988) "Antagonistic effects of laminin and fibronectin in cell-to-cell and cell-to-matrix interactions in MCF-7 cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**:373-380.
- * Noel A, Nusgens B, Lapière CH *et al* (1993) "Interactions between tumoral MCF-7 cells and fibroblasts on matrigel and purified laminin" *Matrix* **13**:267-273.
- * Noguchi P, Wallace R, Johnson J, Earley EM, O'Brien S, Ferrone S, Pellegrino MA, Milstein J, Needy C, Browne W y Petricciani J (1979) "Characterization of WiDr: a human colon carcinoma cell line" *In vitro* **15**: 401-408.
- * Nojima Y, Tachibana K, Sato T, Schlossman SF y Morimoto C (1995) "Focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) is tyrosine phosphorylated after engagement of $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins on human T-lymphoblastic cells" *Cellular Immunology* **161**:8-13.
- * Nowell PC (1976) "The clonal evolution of tumor cell populations" *Science* **194**:23-28.
- * Nurcombe V, Aumailley M, Timpl T, y Edgar D (1989) "The high-affinity binding of laminin to cells. Assignment of a major cell-binding site to the long arm of laminin and of a latent cell-binding site to its short arms" *Eur J Biochem* **180**: 9-14.
- * O'Brien V, Frisch SM y Juliano RL (1996) "Expression of the integrin α_5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation" *Exp Cell Res* **224**:208-213.
- * Okada A, Bellocq J, Chenard M, Rio M, Chambon P y Basset P (1995) "Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast and head and neck carcinomas" *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:2730-2734.
- * Olive M, Untawale S, Coffrey RJ, Siciliano MJ, Wildrick DM, Fritsche H, Pathak S, *et al* (1993) "Characterization of the DiFi rectal carcinoma cell line derived from a familial adenomatous polyposis patient" *In Vitro Cell Dev Biol* **29A**:239-248.
- * Olmo N, Turnay J, Risse G, Deutzmann R, von der Mark K y Lizarbe MA (1992) "Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin" *Biochem J* **282**: 181-188.
- * Olmo N y Lizarbe MA (1994) "Signal transduction through laminin receptors. Effects of extracellular matrix on BCS-TC2 adenocarcinoma cells" En "Cell signal transduction, second messengers and protein phosphorylation in health and disease" Ed. A Martín-Municio y MT Miras-Portugal. Editorial Plenum Publishing Corporation. pp 227-249.
- * Olmo N, Robledo M, López-Conejo MT, Turnay J, Martínez B, Benítez J y Lizarbe MA (1996) "Microsatellite instability in BCS-TC2 cels derived from a human colon adenocarcinoma" *Oncology Reports* **2**: 940.
- * Olmo N, Turnay J, López-Conejo MT, Navarro MJ y Lizarbe MA (1997) "Effects of laminin on non-integrin laminin-binding proteins in BCS-TC2 cells (human adenocarcinoma cell line)" Enviado.
- * Olsen D, Nagayoshi T, Fazio M, Peltonen J, Jaakkola S, Sanborn D, Sasaki T, Kuivaniemi H, Chu M-L,

- Deutzmann R, Timpl R, y Uitto J (1989) *Lab Invest* **60**: 772-782.
- * Orita M, Suzuki Y, Sekiya T y Hayashi K (1989) "Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction" *Genomics* **5**: 874-879.
 - * Ott U, Odermatt E, Engel J, Furthmayr H, Timpl R (1982) "Protease resistance and conformation of laminin" *Eur J Biochem* **123**: 63-72.
 - * Paget S (1889) "The distribution of secondary growths in cancer of the breast" *Lancet* **1**:571-573.
 - * Panayotou G, End P, Aumailley M, Timpl R y Engel J (1989) "Domains of laminin with growth factor activity" *Cell* **56**: 93-101.
 - * Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Leu TH, Richardson A y Otey C (1994) "Focal adhesion kinase: structure and signalling" *J Cell Sci* **18(supl)**:109-113.
 - * Passaniti A, Isaacs JT, Haney JA, Adler SW, Cujdik TK, Long PV y Kleinman HK (1992) "Stimulation of human prostatic-carcinoma tumor growth in athymic mice and control of migration in culture by extracellular matrix" *Int J Cancer* **51**:318-324.
 - * Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, y Engel J (1987) *Eur J Biochem* **166**: 11-19.
 - * Paulsson M (1992) "Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions" *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**:93-127.
 - * Paulsson M (1993) "Laminin and collagen IV variants and heterogeneity in basement membrane composition" *Molecular and cellular aspects of basement membranes* Ed by Rohrbach DH y Timpl R. Academic Press, San Diego, CA. pp.177-187.
 - * Pendas AM, Santamaría I, Alvarez MV, Pritchard M y López-Otín C (1996) "Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11p22.3." *Genomics* **32**: 266-268.
 - * Perroti D, Cimino K, Falcioni R, Tibursi G, Gentileschi MP y Sacchi A (1990) "Metastatic phenotype: Growth factor dependence and integrin expression" *Anticancer Res* **10**:587-598.
 - * Perucho M (1996) "Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator" *Nat Med* **2**: 630-631.
 - * Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes HG y Timpl R (1993) "Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI" *Exp Cell Res* **206**:167-176.
 - * Pfaff M, Göhring W, Brown JC y Timpl R (1994) "Binding of purified collagen receptors ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments" *Eur J Biochem* **225**:975-984.
 - * Pierschbacher MD y Ruoslahti E (1984a) "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule" *Nature* **309**:30-33.
 - * Pierschbacher MD y Ruoslahti E (1984b) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:5985-5988.
 - * Pinto RM, Canales J, Faraldo A, Sillero A y Güther MA (1987) "Cytosol 5'-nucleotidase from *Artemia* embryos. Purification and properties" *Biochem Physiol* **86**: 49-53.
 - * Polanowska-Grabowska R, Geanacopoulos M y Gear ARL (1993) "Platelet adhesion to collagen via de $\alpha_2\beta_1$ integrin under arterial flow conditions causes rapid tyrosine phosphorylation of pp125^{FAK}" *Biochem J* **296**:543-547.
 - * Porter BE, Weis J y Sanes JR (1995) "A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin" *Neuron* **14**: 549-559.
 - * Pöschl E, Fox JW, Block D, Mayer U y Timpl R (1994) "Two non-contiguous regions contribute to nidogen binding to a single EGF-like motif of the laminin $\gamma 1$ chain" *EMBO J* **13**:3741-3747.
 - * Postlethwaite AE y Kang AH (1992) "Fibroblasts and matrix proteins". In Gallin JI, Goldstein IM, and Snyderman R, ed. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York, Raven Press, pp 747-773.
 - * Potter JD, Slattery ML, Bostick RM y Gapstur SM (1993) "Colon cancer: a review of the epidemiology" *Epidemiol Rev* **15**:499-545.
 - * Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Wright PA, Jeffrey RE, Longcroft JM, Rogers L y Stamp GWH (1992) "Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia" *Amer J Pathol* **141**: 389-396.
 - * Poulson R, Hanby AM, Pignatelli M, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GWH (1993)

- "Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin" *J Clin Pathol* **46**:429-436.
- * Powell WC, Knox JD, Navre M, Grogan TM, Kittelson J, Nagle RB y Bowden GT (1993) "Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice" *Cancer Res* **53**:417-422.
 - * Prado IB, Laudanna AA y Carneiro CRW (1995) "Susceptibility of colorectal-carcinoma cells to natural killer mediated lysis: relationship to CEA expression and degree of differentiation" *Int J Cancer* **61**: 854-860.
 - * Pyke C, Ralfkilaer E, Huhtala P, Hurskainen T y Tryggvason K (1992) "Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by *in situ* hybridization" *Cancer Res* **52**:1336-1341.
 - * Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K y Dano K (1993) "Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer" *Amer J Pathol* **142**: 359-365.
 - * Rabinovitz I, Nagle RB y Cress AE (1995) "Integrin α_6 expression in human prostate carcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype *in vitro* and *in vivo*" *Clin Exp Metastasis* **13**:481-491.
 - * Radinsky R (1993) "Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis" *Cancer Metastasis Rev* **12**:345-361.
 - * Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D y Kerbel RS (1995) "Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis" *Cancer Met Rev* **14**:263-277.
 - * Ramos DM, Berston ED y Kramer RH (1990) "Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells" *Cancer Res* **50**:728-734.
 - * Rao NC, Castronovo V, Schmitt MCH, Wewer UM, Claysmith AP, Liotta LA y Sobel ME (1989) "Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor" *Biochemistry* **28**:7476-7486.
 - * Ray JM y Stetler-Stevenson WG (1995) "Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading" *EMBO J* **14**: 908-917.
 - * Raz A, Collard JG y Inbar M (1978) "Decrease in 5'-nucleotidase activity in malignant transformed and normal stimulated cells" *Cancer Res* **38**: 1258-1262.
 - * Regen CM y Horwitz AF (1992) "Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblast" *J Cell Biol* **119**: 1347-1359.
 - * Reiss O, Noerremoelle A, Soerensen SA y Epplen JT (1993) "Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)_n repeats causing Huntington's disease" *Hum Mol Genet* **2**: 637-640.
 - * Richardson A y Parsons JT (1995) "Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase?" *Bioessays* **17**:229-236.
 - * Ries C y Petrides PE (1995) "Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease" *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**:345-355.
 - * Riikonen T, Westermarck J, Koivisto K, Broberg A, Kähäri V-M y Heino J (1995) " $\alpha_2\beta_1$ integrin is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen $\alpha 1(I)$ gene expression" *J Biol Chem* **270**:13548-13552.
 - * Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT y Boyd J (1993) "Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma" *Cancer Res* **53**:5100-5103.
 - * Rochlitz CF, Hermann R y Dekant E (1996) "Overexpression and amplification of *c-myc* during progression of human colorectal cancer" *Oncology* **53**: 448-454.
 - * Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Giudice KC y Gorstein F (1993) "Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle" *Am J Obstet Gynecol* **168**: 253-260.
 - * Roedel D y Krieg T (1994) "Three-dimensional contact with type I collagen mediates tyrosine phosphorylation in primary human fibroblasts" *Exp Cell Res* **211**:42-48.
 - * Roskelley CD y Bissell MJ (1995) "Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function"

- Biochem Cell Biol* 73:391-397.
- * Rubin K, Gullberg D, Tomasini-Johansson B, Reed RK, Rydén C y Borg TK (1996) "Molecular recognition of the extracellular matrix by cell surface receptors" *Extracellular Matrix* pp 262-309. Ed WD Comper. Harwood Academic Publishers.
 - * Rubinfeld B, Souza B, Albert I *et al* (1993) "Association of the APC gene product with β -catenin" *Science* 262:1731-1734.
 - * Ruiz P, Dunon D, Sonnenberg A y Imhof BA (1993) "Suppression of mouse melanoma metastasis by ea-1, a monoclonal-antibody specific for α (6)-integrins" *Cell Adhes Commun* 1:67-81.
 - * Runyan RB, Versalovic J y Shur BD (1988) "Functionally distinct laminin receptors mediate cell adhesion and spreading: the requirement for surface galactosyltransferase in cell spreading" *J Cell Biol* 107:1863-1871.
 - * Ruoslahti E y Pierschbacher MD (1987) "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins" *Science* (Wash. DC) 238: 491-497.
 - * Ruoslahti E (1988) "Fibronectin and its receptors" *Annu Rev Biochem* 57:375-391 o 413.
 - * Ruoslahti E y Giancotti FG (1989) "Integrins and tumor cell dissemination" *Cancer Cells* 4 6 1?:119-126.
 - * Ruoslahti E (1990) "Cell to cell interaction" Burger MM, Sordat B y Zinkernagel RM (eds) Basel. Karger. pp 88-98.
 - * Ruoslahti E y Yamaguchi Y (1991) "Proteoglycans as modulators of growth factor activities" *Cell* 64: 867-869.
 - * Ruoslahti E y Reed JC (1994) "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis" *Cell* 77:477-478.
 - * Ruoslahti E (1994-95) "Fibronectin and its $\alpha_5\beta_1$ integrin receptor in malignancy" *Invasion Metastasis* 14:87-97.
 - * Ruoslahti E (1996) "RGD and other recognition sequences for integrins" *Ann Rev Cell Devel Biol* 12:697-715.
 - * Saiki I, Yoneda J, Kobayashi H, Igarashi Y, Komazawa H, Ishizaki Y, Kato I y Azuma I (1993) "Antimetastatic effect by anti-adhesion therapy with cell-adhesive peptide of fibronectin in combination with anticancer drugs" *Jpn J Cancer Res* 84:326-335.
 - * Sakamoto N, Iwahana M, Tanaka NG y Osada Y (1991) "Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide CDPGYIGSR-NH₂" *Cancer Res* 51:903-906.
 - * Sandkuijl LA y Bishop T (1993) "Results of the joint analysis of the EUROFAP linkage data: summary". In Mohr J, ed. *Genetics and Clinics of HNPCC: Proceedings of the Fourth Workshop*. Copenhagen, EUROFAP 26-27.
 - * Sanes JR (1989) "Extracellular matrix molecules that influence neural development" *Annu Rev Neurosci* 12:491-516.
 - * Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, y Hunter DD (1990) "Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere" *J Cell Biol* 111: 1685-1699.
 - * Sang QA y Douglas DA (1996) "Computational sequence analysis of metalloproteinases" *J Protein Chem* 15:137-160.
 - * Sanger F, Nicklen S y Coulson AR (1977) "DNA sequencing with chain-termination inhibitors" *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5466.
 - * Santoro SA, Walsh JJ, Staats WD y Baranski KJ (1991) "Distinct determinants on collagen support α 2 β 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation" *Cell Regul* 2: 905-913.
 - * Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R y Yamada Y (1988) "Laminin, a multidomain protein: the A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains" *J Biol Chem* 263: 16536-16544.
 - * Sastry SK y Horwitz AF (1993) "Integrin cytoplasmic domains: Mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling" *Curr Opin Cell Biol* 5:819-831.
 - * Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E y Seiki M (1994) "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells" *Nature* 370: 61-65.
 - * Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler-Stevenson WG y Siki M (1996) "Cell surface

- binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase" (MT1-MMP)" *FEBS Lett* **385**: 238-240.
- * Saunders S y Bernfield M (1988) "Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix" *J Cell Biol* **106**:423-430.
 - * Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB y Parsons JT (1992) "pp125^{FAK}, a structurally unique protein tyrosine kinase associated with focal adhesions" *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:4525-4529.
 - * Schaller MD y Parsons JT (1993) "Focal adhesion kinase; an integrin-linked protein tyrosine kinase" *Trend Cell Biol* **3**:258-262.
 - * Schaller MD, Borgman CA y Parsons JT (1993) "" *Mol Cell Biol* **13**:785-791.
 - * Schaller MD y Parsons JT (1994) "Focal adhesion kinase and associated proteins" *Curr Opin Cell Biol* **6**:705-710.
 - * Schaller MD, Otey CA, Jeffrey DH y Parsons T (1995) "Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains" *J Cell Biol* **130**:1181-1187.
 - * Schiller JH y Bittner G (1995) "Loss of the tumorigenic phenotype with *in vitro*, but not *in vivo*, passaging of a novel series of human bronchial epithelial cell lines: possible role of an α_5/β_1 -integrin-fibronectin interaction" *Cancer Res* **55**:6215-6221.
 - * Schittny JC y Schittny CM (1994) "Role of the B1 short arm in laminin self-assembly" *Eur J Biochem* **216**:437-441.
 - * Schwartz MA (1993) "Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium" *J Cell Biol* **120**:1003-1010.
 - * Schwartz MA, Brown EJ y Fazeli B (1993) "A 50 kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells" *J Biol Chem* **268**:19931-19934.
 - * Schwartz MA (1994) "Integrins as signal transducing receptors" In Takada Y (ed): "Integrins". Boca Raton, FL: CRC Press, pp 133-145.
 - * Schwartz MA e Ingber DE (1994) "Integrating with integrins" *Mol Biol Cell* **5**:389-393.
 - * Schwarzbauer JE (1991) "Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix" *J Cell Biol* **113**:1463-1473.
 - * Schreiner C, Bauer J, Margolis M y Juliano RL (1991) "Expression and role of integrins in adhesion of human colonic carcinoma cells to extracellular matrix components" *Clin Exp Metastasis* **9**:163-178.
 - * Schroy P, Rustgi AK, Ikonou E, Liu XP, Polito J, Andry C y O'Keanne JC (1994) "Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT-29 colon cancer cells" *J Cell Physiol* **161**:111-123.
 - * Scott JE (1992) "Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues" *FASEB J* **6**:2639-2645.
 - * Scott HS, Nelson PV, MacDonald ME, Gusella JF, Hopwood JJ y Morris CP (1992) "An 86-bp VNTR within IDUA is the basis of the D4S111 polymorphic locus" *Genomics* **14**: 1118-1120
 - * Seabright M (1971) "A rapid banding technique for human chromosomes" *Lancet* **ii**: 971-972.
 - * Sedlark BC (1994) "Hemopoietic cell differentiation antigens" *Neoplasia* **41**: 193-196.
 - * Sephel GC, Tashiro K-I, Sasaki M, Greatorex D, Martin GR, Yamada Y y Kleinman HK (1989b) *Biochem Biophys Res Commun* **162**: n°2 , 821-829.
 - * Shaw LM, Messier JM y Mercurio AM (1990) "The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the alpha 6 beta 1 integrin" *J Cell Biol* **110**:2167-2174.
 - * Shaw KM, Chao C, Wewer UM y Mercurio AM (1996) "Function of the integrin $\alpha_6\beta_1$ in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor" *Cancer Res* **56**:959-963.
 - * Sheppard D (1996) "Epithelial integrins" *BioEssays* **18**:655-660.
 - * Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S y Perucho M (1994) "Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation" *Nature Genetics* **6**:273-281.
 - * Sires Ui, Griffin GI, Broekelmann TJ *et al* (1993) "Degradation of entactin by matrix metalloproteinases.

- Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites" *J Biol Chem* **268**(3): 2069-2074.
- * Skorstengaard K, Jensen MS, Sahl P, Petersen TE y Magnusson S (1986) "Complete primary structure of bovine plasma fibronectin " *Eur J Biochem* **161**:441-453.
 - * Sobel ME (1993) "Differential expression of the 67 kDa laminin receptor in cancer" *Semin Cancer Biol* **4**:311-317.
 - * Sonnenberg A, Daams H, van der Valk MA, Hilkens J y Hilgers J (1986) "Development of mouse mammary gland: identification of stages in differentiation of luminal and myoepithelial cells using monoclonal antibodies and polyvalent aniserum against keratin" *J Histochem Cytochem* **34**:1037-1046.
 - * Sonnenberg A, Janssen H, Hogervorst F, Calafat J y Hilgers J (1987) "A complex of platelet glycoproteins Ic and IIa identified by a rat monoclonal antibody" *J Biol Chem* **262**:10376-10383.
 - * Sonnenberg A, Hogervorst F, Osterop A y Veltman FEM (1988a) "Identification and characterization of a novel complex on mouse mammary tumor cells using a monoclonal antibody against platelet glycoprotein Ic" *J Biol Chem* **263**:14030-14038.
 - * Sonnenberg A, Modderman PW y Hogervorst F (1988b) "Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6" *Nature (Lond)* **336**: 487-489.
 - * Sonnenberg A, Linders CJT, Modderman PW, Damsky CH, Aumailley M y Timpl R (1990a) "Integrin recognition of different cell-binding fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that $\alpha_6\beta_1$ but not $\alpha_6\beta_4$ functions as a major receptor for fragment E8" *J Cell Biol* **110**:2145-2155.
 - * Sonnenberg A, Linders CJ, Daams JH y Kennel SJ (1990b) "The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties" *J Cell Sci* **96**:207-217.
 - * Sonnenberg A, Gehlsen KR, Aumailley M y Timpl R (1991) "Isolation of $\alpha_6\beta_1$ integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment" *Exp Cell Res* **197**:234-244.
 - * Soussi T, Caron de Fromental C y May P. (1990) "Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution" *Oncogene* **5**:945-952.
 - * Spirio L y otros 18 (1993) "Alleles of the APC gene:an attenuated form of familial polyposis" *Cell* **75**:951-957.
 - * Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H *et al* (1990) "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:364-368.
 - * Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S y Pozzatti RO (1992) "Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential" *Cancer Res* **52**:4942-4947.
 - * Staatz WD, Fok KF, Zutter MM, Adams SP, Rodriguez BA y Santoro SA (1991) "Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the $\alpha_2\beta_1$ integrin in collagen" *J Biol Chem* **266**:7363-7367.
 - * Stallmarch A, von Lampe B, Matthes H, Bornhoft G y Riecken EO (1992) "Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumor transformation" *Gut* **33**:342-346.
 - * Stallmach A, von Lampe B, Orzechowski HD, Matthes H y Riecken EO (1994) "Increased fibronectin-receptor expression in colon carcinoma-derivd HT29 cells decreases tumorigenicity in nude mice" *Gastroenterology* **106**:19-27.
 - * Staquet MJ, Levarlet B, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D y Thivolet J (1990) "Identification of specific human epithelial cell integrin receptors as VLA proteins" *Exp Cell Res* **187**:277-283.
 - * Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Wacher MP, Margulier IMK y Liotta LA (1989) "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family" *J Biol Chem* **264**:1353-1356.
 - * Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT y Liotta LA (1990) "Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues" *J Biol Chem* **265**: 13933-13938.
 - * Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S y Liotta LA (1993) "Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis" *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541-573.
 - * Stetler-Stevenson WG (1996) "Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the

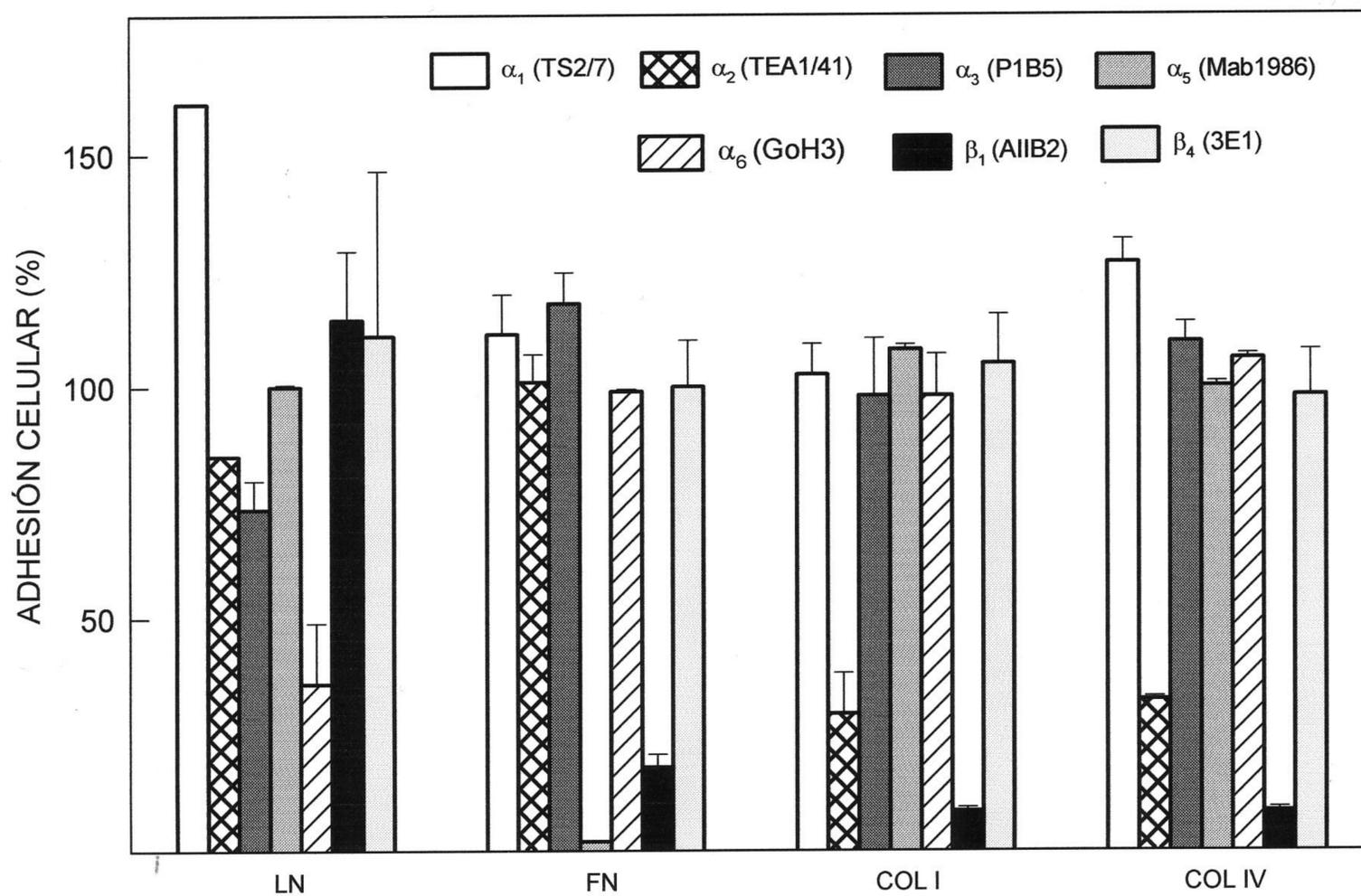
- extracellular matrix" *Am J Pathol* **148**:1345-1350.
- * Stromblad S y Cheresch DA (1996) "Cell adhesion and angiogenesis" *Trends Cell Biol* **6**:462-468.
 - * Strongin ZY, Marmer BI, Grant GA y Golberg GI (1993) "Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2" *J Biol Chem* **268**: 14033-14039.
 - * Sun AS, Holland JF, Ohnuma T y Slankard-Chahinian M (1982) "5'-nucleotidase activity in permanent human lymphoid cell lines: implication for cell proliferation and aging *in vitro*" *Biochem Biophys Acta* **714**: 530-535.
 - * Sung U, O'Rear JJ y Yurchenco PD (1993) *J Cell Biol* **123**:1255-1268.
 - * Sweeney TM, Kibbey MC, Zain M, Fridman R y Kleinman HK (1991) "Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastasis" *Cancer Met Rev* **10**:245-254.
 - * Takada Y y Puzon W (1993) "Identification of a regulatory region of integrin β_1 subunit using activating and inhibiting antibodies" *J Biol Chem* **268**:17597-17601.
 - * Taipale J y Keski-Oja J (1997) "Growth factors in the extracellular matrix" *FASEB J* **11**: 51-59.
 - * Talaminti MS, Roh MS, Curley SA y Gallick GE (1993) "Increase in activity and level of human colorectal cancer" *J Clin Invest* **91**:53-60.
 - * Tamura RN, Rozzo C, Starr L, Chambers J, Reichardt LF, Cooper HM y Quaranta V (1990) "Epithelial integrin $\alpha_6\beta_4$: complete primary structure of α_6 and variants forms of β_4 " *J Cell Biol* **111**:1593-1604.
 - * Tang DG y Honn KV (1994-95) "Adhesion molecules and tumor metastasis: an update" *Invasion Metastasis* **14**:109-122.
 - * Taraboletti G, Belotti D, Giavazzi R, Sobel ME y Castronovo V (1993) "Enhancement of metastatic potential of murine and human melanoma cells by laminin receptor peptide G: Attachment of cancer cells to subendothelial matrix as a pathway for hematogenous metastasis" *J Nat Cancer Inst* **85**:235-240.
 - * Tashiro KI, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK y Yamada Y (1989) "A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A-chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth" *J Biol Chem* **264**:16174-16182.
 - * Tashiro K, Sephel GC, Greatorex D, Sasaki M, Shirasni N, Martin GR, Kleinman HK y Yamada Y (1991) "The RGD containing site of the mouse laminin A chain is active for cell attachment, spreading, migration and neurite outgrowth" *J Cell Physiol* **146**:451-459.
 - * Taylor SA, Barnes GT, MacDonald ME y Gusella JF (1992) "A dinucleotide repeat polymorphism at the D4S127 locus" *Hum Mol Genet* **1**: 142-145.
 - * Terpe HJ, Stark H, Ruiz P e Imhof BA (1994) "Alpha-6 integrin distribution in human embryonic and adult tissues" *Histochemistry* **101**:41-49.
 - * Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM y Liotta LA (1983) "Laminin receptor on human breast carcinoma cells" *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 444-448.
 - * Terranova VP, Williams JE, Liotta LA y Martin GR (1984) "Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin" *Science* **226**:982-985.
 - * Terranova VP, Aumailley M, Sultan LH, Martin GR y Kleinman HK (1986) "Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin" *J Cell Physiol* **127**: 473-479.
 - * Thibodeau SN, Bren G y Schaid D (1993) "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon" *Science* **260**:816-819.
 - * Timpl R, Glanville RW, Nowack H, Heidemann H, Fietzek PP y Kühn K (1975) "Isolation, chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen and procollagen from fetal bovine skin" *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **356**: 1783-1792.
 - * Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM y Martin GR (1979) "Laminin-A glycoprotein from basement membranes" *J Biol Chem* **254**: 9933-9937.
 - * Timpl R, Engel J y Martin GR (1983) "Characterization of protease-resistant fragments of laminin mediating attachment and spreading of rat hepatocytes" *TIBS* **8**: 207-209.
 - * Timpl R, Fujiwara S, Dziadek M, Aumailley M, Weber M, Weber S y Engel J (1984) "Laminin, proteoglycan, nidogen, and collagen IV: structural models and molecular interactions" In *Basement Membranes and Movement*, R Porter y J Whelan, eds. London: Pitman,25.

- * Timpl R (1996) "Macromolecular organization of basement membranes" *Curr Opin Cell Biol* **8**: 618-624.
- * Tishler RB, Calderwood SK, Coleman CN y Price BD (1993) "Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents" *Cancer Res* **53**:2212-2216.
- * Tlsty RD (1990) "Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification" *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3132-3136.
- * Topley P, Jenkins DC, Jessup EA y Stables JN (1993) "Effect of reconstituted basement membrane components on the growth of a panel of human tumour cell lines in nude mice" *Br J Cancer* **67**:953-958.
- * Trikha M, De Clerck YA y Markland FS (1994) "Contortrostatin, a snake venom disintegrin inhibits β_1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis" *Cancer Res* **54**:4993-4998.
- * Tryggvason K, Hoyhtya M y Salo T (1987) "Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion" *Biochim Biophys Acta* **907**: 191-217.
- * Tryggvason K, Hoyhtya M y Pyke C (1993) "Type IV collagenases in invasive tumors" *Breast Cancer Res Treat* **24**: 209-218.
- * Turesky RJ, Lang N, Butler M *et al* (1991) "Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon" *Carcinogenesis* **12**:1417-1422.
- * Turnay J (1989) Tesis Doctoral. "Caracterización de tipos celulares de un adenocarcinoma de colon humano e influencia de los componentes de la matriz extracelular en la línea establecida BCS-TC2".
- * Turnay J, Olmo N, Risse G, von der Mark K y Lizarbe MA (1989) "5'-Nucleotidase activity in cultured cell lines. Effect of different assay conditions and correlation with cell proliferation" *In Vitro Cell Dev Biol* **25**:1055-1061.
- * Turnay J, Olmo N, Gavilanes JG, Benítez J y Lizarbe MA (1990) "Establishment and characterization of a new human colon adenocarcinoma cell line: BCS-TC2" *Cytotechnology* **3**: 75-88.
- * Turner DC, Flier LA y Carbonetto S (1989) *J Neurosci* **9**:3287-3296.
- * Turner CE, Schaller MD y Parsons JT (1993) *J Cell Science* **105**:637-???
- * Turner CE (1994) "Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosine kinases" *BioEssays* **16**:47-52.
- * Turowski GS, Rashid Z, Hong F, Madri JA y Basson MD (1994) "Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines" *Cancer Res* **54**:5974-5980.
- * Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN y Liotta LA (1986) "Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells" *J Biol Chem* **261**:1883-1889.
- * Underwood PA, Bennett FA, Kirkpatrick A, Bean PA y Moss BA (1995) "Evidence for the location of a binding sequence for the $\alpha_2\beta_1$ integrin of endothelial cells, in the β_1 subunit of laminin" *Biochem J* **309**:765-771.
- * Vanderberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K y Kühn K (1991) "Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the $\alpha_1\beta_1$ and the $\alpha_2\beta_1$ integrins" *J Cell Biol* **113**:1475-1483.
- * van der Rest M y Garrone R (1991) "Collagen family of proteins" *FASEB J* **5**:2814-2823.
- * van de Wiel-van Kemenade E, van Kooyk Y, de Boer AJ, Huijbens RJF, Wder P, van de Kastele W, Melief CJM y Figdor CG (1992) *J Cell Biol* **117**:461-470.
- * Varner JA, Fisher MH y Juliano RL (1992) "Ectopic expression of integrin alpha5/beta1 suppresses *in vitro* growth and tumorigenicity of human colon carcinoma cells" *Mol Biol Cell* **3**:232a.
- * Varner JA, Emerson DA y Juliano RL (1995) "Integrin $\alpha_5\beta_1$ expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin" *Mol Biol Cell* **6**:725-740.
- * Varner JA y Cheresch DA (1996) "Integrins and cancer" *Curr Opin Cell Biol* **8**:724-730.
- * Vink J, Thomas L, Etoh T, Bruijn JA, Mihm MC, Gattoni-Celli S y Byers HR (1993) "Role of beta-1 integrins in organ specific adhesion of melanoma cells *in vitro*" *Lab Invest* **68**:192-203.
- * Virshup DM, Kauffman MG y Kelly TJ (1989) "Activation of SV40 DNA replication *in vitro* by cellular protein phosphatase 2A" *EMBO J* **8**: 3891-3898.
- * v Lampe B, Stallmach A y Riecken EO (1993) "Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colorectal cancer cells and decreased adhesion to extracellular matrix" *Gut* **34**:829-836.

- * Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli T, Bashkin P, Bar-Shavit R y Fuks Z (1990) "Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: Possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis" *Cancer Metastasis Rev* **9**:203-226.
- * von der Mark K y Goodman S (1993) "Adhesive glycoproteins" *Connective tissue and its heritable disorders* Ed. Wiley-Liss Inc. pp.211-236.
- * Vukicevic S, Somogyi L, Martinovic I, Zic R, Kleinman HK y Marusic M (1992a) "Reconstituted basement membrane (Matrigel) promotes the survival and influences the growth of murine tumors" *Int J Cancer* **50**:791-795.
- * Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten F, Roberts A y Reddi AH (1992b) "Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components" *Exp Cell Res* **202**:1-8.
- * Vuori K y Ruoslahti E (1993) "Activation of protein kinase C precedes $\alpha_5\beta_1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin" *J Biol Chem* **268**:21459-21462.
- * Wagner HE, Toth CA, Steele gD, Thomas P (1992) "Metastatic potential of human colon-cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and CEA production" *Clin Exp Metast* **10**: 25-31.
- * Waldmann V y Rabes HM (1996) "What's new in *ras* genes? Physiological role of *ras* genes in signal transduction and significance of *ras* gene activation in tumorigenesis" *Pathol Res Pract* **192**:883-891.
- * Wang ZQ, Liang J, Schellander K, Wayner EF y Grigoriadis AE (1995) "*c-fos*-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with *c-jun* and the role of endogenous *c-fos*" *Cancer Res* **55**: 6244-6251.
- * Ward RV, Atkinson SJ, Slocombe PM, Docherty AJP, Reynolds JJ y Murphy G (1991) "Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the activation of 72-kDa progelatinase by fibroblast membranes" *Biochim Biophys Acta* **1079**: 242-246.
- * Watson P y Lynch HT (1993) "Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer" *Cancer* **71**:677-685.
- * Wayner EA y Carter WG (1987) "Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique α and common β subunits" *J Cell Biol* **105**:1873-1884.
- * Weber JL y May PE (1989) "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction" *Am J Hum Genet* **44**: 388-396.
- * Weber JL, Kwitek AE, May PE y Zoghbi HY (1991) "Dinucleotide repeat polymorphism at the D6S105 locus" *Nucleic Acid Res* **19**: 968-973.
- * Weiss (1992)
- * Weiss K (1994-95) "Cell adhesion molecules: A critical examination of their role in metastasis" *Invasion Metastasis* **14**:192-197.
- * Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G y Lathrop M (1992) "A second-generation linkage map of the human genome" *Nature* **359**: 794-801.
- * Wilson CL, Heppner KJ, Rudolph LA y Matrisian LM. "The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse" *Molecular Biology of the Cell* **6**: 851-869 (1995).
- * Witkowski CM, Rabinovitz I, Nagle RB, Affiniti KSD y Cress AE (1993) "Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines" *J Cancer Res Clin Oncol* **119**:637-644.
- * Witty JP, McDonnell S, Newell K, Cannon P, Navre M, Tressler T y Matrisian LM (1994) "Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity *in vivo*" *Cancer Res* **54**:4805-4812.
- * Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, Adida C, Loriot M, Bellocq JP, Chambon P y Basset P (1993) "Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression" *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1843-1847.
- * Woods A, Couchman JR, Johansson S y Höök M (1986) "Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments" *EMBO J* **5**:665-670.

- * Wright JH, McDonnell S, Portella G, Bowden GT, Balmain A y Matrisian KM (1994) "A switch from stromal to tumor cell expression of stromelysin-1 mRNA is associated with the conversion of squamous to spindle carcinomas during mouse skin tumor progression" *Mol Carcinog* **10**:207-215.
- * Wu C, Friedmann R y Chung AE (1988) "Analysis of the assembly of laminin and the laminin-entactin complex with laminin chains specific monoclonal and polyclonal antibodies" *Biochemistry* **27**:8780-8786.
- * Wu C, Chung AE y McDonald JA (1995) "A novel role for alpha3 beta1 integrins in extracellular matrix assembly" *J Cell Sci* **108**: 2511-2523.
- * Yamada KM y Kennedy DW (1984) "Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function" *J Cell Biol* **99**:29-36.
- * Yamada K (1989) "Fibronectin domains and receptors" *Fibronectin* (Mosher DF,ed), pp 47-121. Academic Press, San Diego.
- * Yamada KM y Miyamoto S (1995) "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control" *Curr Opin Cell Biol* **7**: 681-689.
- * Yamaguchi Y, Mann DM y Ruoslahti E (1990) "Negative regulation of transforming growth factor- α by the proteoglycan decorin" *Nature* **346**: 281-284.
- * Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Senota A, Yoshimoto M, Nakamura H, Imai K y Yachi A (1994a) "Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin" *Biochem Biophys Res Commun* **210**:657-664.
- * Yamamoto K y Yamamoto M (1994b) "Cell adhesion receptors for native and denatured type I collagens and fibronectin in rabbit arterial smooth muscle cells in culture" *Exp Cell Res* **214**: 258-263.
- * Yamamoto M, Yamato M, Aoyagi M y Yamamoto K (1995) "Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells" *Exp Cell Res* **219**:249-256.
- * Yamamoto H, Irie A, Fukushima Y, Ohnishi T, Arita N, Hayakawa T y Sekiguchi K (1996a) "Abrogation of lung metastasis of human fibrosarcoma cells by ribozyme-mediated suppression of integrin α_6 subunit expression" *Int J Cancer* **65**:519-524.
- * Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL y Rao JS (1996b) "Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*" *Cancer Res.* **56**: 384-392.
- * Yamamura, Kibbey MC y Kleinman HK (1993) "Melanoma cells selected for adhesion to laminin peptides have different malignant properties" *Cancer Res* **53**:423-428.
- * Yao PM, Buhler JM, d'Ortho MP, Lebagry F, Delclaux C, Harf A y Lafuma C (1996) "Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants" *J Biol Chem* **271**: 15580-15589.
- * Yashiro M, Chung YS, Nishimura S, Inoue R y Sowa M (1995) "Establishment of two new scirrhous gastric cancer cell lines: analysis of factors associated with disseminated metastasis" *Brit J Cancer* **72**:1200-1210.
- * Yasoshima T, Denno R, Kawaguchi S, Sato N, Okada Y, Ura H, Kikuchi K y Hirata K (1996) "Establishment and characterization of human gastric carcinoma lines with high metastatic potential in the liver: changes in integrin expression associated with the ability to metastasize in the liver of nude mice" *Jpn J Cancer Res* **87**:153-160.
- * Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P y Ornitz DM (1991) "Cell surface heparan like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor" *Cell* **64**: 841-848.
- * Yoshitaka T, Matsubara N, Ikeda M, Tanino M, Hanafisa H, Tanaka N y Shimizu K (1996) "Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability" *Biochem Biophys Res Commun* **227**:553-557.
- * Young TN, Pizzo SV y Stack MS (1995) "A plasma membrane-associated component of ovarian adenocarcinoma cells enhances the catalytic efficiency of matrix metalloproteinase-2" *J Biol Chem* **270**:999-1002.
- * Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, Ohmori K y Tsuji H (1995) "Tumor cell attachment to laminin

- promotes degradation of the extracellular matrix and cell migration in high-metastatic clone cells of RCT sarcoma *in vitro*" *Jpn J Cancer Res* **86**: 685-690.
- * Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, Ohmori K, Yasuda T y Tsuji H (1996) "Characteristics of high and low laminin-adherent Dunn osteosarcoma cells selected by adhesiveness to laminin. Correlation between invasiveness through the extracellular matrix and pulmonary metastatic potential" *Tumor Biol* **17**:332-340.
 - * Yurchenco PD, Cheng YS y Colognato H (1992) "Laminin forms and independent network in basement membranes" *J Cell Biol* **117**:1119-1133.
 - * Yurchenco PD y Cheng YS (1993) "Self-assembly and calcium-binding sites in laminin: a three-arm interaction model" *J Biol Chem* **268**:17286-17299.
 - * Yurchenco PD y O'Rear JJ (1994) "Basal lamina assembly" *Curr Opin Cell Biol* **6**:674-681.
 - * Zhong S, Wyllie AH, Barner F, Wolf CR y Spurr NK (1993) "Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer" *Carcinogenesis* **14**:1821-1824.
 - * Zhu D, Cheng CF y Pauli BU (1991) "Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung specific endothelial adhesion molecule" *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9568-9572.
 - * Zutter MM, Mazoujian G y Santoro SA (1990) "Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast" *Am J Pathol* **137**:863-870.
 - * Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD y Tsung YL (1995) "Re-expression of the $\alpha_2\beta_1$ integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells" *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:7411-7415.



FE DE ERRATAS:

La figura 24 que aparece en la página 100 de la tesis doctoral "Influencia de componentes de la matriz extracelular en el comportamiento de las células BCS-TC2 de adenocarcinoma de colon humano. Estudios *in vitro* e *in vivo*", debe sustituirse por la figura adjunta.