



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Rol de los mastocitos en la tumorigenicidad
de una línea de adenocarcinoma de pulmón
murino**

Nº 145

Elizabeth K. Malament

Tutora: Lilia Lauria de Cidre

Departamento de Investigaciones
Junio 2007

A mi querida madre, en gratitud a su amor infinito y a su lucha denodada por vivir.
Vives y vivirás por siempre en mi corazón!.

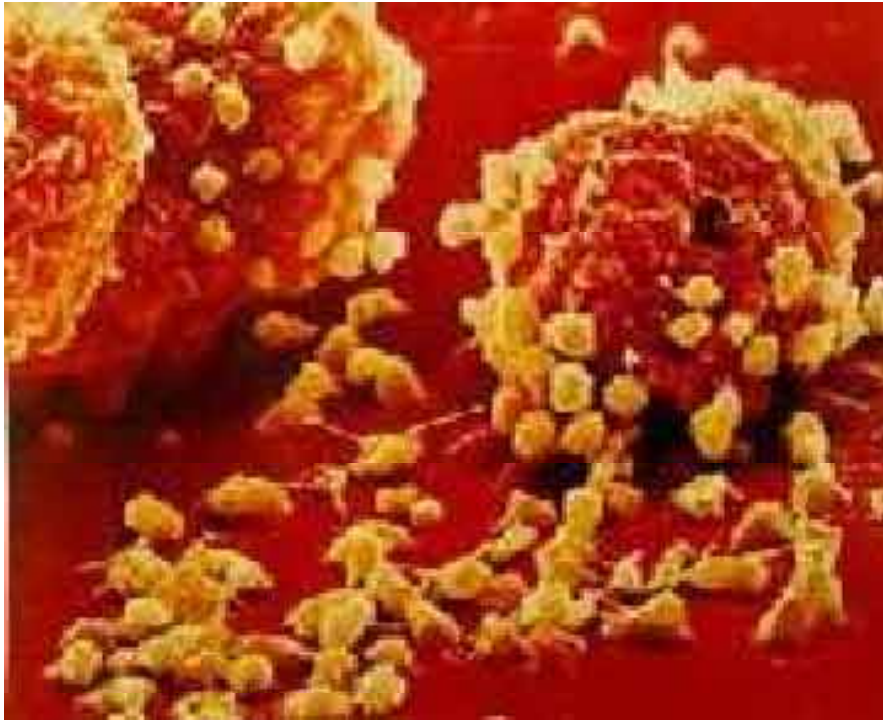


Figura: Mastocitos en proceso de desgranulación observados por microscopía electrónica de barrido.

Indice

AGRADECIMIENTOS	9
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	
1. El cáncer como enfermedad genética	10
2. Clasificación y nomenclatura.....	12
3. Cáncer de pulmón	12
3.1. Etiología del cáncer de pulmón	12
3.2. Clasificación de los carcinomas broncogénicos.....	14
3.3. Epidemiología del cáncer de pulmón	17
4. Invasión tumoral	
4.1. Proceso metastático.....	19
4.2. Angiogénesis.....	21
4.2.1. Factores angiogénicos y antiangiogénicos.....	22
4.2.2. Rol de los mastocitos y la heparina en la angiogénesis	23
4.3. Matriz extracelular	25
4.4. Alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión en procesos tumorales	27
4.4.1. Cadherinas.....	27
4.4.2. Integrinas	28
4.4.3. Superfamilia de Inmunoglobulinas	29
4.4.4. Selectinas	30
4.5. Citoesqueleto de actina.....	31
4.6. Proteasas	
4.6.1. Importancia en la invasión tumoral y clasificación	31
4.6.2. La familia de las metaloproteinasas de matriz (MMPs)	34
4.6.2.1. Regulación y activación de las MMPs.....	38
4.6.2.2. Sustratos de las MMPs.....	38
4.6.2.3. Sistema de inhibición de las MMPs.....	38
5. Los mastocitos (MC)	
5.1. Introducción.....	39
5.2. Origen, maduración y localización de los MC... ..	39
5.3. El rol de SCF y su receptor c-kit en la biología de los MC	40
5.4. Morfología y heterogeneidad de los MC	41
5.5. Activación de los MC.....	44
5.7. Rol de los MC en la progresión tumoral.....	46
OBJETIVO E HIPÓTESIS	47
1. Animales	47
2. Células tumorales.....	47
3. Suspensiones celulares	
a. Cultivo de la Línea LP07 y puesta a punto de las concentraciones.....	50
b. Obtención de mastocitos (MC).....	50
4. Obtención de medios condicionados	
a. Medio condicionado de mastocitos (McoMC).....	52
b. Medios condicionados de células tumorales (Mco de CT), Mco resultante del cocultivo de CT con MC, y Mco resultante del cultivo de CT en McoMC	52
c. Medio condicionado de pulmón (Mco de pulmón).....	52
5. Ensayo in vivo	
a. Evaluación de la capacidad de reclutamiento espontáneo de MC in vivo	52
6. Ensayos in vitro	
a. Ensayo de adhesión	53
b. Ensayos de migración e invasión.....	54
c. Ensayos para evidenciar la acción de los MC en la conformación del citoesqueleto de actina.....	59
d. Cuantificación de la actividad de metaloproteasas (MMPs).....	59

e. Cuantificación de la actividad del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA).....	59
f. Ensayo de proliferación celular modulada por MC.....	59
7. Análisis estadístico.....	60
RESULTADOS.....	60
1. Estudio in vivo.....	60
a. Capacidad espontánea de las CT LP07 en el reclutamiento de los MC.....	60
2. Estudios in vitro.....	64
a. Puesta a punto del cultivo de la línea LP07.....	64
b. Efecto del McoMC sobre la capacidad de adhesión de las CT.....	64
c. Efecto del McoMC sobre la capacidad migratoria e invasiva de las CT.....	66
d. Efecto del McoMC en la disposición del citoesqueleto de actina de las CT.....	68
e. Investigación de la producción/actividad de MMPs secretadas por CT y MC.....	70
f. Modulación de la actividad de MMPs ejercida por el Mco de cocultivos de CT y MC.....	72
g. Modulación de la actividad de MMPs ejercida por el Mco resultante del cultivo de CT en McoMC.....	73
h. Modulación de la actividad de uPA ejercida por el Mco de cocultivos de CT y MC.....	75
i. Modulación de la actividad de uPA ejercida por el Mco resultante del cultivo de CT en McoMC.....	76
j. Modulación ejercida por los MC en la proliferación de las CT in vitro.....	77
k. Modulación ejercida por el McoMC en la proliferación de las CT in vitro.....	78
DISCUSIÓN.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ABREVIATURAS.....	96

Agradecimientos

- En primer lugar, quiero agradecer especialmente a la Dra. Lilia Lauria por abrirme las puertas en la investigación científica, y permitirme cumplir con este gran sueño de investigar en cáncer. Gracias por su cariño, por sus consejos, y por toda la dedicación puesta en este trabajo. Gracias por su «don» de persona!
- A Marcela Gleiser, mi compañera de trabajo, pero por sobre todo mi gran amiga. Marce: gracias por ayudarme a que ésto fuera posible, pero más que nada gracias por todos los momentos compartidos!
- A Diego Bochoeyer, por toda su contribución, sus consejos, y ayuda incondicional. Gracias por guiarme para escribir la tesis!
- A mi querido amigo Edy, quien me enseñó a usar diferentes programas de computación para el diseño de gráficos, y a resolver los muchos inconvenientes que me fueron surgiendo con la computadora. Gracias por tu dedicación y paciencia!
- Agradezco al Instituto de Investigación Angel H Roffo, a todo el personal del Dto. de Investigaciones, y especialmente a su directora Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, por permitirme desarrollar este trabajo de licenciatura.
- Un reconocimiento muy especial a la Dra Lydia Puricelli, por el tiempo que dedicó en este trabajo, pero por sobre todas las cosas, por solidarizarse conmigo en un momento difícil de mi vida. Gracias Lydia, ya que en mis últimos años de carrera, la posibilidad que quedó abierta en un momento para trabajar aquí, fue mi fuerza motora para continuar.
- Agradezco al Dr. Lucas Colombo, por transmitirme tantos conocimientos y explicaciones, pero principalmente por esa motivación y esas ganas de investigar que me generaron cada una de sus palabras.
- A todas las «mentes brillantes» que trabajan en el Instituto, y que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme frente alguna duda ya sea experimental o teórica. Gracias a Martín Krasnapolski, Gabriela Magenta, Alejandro Adam, Alejandro Urtreger, Valeria Grossoni, y Laura Mauro.
- Agradezco a mis profesores de la Universidad de Belgrano, por todo lo que me transmitieron en conocimientos, pero fundamentalmente, a nivel humano. Un reconocimiento muy especial a la Dra. Silvia Gonzalez, Dra. Mónica Wachsmann, Dra. Claudia Degrossi, Dr. Ricardo Bolaños, Dra. Fabiana Lo Nostro, y Dra. Laura Lopez Greco.
- A mi amiga de cinco de años de carrera -Fernanda Vazquez-, por acompañarme en el camino del estudio, y por todo los momentos vividos. ¡Infinidad de recuerdos quedarán en nuestros corazones!
- A mi papá por acompañarme en cada momento de mi vida, por el difícil papel de padre y madre que desempeñó de la mejor manera, y por su apoyo incondicional...¡Gracias pá porque sin vos nunca habría llegado hasta aquí!
- A mi hermano -Carlos-, a mi cuñada -Sandra-, y a mi adorada sobrinita -Miriam-, por estar siempre junto a mí.
- A mi mamá, cuyo recuerdo, me da día a día la energía para seguir transitando por la vida. Gracias mami!

Resumen

La hiperplasia mastocitaria es un hecho observado en los estromas tumorales, pero no hay unanimidad de criterio respecto de su rol funcional debido a los resultados experimentales contradictorios. De acuerdo a algunos estudios científicos, la acumulación de mastocitos (MC) peritumorales constituiría una reacción inmunológica de defensa del hospedador frente al tumor, mientras que otros estudios señalan que su acumulación y desgranulación podría promover el crecimiento tumoral y la metástasis.

Los MC, unas de las principales células efectoras del sistema inmune, liberan un amplio espectro de mediadores químicos, de los cuales si bien muchos de ellos tienen un rol fundamental en desórdenes patológicos relacionados con reacciones alérgicas y procesos inflamatorios, otros son capaces de modular directa o indirectamente las distintas etapas de la progresión tumoral.

Actualmente, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por neoplasias malignas en todo el mundo, y los avances terapéuticos son magros.

Debido a que los tumores de pulmón son resistentes a las terapias convencionales, las líneas celulares constituyen una herramienta en la búsqueda de nuevas terapias.

Frente a estos antecedentes, en la presente tesis, decidimos evaluar el efecto de los MC en la invasividad de la línea tumoral LP07 derivada del adenocarcinoma de pulmón espontáneo P07.

El tumor P07 es un adenocarcinoma de pulmón murino que apareció espontáneamente en hembras BALB/c endocriadas en el Bioterio del Instituto de Oncología "A. H. Roffo".

La línea tumoral LP07 se obtuvo por sucesivas divisiones *in vitro* de los cultivos primarios del adenocarcinoma P07. Esta línea que induce síndromes paraneoplásicos (leucocitosis, hipercalcemia y caquexia) en ratones singeneicos, es de gran importancia para estudiar la biología del tumor de pulmón, así como también para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

En este trabajo de tesis, se investigó *in vivo* la capacidad espontánea de la línea LP07 para reclutar MC en función del tiempo de portación tumoral. Se observó que el tumor LP07, recluta MC peritumorales cuyo número disminuyó significativamente en el día 14 de portación coincidiendo este hecho con un aumento de los MC intratumorales al mismo día. Desde entonces, los MC peri e intratumorales mantuvieron su número constante hasta el final del experimento.

En los estudios *in vitro* realizados para observar la modulación que ejercen los MC y el medio condicionado de MC (McoMC) sobre la proliferación de las células tumorales (CT), se encontró que ambos son capaces de disminuir la proliferación celular a las 24 hs de cultivo.

Mediante diferentes ensayos biológicos *in vitro*, se determinó que los medios condicionados de MC aumentaron la adhesión, y disminuyeron la migración e invasión de las CT LP07. Congruentemente con estos hechos, el McoMC modificó la disposición del citoesqueleto de actina en éstas, induciendo un fenotipo sin fibras de stress correspondiente a células con poco movimiento.

Además, se determinó que las CT de esta línea producen varias metaloproteasas (MMPs) (116 KDa, 72 KDa, 66KDa, 54 KDa, 50 KDa, 43 KDa, y 39 KDa), y también activador de plasminógeno tipo uroquinasa -uPA-, los cuales tienen un rol esencial en el proceso invasivo. Por su parte, los mismos estudios realizados en MC, mostraron que éstos también son capaces de producir MMPs (116 KDa y 15 KDa), pero no se encontró actividad medible de uPA en ellos.

Por otro lado, se determinó que el Mco proveniente del cocultivo de CT y MC, y el Mco proveniente de CT cultivado en el McoMC, ejercen una tendencia inhibitoria en la producción/actividad de metaloproteasas.

Los ensayos realizados para observar la modulación que los MC y el McoMC ejercen sobre la producción/actividad de uPA mostraron un comportamiento diferencial: los MC en cocultivo con las CT potenciaron la actividad del uPA, mientras que el McoMC no produjo un aumento significativo.

El presente trabajo ha demostrado que tanto los MC como los McoMC tienen la capacidad de modular parámetros de la progresión tumoral en este modelo animal.

Introducción

El Cáncer

1. El cáncer como enfermedad genética

«La palabra cáncer se utiliza para describir un complejo y heterogéneo grupo de estados patológicos en el que las células proliferan desmesuradamente e invaden tejidos vecinos» (Rojo M. Izquierdo, 1995).

El cáncer es una enfermedad de carácter genético. Sin embargo, hay dos diferencias claves entre el cáncer y la mayoría de las otras enfermedades genéticas. En primer lugar, el cáncer es en mayor parte, causado por mutaciones somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas de mamíferos (excluyendo aquellas que involucran genes mitocondriales) son causadas por mutaciones en la línea germinal. En segundo lugar, el cáncer no surge de una única mutación sino de la acumulación de varias mutaciones (Vogelstein & Kinzler, 1993).

La transmisión de las alteraciones de unas células cancerosas a sus células progenie no implica que el desarrollo de un cáncer en un individuo sea heredable por su descendencia. De hecho, esto ocurre sólo en un muy pequeño porcentaje de casos, que depende del tipo de cáncer. Es decir, que el cáncer no puede considerarse como una enfermedad hereditaria.

Sólo cuando las mutaciones o cambios en los genes aparecen en las células de la línea germinal, éstas se transmiten a la descendencia. Ello ocurre, por ejemplo, en un 5-10% de los cánceres de mama, en los que como consecuencia de la transmisión de versiones alteradas de genes que han sido identificados como originarios de cánceres de seno (BRCA1 y BRCA2), múltiples mujeres de una familia padecen esta

enfermedad durante generaciones. Existen otros defectos genéticos hereditarios en los que se transmite una predisposición a desarrollar un tipo específico o bien múltiples tipos de cánceres. Un ejemplo de la primera situación es el Xeroderma Pigmentosum, en el que los individuos que padecen este síndrome tienen un riesgo muy elevado de padecer cánceres de piel como consecuencia de la mutación de genes encargados de reparar los daños causados por la luz ultravioleta en el DNA celular. Por el contrario, individuos con la enfermedad de Li-Fraumeni sufren con muy alta frecuencia cánceres de distintos tipos (sarcomas, mama, cerebrales, leucemias y otros) debido a la mutación de un gen (p53) que controla la proliferación celular actuando como un freno al crecimiento incontrolado (Ponder B.A., 2001).

El mayor descubrimiento en la biología del cáncer ha sido que la tumorigenicidad es un proceso de múltiples etapas asociado con la acumulación de alteraciones genéticas en las células somáticas (Caldas, 1998). En el caso de tumores hereditarios, el primer evento de carcinogénesis ocurre en las células germinales, el cual es seguido por mutaciones en las células somáticas (Heim S. and Mitelman F., 1987).

Este proceso de múltiples etapas ha sido comparado con la evolución darwiniana dentro del microcosmos de los tejidos vivos, en los cuales las unidades de selección son las células. Una célula que posea características ventajosas (características que favorecen la supervivencia y proliferación) es seleccionada para convertirse en progenitora de una población sucesora de células que eventualmente dominará la masa tumoral (Bernard & Weinberg, 2002).

Se estima que entre tres y siete mutaciones son requeridas para la conversión maligna de una célula normal (Weinberg, 1989).

Acorde con esta idea, los tumores crecen por un proceso de evolución clonal dirigido por mutación. La primera mutación podría resultar en una expansión limitada de la progenie de una única célula. Una de estas células podría luego adquirir una segunda mutación, permitiendo tal vez, el crecimiento de un pequeño tumor benigno. Una célula de este tumor benigno podría experimentar una tercera mutación, y formar un tumor avanzado compuesto por células progenitoras con tres mutaciones. Eventualmente, la célula acumulará un número suficiente de mutaciones para hacerse maligna, permitiendo invadir tejidos vecinos y metastatizar a otros órganos (Vogelstein & Kinzler, 1993).

Muchos tipos de cáncer son diagnosticados en la población con una incidencia dependiente de la edad (Renan, 1993). El hecho que la mayoría de los cánceres ocurra en personas de edad avanzada se explica por las décadas requeridas para acumular el número de mutaciones necesarias para causar malignidad (Vogelstein & Kinzler, 1993).

Los tumores son el resultado de una deficiencia en los mecanismos que controlan la proliferación y muerte celular. Las mutaciones que dirigen el desarrollo tumoral se originan en proto-oncogenes y genes supresores de tumores (Pegg, 1999).

Varios procesos dirigen la activación oncogénica o la inactivación de genes supresores de tumores. Todos resultan en un cambio de la secuencia original del ADN. Lengauer y col. (1998) agrupan las alteraciones mutacionales que afectan los genes que controlan el crecimiento celular en cuatro categorías, proporcionando así las bases genéticas del cáncer humano:

1. Cambios en la secuencia del ADN
2. Alteraciones en el número de cromosomas
3. Translocaciones cromosómicas
4. Amplificaciones génicas

Además de estas aberraciones, hay crecientes evidencias de que la metilación del ADN puede ser un método alternativo en la inactivación génica (Versteeg, 1997). Estos procesos epigenéticos involucran la adición de grupos metilo a citosinas presentes en islas CpG (agrupaciones de citosinas y guaninas que preceden los genes) dentro de regiones promotoras de un gen. La metilación dentro del promotor está asociada fuertemente con el silenciamiento de la expresión génica (Jones & Laird, 1999). Los patrones aberrantes de metilación inactivan estos genes reprimiendo la transcripción y promoviendo así la tumorigénesis (Baylin & Herman, 2000).

Todas estas alteraciones genéticas dan lugar a un vasto genotipo de células cancerosas que manifiestan seis esenciales alteraciones en la fisiología celular y que colectivamente dictan un crecimiento maligno (Hanahan & Wainberg, 2000):

1. Autosuficiencia de señales de crecimiento
2. Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento
3. Evasión a la muerte celular programada (apoptosis)
4. Ilimitado potencial replicativo
5. Angiogénesis sostenida
6. Invasión y metástasis.

2. Clasificación y nomenclatura:

La proliferación descontrolada de un grupo de células dentro de un tejido, origina un *tumor o neoplasma*, una masa celular diferenciable del resto (Rojo M. Izquierdo, 1995).

A nivel biológico y clínico, la clasificación más importante de los tumores se encuentra entre tumores benignos y malignos, de los cuales, sólo éstos últimos son considerados como propiamente cancerosos (Rojo M. Izquierdo, 1995).

Un tumor benigno es un crecimiento localizado. Este crecimiento puede producir compresión de tejidos normales adyacentes. Los tumores benignos son encapsulados, y por lo general, crecen más lentamente y no constituyen una amenaza para la vida, a menos que interfieran con el funcionamiento normal de un órgano –bloqueándolo-, como en el caso del intestino, o comprimiendo áreas vitales, como en el cerebro (Mastorides S, Maronpot R., 2002).

Los tumores malignos crecen rápidamente, y se caracterizan por su invasividad (Mastorides S, Maronpot R., 2002). Suelen tener distintos grados de anaplasia, es decir, son menos diferenciados que el tejido normal equivalente (Ruddon, 1995). El aumento del tamaño del núcleo celular (incremento de la relación núcleo/citoplasma), la variación del tamaño y de la forma celular, y la presencia de alto número de mitosis, algunas aberrantes, son características de una neoplasia maligna (Franks, 1997). El crecimiento maligno es desorganizado y puede diseminarse dentro de órganos adyacentes o por metástasis a sitios distantes a través de la vía sanguínea o a través de la circulación linfática (Maronpot R., 1998).

Las áreas necróticas presentes en algunos neoplasmas malignos se producen cuando el crecimiento neoplásico es tan grande que el abastecimiento de sangre existente no alcanza (Maronpot R., 1998).

La adquisición de una ventaja para el crecimiento de las células cancerosas puede a menudo tener graves implicaciones para el tejido normal circundante. La fuerte competencia por el espacio y los nutrientes, provocan la destrucción de las estructuras normales, lo cual puede producir consecuencias desastrosas cuando ocurre en órganos vitales (Ruddon, 1995).

En el ser humano, se han reconocido y clasificado más de 200 tipos diferentes de cáncer agrupados según su origen embriológico. La mayoría de estas neoplasias pueden dividirse en tres grandes grupos: carcinomas, sarcomas y leucemias/linfomas (Rojo M. Izquierdo, 1995).

Los carcinomas se originan a partir de células epiteliales de origen ectodérmico y/o endodérmico, como por ejemplo células que cubren la superficie del cuerpo o de varias glándulas entre otros. Los sarcomas se desarrollan en estructuras de soporte como el tejido conectivo y vasos sanguíneos (mesodermo), mientras que las leucemias y linfomas se originan a partir de células sanguíneas de la médula ósea y de nódulos linfáticos (mesodermo), respectivamente (Franks & Teich, 1997).

Los cánceres también se clasifican basándose en el órgano donde se originan y/o el tipo de célula involucrada. Por ejemplo, los carcinomas de ovario y de mama se originan en ovario y mama, respectivamente, y el término carcinoma denota cáncer de células epiteliales. Tal convención ha permitido la clasificación de los tipos de cánceres conocidos (Ruddon, 1995).

Por otro lado, también existen neoplasias donde se reconocen dos o más tipos de tejido, tal es el caso, de los teratomas, considerados por lo tanto, tumores mixtos (Dehner LP, *et al.*, 1990). El teratoma es un tumor compuesto por tejidos de diferentes órganos provenientes de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo, endodermo. Por eso, el tumor presenta estructuras como hueso, dientes, grasa, piel, pelo, tejido cerebral, etc. Es una verdadera neoplasia porque tiene tejidos formados por más de una capa germinal y es un tumor extraño al órgano donde se ha encontrado (Novak ER, Lambrou CD, Woodruff JD, 1975).

El grado de transformación histológica también permite hacer subdivisiones dentro de muchos tipos de tumores; por ejemplo, pueden subdividirse en grados I, II, III, y IV, según su citología, morfología y malignidad (Rojo M. Izquierdo, 1995).

3. Cáncer de pulmón

3.1. Etiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por neoplasias malignas en todo el mundo (Schreiber, Gilbert, Mc Crory, Douglas, 2003), y persiste como un desafío para la medicina, porque a pesar de los avances en las técnicas de diagnóstico y en los recursos terapéuticos, continúan siendo magros los resultados del tratamiento, evidenciados por las pocas curaciones con relación a la cantidad de enfermos asistidos. Ello se debe en buena parte a que en los últimos años no hubieron sensibles respuestas a los intentos de reducir la exposición a carcinógenos, y también a que no mejoró la detección del tumor en una etapa temprana, lo cual hubiera podido aumentar la curabilidad, pero por sobre todo a que todavía no se cuenta con la solución apropiada para esta patología (Pradier R., Salas C., Krichuk R., Loria D., 2000).

El cáncer de pulmón se desarrolla cuando las células normales del pulmón presentan algún daño genético que eventualmente conduce a una proliferación descontrolada (Spitz, M.

R., Wei, Q., Dong, Q., Amos, C. I., Wu, X., 2003). La mayoría de las mutaciones genéticas se deben a la exposición ambiental a carcinógenos, incluyendo virus y químicos, régimen alimenticios y factores físicos. El humo del cigarrillo contiene más de 4000 químicos, y se sabe que 55 de ellos son carcinógenos (Yuspa S, Shields P., 2001). En efecto, el 90% de los casos de cáncer pulmonar se relacionan con el cigarrillo, y muy pocos no fumadores desarrollan cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón se considera una de las enfermedades más prevenibles, ya que la abstinencia al cigarrillo y el dejar de fumar, reduce su incidencia. Sin embargo, si el 100% de los fumadores dejaran de fumar inmediatamente, nuevos casos de cáncer pulmonar aparecerían durante muchos años ya que el desarrollo de la enfermedad requiere un tiempo prolongado (Greenlee R, Hill-Harmon M, Murray T, Thun M., 2001). Si bien el cigarrillo es el carcinógeno más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón, se han identificado varios factores químicos y ambientales que pueden producir el daño genético que conduce a esta patología. Las estadísticas reflejan que son muchos los factores que contribuyen a su desarrollo (Adams, M.L. 2000):

1. **Cigarrillos:** más del 85% de los casos de cáncer pulmonar ocurren en personas que son o fueron fumadoras. La relación entre el cáncer de pulmón y el cigarrillo es debido a los carcinógenos presentes en el tabaco.

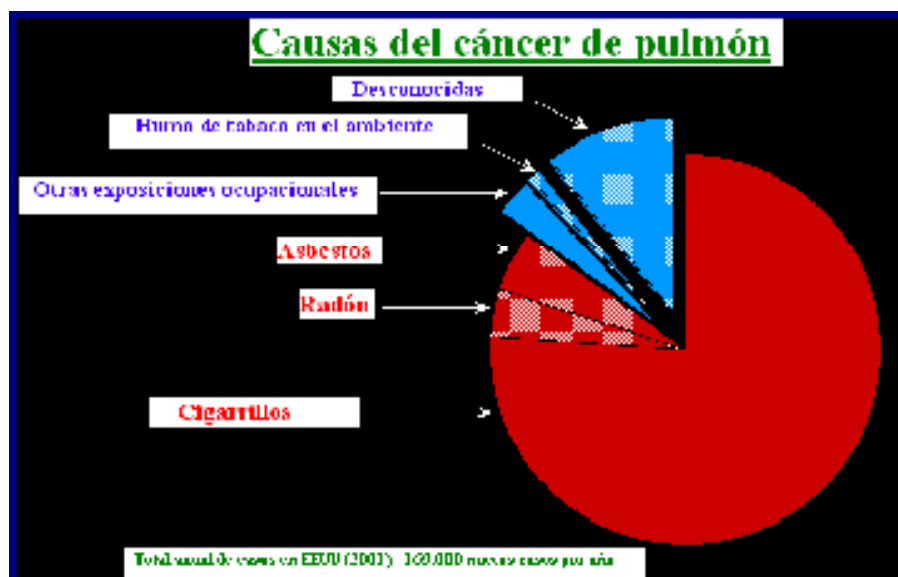
La probabilidad de que un fumador desarrolle cáncer de pulmón se ve afectada por la edad a la que se empezó a fumar, por el tiempo que la persona ha fumado, el número de cigarrillos fumados al día y la fuerza con la que inhala el fumador (Holford T.R., Z. Zhang, T. Zheng, and L.A. McKay, 1996).

2. **Humo de tabaco en el ambiente:** la posibilidad de desarrollar cáncer de pulmón aumenta con la exposición al humo de tabaco en el ambiente, es decir al humo presente en el aire cuando otra persona está fumando. Este tipo de exposición se llama fumar de segunda mano o fumar en forma pasiva o involuntaria. La Agencia de Protección Ambiental de EEUU ha estimado que en este país mueren por año 3000 personas de cáncer de pulmón debido a la exposición pasiva (Satcher D., 2001).

3. **Carcinógenos ambientales:** existe asociación entre la incidencia de cáncer de pulmón y la exposición a asbestos, radón, arsénico, cromo, níquel, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftalenos, florantenos, benzopirenos, etc), radiación ionizante (rayos-x), radiación gamma, hollín, alquitrán, aceites minerales, etc. (Mueller, L.M., M.M. Hynes, H. Li, and F. Amadeo. 1989-1998; Melloni, B., A. Vergnenegre, P. Lagrange, and F. Bonnaud, 2000).

4. **Factores genéticos:** si bien todas las personas se hallan expuestas a carcinógenos no todas desarrollan cáncer. Mientras que muchos de los fumadores crónicos nunca desarrollan cáncer de pulmón, un número significativo de personas que no están expuestas a factores de riesgo desarrollan la patología. Esto se debe a que los genes determinan cuán susceptible es la persona al daño genético, qué tan capaz es de reparar el daño ocurrido, y qué tan bien el sistema inmune detecta y destruye células cancerosas (Au, W.W., H.Y. Oh, J. Grady, S.A. Salama, and M.Y. Heo, 2001; Forgacs, E., S. Zochbauer-Muller, E. Olah, and J.D. Minna, 2001).

5. **Edad:** la edad puede contribuir al riesgo personal de cáncer de pulmón ya que los daños genéticos tienden a acumularse. Las células acumulan múltiples defectos genéticos antes de convertirse en cancerosas. Además, el sistema inmune trabaja menos efectivamente con el incremento de la edad.

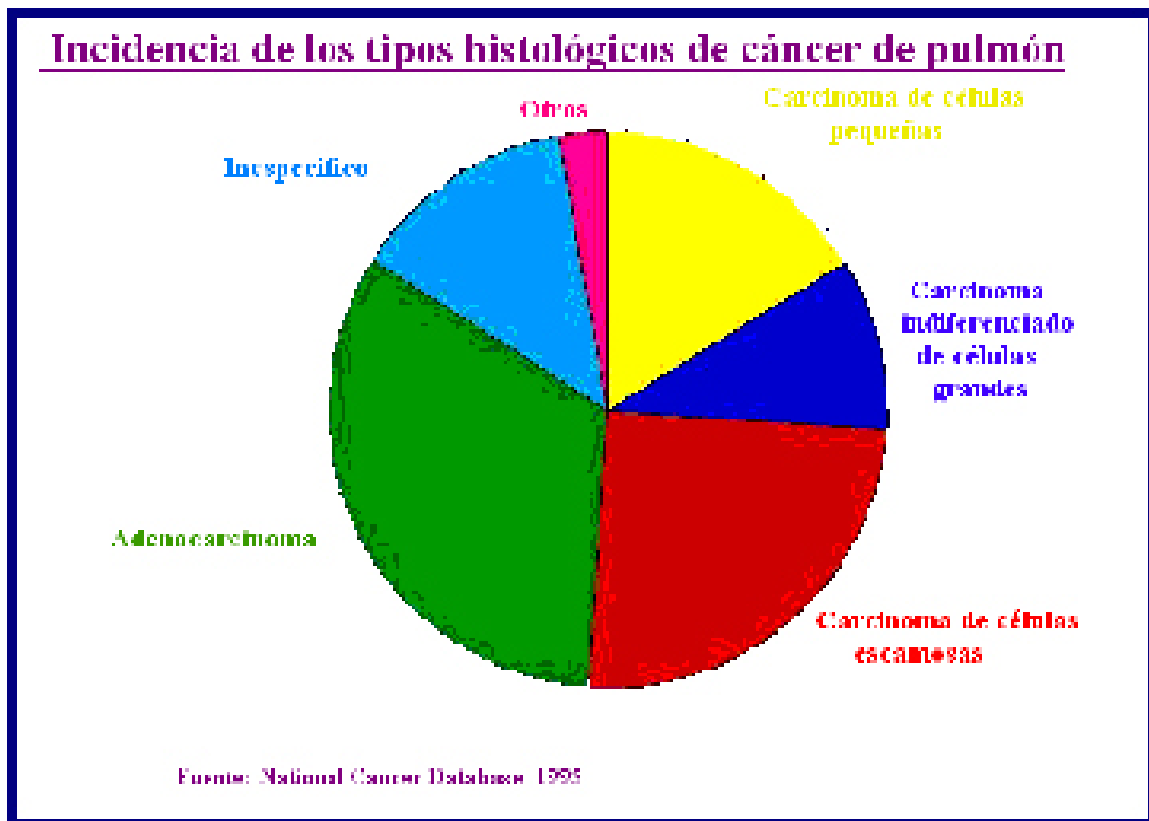


3.1. Clasificación de los carcinomas broncogénicos

El cáncer de pulmón también es denominado cáncer broncopulmonar o carcinoma broncogénico. Estos términos permiten identificar a cualquier tumor maligno de estirpe epitelial originado en el epitelio de revestimiento o glandular del árbol bronquial, quedando excluidos los tumores benignos, los mesenquimáticos, los pleurales, los metastásicos y otros que aunque comprometen a tejidos del tórax se propagan desde territorios vecinos (Pradier R., Salas C., Krichuk R., Loria D., 2000).

Clínicamente el cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales: cáncer de pulmón de células pequeñas –SCLC- (small cell lung cancer), y cáncer de pulmón de células no pequeñas –NSCLC- (non-small cell lung cancer). Muy raras veces los cánceres de pulmón tienen características de los dos tipos. Estos cánceres se conocen como cánceres mixtos de células pequeñas/grandes. Cada tipo de cáncer de pulmón tiene características biológicas únicas siendo diferentes las respuestas a las distintas terapias (Ginsberg R, Vokes E, Rosenweig, K., 2001).

1. **Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)**: este tipo de cáncer es responsable de entre 20% y 25% de todos los cánceres de pulmón. Otros nombres para el cáncer de células pequeñas son cáncer de células en grano de avena, carcinoma indiferenciado de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino mal diferenciado (Hinson J, Perry M, 1993).
2. **Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)**: este es el tipo más común y es el responsable de entre 75% y 80% de los cánceres de pulmón. Dentro de este grupo hay tres subtipos (Carney DN, Hansen HH, 2000):
 - a. Adenocarcinoma (incluyendo el carcinoma bronquioalveolar)
 - b. Carcinoma de células escamosas
 - Carcinoma indiferenciado de células grandes



Cáncer de pulmón de células pequeñas:

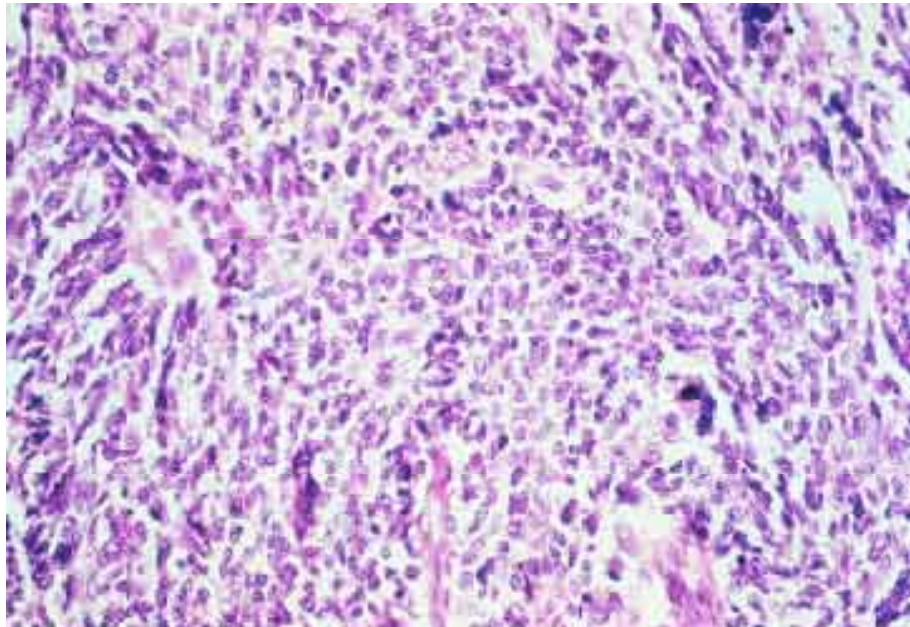
Este tipo de cáncer se caracteriza por crecer más rápidamente que el NSCL (cáncer de pulmón de células no pequeñas), y puede extenderse a los ganglios linfáticos y a otras partes del cuerpo como los huesos, el cerebro, las glándulas suprarrenales y el hígado. Por lo general, empieza en los bronquios en la dirección central de los pulmones.

El cáncer de pulmón de células pequeñas casi siempre es causado por el consumo de tabaco. Es muy raro que una persona que no fume desarrolle un cáncer de este tipo (Hinson J, Perry M, 1993).

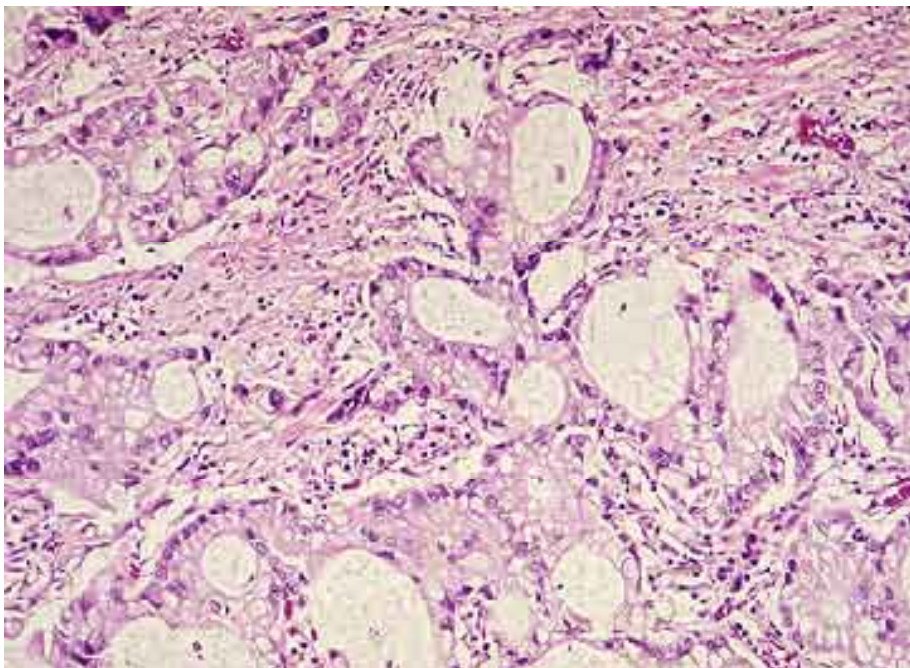
Adenocarcinoma (cáncer de pulmón de células no pequeñas):

El adenocarcinoma es responsable aproximadamente del 40% de los cánceres de pulmón en EEUU, y aproximadamente del 55% de los NSCLs (cánceres de pulmón de células no pequeñas). Es la forma más común de cáncer de pulmón en la mujer y en el hombre que nunca fumaron, y en personas menores de 50 años.

Las células del adenocarcinoma tienen apariencia glandular. La mayoría de estos tumores producen un fluido abundante denominado mucina. No se ha determinado con certeza aún los factores que son causantes de este tipo de cáncer, pero algunos de ellos incluyen: cambios en los hábitos de fumar, patrones alimenticios, factores ambientales y factores ocupacionales (Kreyberg L, Liebow AA, Uehlinger



Carcinoma de células pequeñas



Adenocarcinoma

Carcinoma de células escamosas (cáncer de pulmón de células no pequeñas):

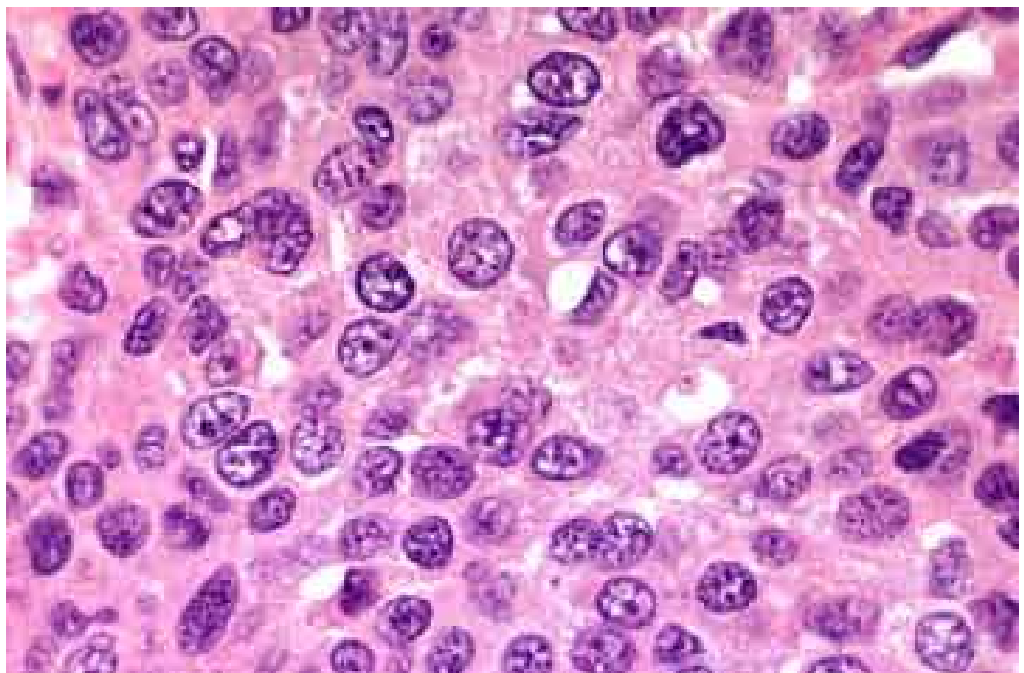
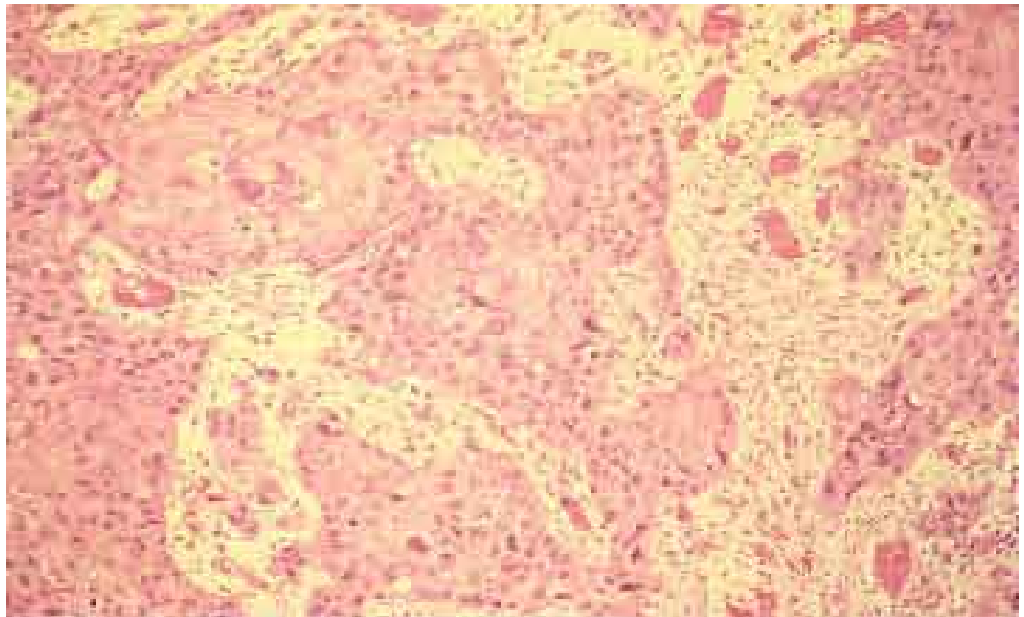
El carcinoma de células escamosas –SCC- (squamous cell carcinoma) es también conocido como carcinoma epidermoide, y es la forma más común de cáncer de pulmón en el hombre que es fumador o que lo fue. El SCC es responsable de aproximadamente el 25-30% de los cánceres de pulmón de EEUU, y es más frecuente en hombres y en personas de aproximadamente 65 años de los dos sexos.

Estos tumores, a menudo, producen una sustancia llamada queratina, la cual puede verse bajo microscopio. El SCC usualmente comienza a desarrollarse en alguna de las grandes vías aéreas. Como consecuencia, estos tumores tienden a localizarse en el área central del pulmón (Kreyberg L, Liebow AA, Uehlinger EA, 1981).

Carcinoma indiferenciado de células grandes (cáncer de pulmón de células no pequeñas):

Las células del carcinoma de células grandes –LCC- (large cell carcinoma) se caracterizan por estar altamente indiferenciadas, y presentar una apariencia inmadura. Este tipo de cáncer constituye entre el 10% y el 15% de los cánceres de pulmón en EEUU. Puede desarrollarse en cualquier parte del pulmón y su pronóstico es generalmente menos favorable que las otras formas de NSCL (cáncer de pulmón de células no pequeñas) ((Kreyberg L, Liebow AA, Uehlinger EA, 1981).

Carcinoma de células escamosas



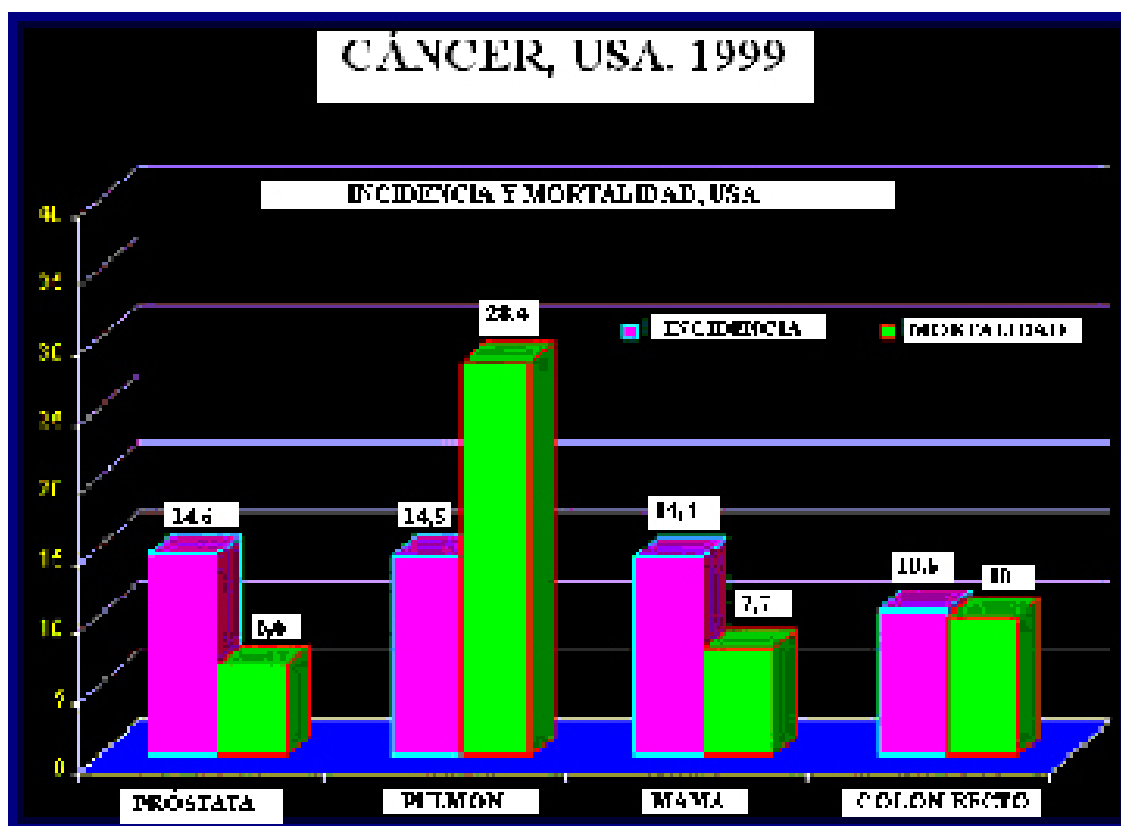
Carcinoma indiferenciado de células grandes

3.1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón constituye actualmente la causa más frecuente de mortalidad por enfermedad neoplásica en los países del mundo occidental, tanto en hombres como mujeres. Se estima que, analizadas globalmente las muertes por cáncer, aproximadamente el 35% de ellas obedecen a cáncer pulmonar (Vaporciyan AA, Swisher SG. 2000).

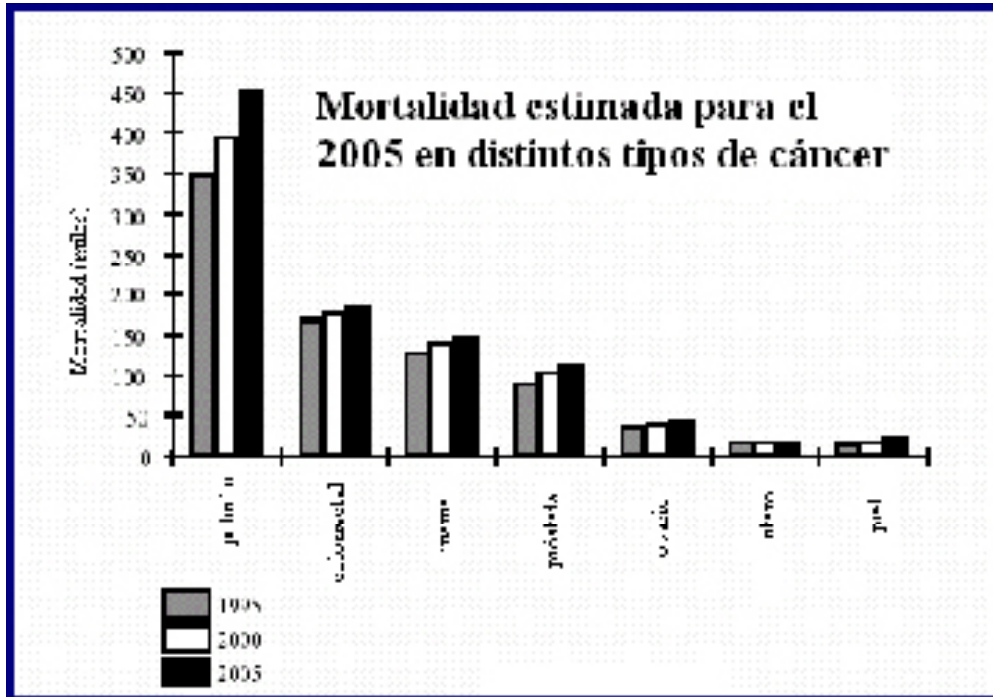
En Europa Occidental ocasiona el 29% de muertes en el varón y 9% de muertes en la mujer. Los datos en EEUU indican 160.000 fallecidos por año (28% de todas las muertes). En 1987 las muertes por cáncer de pulmón en la mujer superaron a las producidas por cáncer de mama, y el 31% de las muertes por cáncer en el hombre son debidas al cáncer de pulmón. Este causa más muertes que los tres tipos más comunes de cáncer juntos (cáncer de colón, 48.100 muertes; cáncer de mama, 40.000 muertes; y cáncer de próstata, 30.200 muertes) (Jemal A, Thomas A, Murray T, *et al.*, 2002).

La importancia del cáncer de pulmón en relación a otras neoplasias puede verse en la siguiente figura donde se representa la incidencia y mortalidad de distintos tumores en EEUU durante el año 1999 (American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington, 1997).

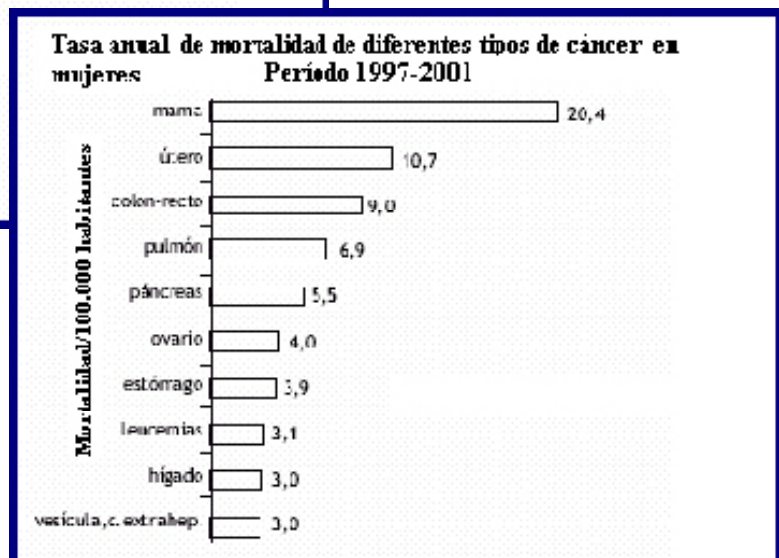
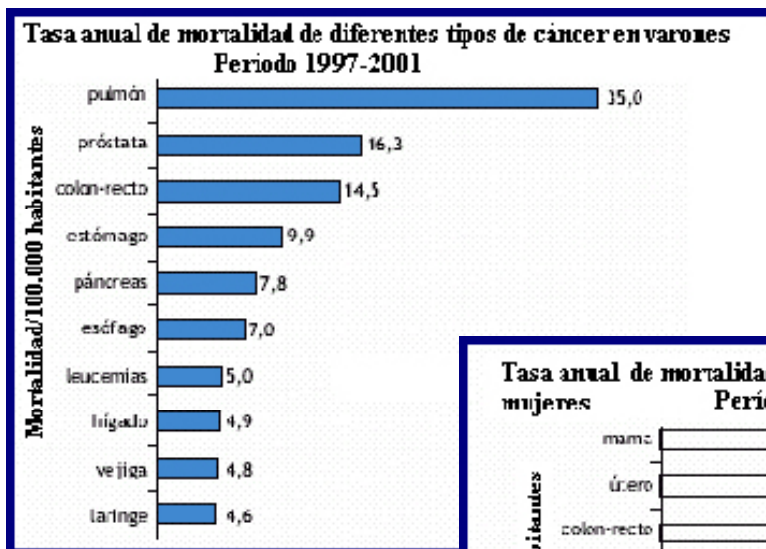


El gran incremento de la tasa de incidencia del cáncer de pulmón entre fumadores continuará creciendo hasta que dejen de fumar. A partir de este momento, la tasa de incidencia permanecerá constante por muchos años en ex fumadores (Peto J., 2001).

Las estimaciones para el 2005 indican que el cáncer de pulmón provocará 450.000 muertes, lo cual significa que casi 8 de los 10 casos de cáncer de pulmón resultarán en muerte (Darby S., 2003).



En Argentina, la tasa anual de mortalidad por cáncer de pulmón para el período 1997-2001 resultó de 35 por cada 100.000 habitantes entre el sexo masculino y de 6.9 para el sexo femenino (Atlas de Mortalidad por Cáncer, Argentina 1997-2001). Lamentablemente, en nuestro país la prevalencia de tabaquismo continúa siendo elevada, por lo que el mayor esfuerzo para la prevención debe concentrarse en alentar la cesación del hábito de fumar. En la última década, se observó que el tabaquismo se incrementó principalmente en el sexo femenino y entre los más jóvenes (12 a 15 años), con una prevalencia de un 16% en estos últimos. La etapa de transición entre la infancia y la adolescencia es particularmente vulnerable y la edad de inicio se encuentra en los 12 años (Unión Antitabáquica Argentina (UATA)-Epidemiología



Debido a que la gran mayoría de los cánceres de pulmón son atribuibles al cigarrillo, eliminando este riesgo, por ejemplo mediante campañas de prevención dirigidas especialmente a jóvenes, se reduciría su incidencia. Por otro lado, la detección temprana de esta enfermedad es fundamental ya que los índices de supervivencia son mayores en pacientes con estadios tempranos, y los avances en el tratamiento de la misma son escasos (Mountain CF., 1997).

4. Invasión tumoral

4.1. Proceso metastático

La metástasis es la mayor causa de morbilidad y muerte en pacientes con cáncer. Las modalidades de tratamiento como cirugía, quimioterapia, y radioterapia, pueden curar aproximadamente el 50% de los pacientes que desarrollan un tumor maligno. La mayoría de los pacientes en tratamiento, mueren por los efectos directos de la metástasis o por las complicaciones asociadas con el tratamiento de la misma (Liotta, 1986).

La transición desde el crecimiento tumoral *in situ* hasta la formación de la metástasis se define por la habilidad de las células tumorales en el sitio primario, para invadir el tejido local y atravesar las barreras tisulares que les permitirán colonizar vasos sanguíneos y linfáticos, facilitando su diseminación. El proceso de metástasis no es azaroso (Fidler, 1990). Es una cascada de pasos secuenciales e interrelacionados, cada uno de los cuales involucra múltiples interacciones entre el tumor y los tejidos del hospedador, las cuales incluyen adhesión, angiogénesis y proteólisis (Folkman, 1986). Las células tumorales metastásicas deben abandonar el tumor primario e invadir el tejido del hospedador. Deben entrar en la circulación, sobrevivir en ella, arrestarse en el lecho vascular distante, y extravasar en el intersticio de un órgano y/o su parénquima (Liotta *et al.*, 1980). Sólo un pequeño número de células tumorales inician exitosamente colonias metastásicas. Consecuentemente, como describen Fidler y Hart (1982), la metástasis puede ser vista como una competencia altamente selectiva, que favorece la supervivencia de las células tumorales metastásicas que preexisten dentro del tumor primario original. No todas las células que abandonan el tumor primario pueden dar lugar a una metástasis debido en parte, a que fracasan al completar algún paso de este proceso. La complejidad de la patogénesis metastásica explica en parte, la causa por la cual este proceso es ineficiente. Por ejemplo, la presencia de células tumorales en la circulación no implica que ocurrirá metástasis, porque la mayoría de las células tumorales que entran en la corriente circulatoria son rápidamente eliminadas. Menos del 1% de las células tumorales que entran en la circulación son viables, y menos del 0.1% de estas células sobreviven para producir metástasis (Fidler, 1990).

Cada paso del proceso metastático puede ser limitante: una falla o una insuficiencia en alguno de ellos, puede detener el proceso entero (Poste & Fidler, 1979).

Las metástasis pueden localizarse en diferentes nódulos linfáticos, órganos viscerales, y en varias regiones del mismo órgano, complicando así sus tratamientos. Además, el ambiente específico del órgano puede modificar la respuesta de las células tumorales a la terapia sistémica y alterar la eficiencia de agentes anticancerosos (Fidler, 1990).

La mayor barrera en el tratamiento de las metástasis es la heterogeneidad biológica de las células cancerosas en los neoplasmas primarios y secundarios. Esta heterogeneidad se evidencia en un amplio rango de características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas. Se observa por ejemplo, cambios en la expresión de receptores celulares de superficie, enzimas, así como también cambios en el cariotipo, morfologías celulares, propiedades de crecimiento y habilidad para invadir y producir metástasis (Nicolson, 1984). La presencia de subpoblaciones de células tumorales que proliferan en el mismo tumor exhibiendo un potencial metastático heterogéneo se ha confirmado en muchos laboratorios con un amplio rango de tumores experimentales de distintos orígenes histológicos (Fidler, 1978; Heppner G., 1984).

La búsqueda de los mecanismos que regulan el patrón metastático comenzó hace un siglo atrás. En 1889, Paget cuestionó si la distribución de la metástasis era un hecho aleatorio. Él analizó setecientas treinta y cinco autopsias de mujeres con cáncer de mama, y el patrón metastático hallado, le sugirió que el proceso no fue aleatorio sino más bien que las células tumorales (la «semilla») tuvieron una afinidad específica por el medio ambiente de determinados órganos (el «suelo»). La metástasis se produjo sólo cuando la «semilla» y el «suelo» resultaron compatibles (Fidler, 2002).

En 1929, James Ewing puso en duda la teoría «semilla y suelo» de Paget, proponiendo que la diseminación metastásica ocurre por factores puramente mecánicos que son el resultado de la estructura anatómica del sistema vascular (Fidler, 2002).

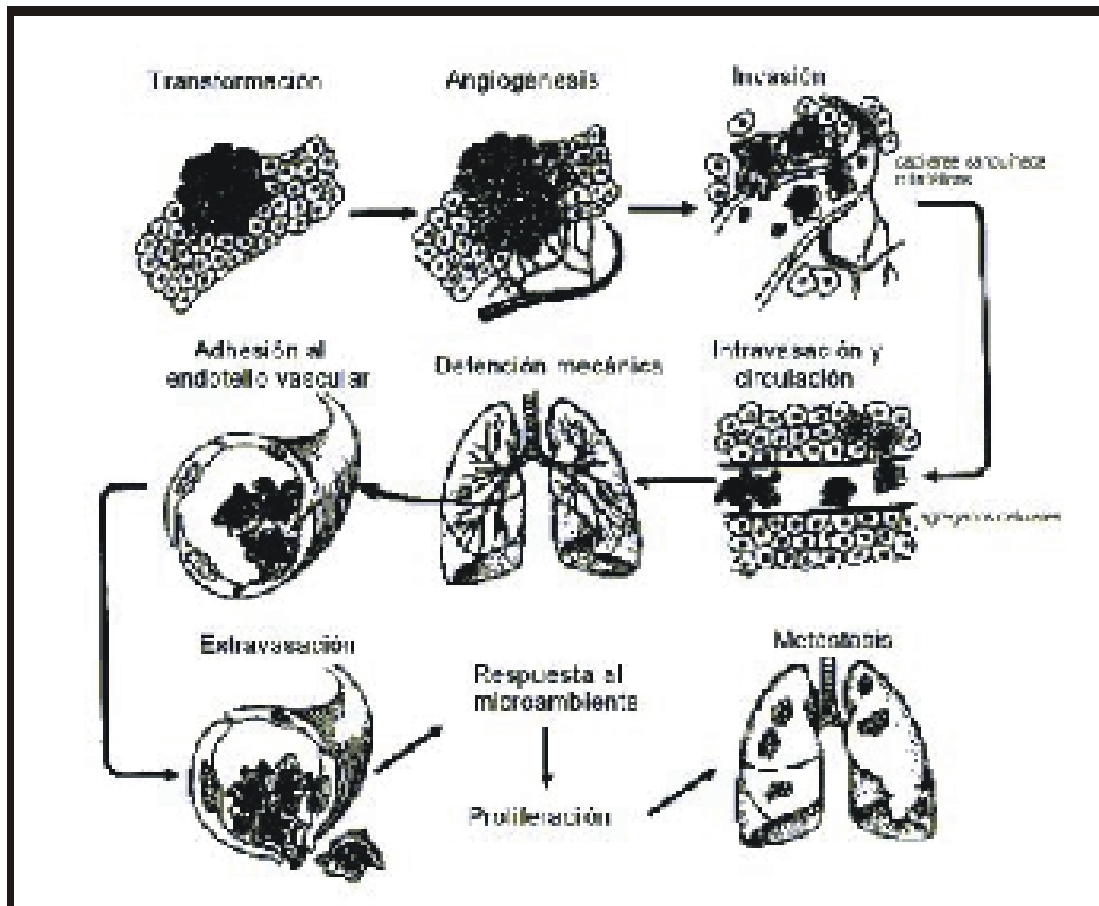
Sugarbaker (1979) y Weiss (2000) revisaron los datos experimentales de los sitios de preferencia de las metástasis producidos en neoplasmas humanos diferentes. Ellos concluyeron que la metástasis regional podría ser atribuida a consideraciones anatómicas y mecánicas, como la circulación venosa eferente o

el drenaje linfático a los nódulos linfáticos, pero los subsecuentes eventos de proliferación y crecimiento son influenciados por las células de un órgano específico.

Observaciones clínicas de pacientes con cáncer y estudios experimentales de tumores en ratones revelaron que los tumores producen metástasis a órganos específicos independiente de la anatomía vascular, proporción de flujo sanguíneo, y número de células enviadas a cada órgano (Fidler, 1970). Por consiguiente, la mera presencia de células tumorales viables en un órgano particular no siempre predice que las células proliferarán para producir metástasis (Nicolson, 1988). Estudios realizados por Hart y Fidler (1980), confirmaron que los sitios de metástasis no están sólo determinados por las características de las células neoplásicas sino también por el microambiente del tejido del hospedador.

En principio, los pasos y eventos requeridos para la formación de una metástasis son los mismos en todos los tumores. La mayoría de los pasos en la formación de una metástasis son los siguientes (Fidler, 1990):

1. **Transformación**: es el proceso por el cual la célula acumula mutaciones en genes específicos, como protooncogenes y genes supresores de tumores. Una vez ocurrida esta transformación, el crecimiento de células neoplásicas debe ser progresivo.
2. **Angiogénesis**: consiste en una amplia vascularización que debe ocurrir cuando la masa tumoral excede los dos milímetros de diámetro. La síntesis y secreción de varios factores angiogénicos juegan un rol clave en el establecimiento de una red capilar desde el tejido circundante del hospedador.
3. **Invasión**: implica la adquisición por parte de las células tumorales de la capacidad de escapar del tumor primario y de atravesar la matriz extracelular que delimita el tumor primario del tejido conjuntivo adyacente. Entre los aspectos implicados, se encuentran la ruptura de las interacciones celulares, el traspaso de la membrana basal, y la infiltración en el tejido normal circundante del hospedador.
4. **Intravasación y circulación**: es la penetración de las células tumorales al torrente sanguíneo y a los vasos linfáticos. Una vez en la circulación, las células tumorales deben evitar la destrucción, y escapar de la vigilancia del sistema inmune.
5. **Arresto mecánico**: ocurre cuando las células tumorales que sobreviven en la circulación sanguínea, se alojan en pequeños vasos, y suelen secretar factores químicos que estimulan la producción de plaquetas, las cuales se agregan en torno a las células tumorales y forman émbolos. Esto ayuda a las células cancerosas a unirse y sobrevivir dentro de la circulación. Así, el arresto dentro de los vasos sanguíneos ocurre por la adhesión de células cancerosas que se agregan a las plaquetas de los capilares endoteliales de los órganos.
6. **Extravasación**: consiste en el escape de las células tumorales desde los vasos sanguíneos, e involucra tres eventos: 1) la adhesión de las células tumorales al revestimiento endotelial, 2) la retracción de las células endoteliales seguida por la adhesión de las células tumorales a la membrana basal, y finalmente, 3) la destrucción de ésta. Luego de la extravasación, las células cancerosas deben migrar a su nueva localización, lo cual requiere la producción continua de proteasas para digerir la matriz. Además, los péptidos liberados durante la proteólisis actúan como factores quimiotácticos para atraer a otras células cancerosas al lugar.
7. **Proliferación de células tumorales, metástasis, y metástasis secundarias**: La proliferación de las células cancerosas en su nuevo sitio, está inicialmente confinada a una pequeña región en torno a los vasos sanguíneos. Este crecimiento ocurre bajo la influencia de factores de crecimiento producidos localmente, y debido a la difusión de oxígeno desde la sangre. A medida que el tumor aumenta su tamaño, se deberán formar nuevos vasos sanguíneos que puedan abastecerlo con los nutrientes esenciales y con oxígeno. Para producir lesiones apreciables, la metástasis debe desarrollar un circuito vascular, evadir el sistema inmune del hospedador, y responder a factores específicos que influyen su crecimiento. Una vez que ésto se produjo, las células pueden invadir el estroma del hospedador, penetrar en los vasos sanguíneos, y entrar en el torrente circulatorio para producir metástasis secundarias, llamadas «metástasis de metástasis».

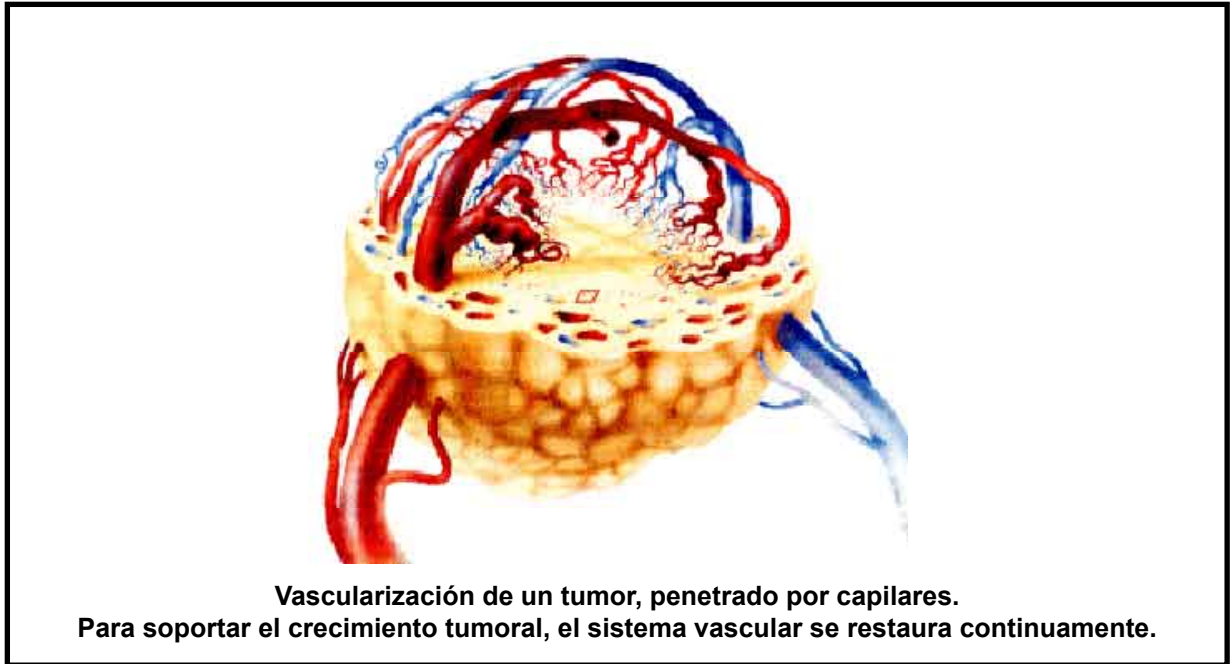


4.2. Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de pequeños capilares ya preexistentes en tejidos y órganos. Este fenómeno acompaña algunos procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas, los cambios morfológicos observados dentro de los órganos reproductivos de la mujer durante el ciclo menstrual, y la formación de placenta en el embarazo (Eliseenko VI, Skobelkin OK, Vhegin VM & Degtiarev MK, 1998).

En 1963, Folkman y colaboradores, observaron la existencia de neovascularización durante la formación y crecimiento de tumores sólidos. La formación de nuevos vasos sanguíneos dentro de neoplasmas, provee a los tejidos tumorales de oxígeno y componentes energéticos básicos, y es un proceso complejo que involucra vías de señalización molecular y la participación de diferentes tipos celulares como células del sistema inmune y células endoteliales (Hanahan, 1999; Liekens, 2001). Uno de los primeros eventos observados durante

la angiogénesis, es la extravasación y migración de células del sistema inmune en respuesta a citocinas secretadas por las células tumorales. A través de la secreción de factores proangiogénicos adicionales, las células del sistema inmune amplifican la señal proangiogénica que difunde dentro del tejido circundante. La respuesta de las células endoteliales a las señales proangiogénicas es la secreción de enzimas especializadas llamadas metaloproteasas de matriz que digieren las fibras de colágeno presentes en la membrana basal. Esto crea una fisura a través de la cual las células endoteliales pueden migrar estimuladas por el TAF (factor angiogénico tumoral), produciendo en su trayecto de migración, una matriz extracelular que se ensambla dentro de una membrana basal organizada, dirigiendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos funcionales (Orme ME, Chaplain MA, 1996).



Los estudios sobre el rol de la angiogénesis en el curso de la carcinogénesis, han demostrado que la formación de nuevos vasos es el punto de cambio después del cual un pequeño tumor que no excede 1-2 mm³ en tamaño (carcinoma *in situ*), se transforma en un gran neoplasma que metastatiza a tejidos próximos y también puede metastatizar a distancia (Folkman, 1995).

En 1972, Folkman propuso como hipótesis que los tumores sólidos son angiogénicos dependientes. Luego de subsecuentes modificaciones, esta idea fue enunciada en términos simples: *una vez formado el tumor, todo incremento en la población de células tumorales debe ser precedido por un incremento de nuevos capilares que convergen sobre el tumor*. Esta hipótesis fue respaldada por experimentos en los cuales las células tumorales se separaron de sus lechos vasculares para prevenir la neovascularización. Los tumores detuvieron su crecimiento a un pequeño tamaño de 1 ó 2 mm³, pero reasumieron rápidamente el crecimiento cuando se permitió la vascularización (Folkman & Klagsbrun, 1987).

El análisis histológico y ultraestructural de los vasos tumorales han revelado la existencia de pronunciadas diferencias entre éstos y vasos normales en tejidos maduros. Estas diferencias incluyen integridad y composición de la membrana basal, y diferencias en la permeabilidad. Debido a la discontinuidad de la membrana basal, los vasos tumorales son permeables y fácilmente penetrados por células cancerosas que entran en alta proporción (Kohn EC, Liotta LA, 1995).

Se ha determinado que el estímulo clave que provoca la angiogénesis es un defecto en el aparato genético de células mutadas, lo cual resulta en la formación del llamado fenotipo angiogénico (Pepper, 1997; Gasparani, 1999). Como resultado de mutaciones en oncogenes, se produce una constante y excesiva producción de factores de crecimiento angiogénicos, los cuales estimulan a las células endoteliales a migrar y a proliferar. En cambio, mutaciones y deleciones en genes supresores de tumor conducen a la síntesis alterada de proteínas endógenas, que en condiciones normales tienen como función la inhibición de la angiogénesis. Por lo tanto, ésta es el resultado de un desbalance entre factores pro y anti angiogénicos, en particular de una disminución en la producción de proteínas inhibitorias (Stepien H., Kolomecky, Pasioka, Komorowski, Stepien T. & Kuzdak, 2002).

El proceso de angiogénesis puede ser dividido en tres pasos, los cuales ocurren paralelamente al proceso de invasión de células tumorales: 1) proliferación de células endoteliales, 2) ruptura de la membrana basal, y 3) migración de células endoteliales. La inducción de este proceso es mediado por factores angiogénicos liberados por células tumorales y por células del hospedador, y depende del balance neto de reguladores positivos y negativos (Folkman, 1996). Las células inflamatorias del hospedador, incluidas linfocitos, neutrófilos, fibroblastos, macrófagos y mastocitos, que son reclutados y activados por las células tumorales, vía un mecanismo parácrino, actúan sinérgicamente con estas últimas secretando los mismos u otros factores (Ribatti *et al.*, 2001).

4.2.1. Factores angiogénicos y antiangiogénicos

Entre las proteínas angiogénicas, las más importantes son el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF (vascular endotelial growth factor), el factor de crecimiento fibroblástico básico bFGF (basic

fibroblast growth factor), y el factor de crecimiento del hepatocito HGF (hepatocyte growth factor) (Kohn, Liotta 1995).

El VEGF es el mayor regulador de la neovascularización fisiológica y patológica (Ferrara, Davis-Smith, 1997). Estimula a las células endoteliales a degradar la matriz extracelular, migrar, y formar estructuras tubulares *in vitro*. Es un regulador de la permeabilidad vascular *in vivo*, lo cual es considerado de gran importancia para el inicio de la angiogénesis (Senger DR, Van de Water I, Brown LF, *et al.*, 1993). La supervivencia de la célula endotelial en los nuevos vasos formados es dependiente del VEGF; consistente con este rol de supervivencia celular, el VEGF también induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas en las células endoteliales (Shweiki D., Itin A., Sofer D., *et al.*, 1992).

La transcripción del mRNA del VEGF es inducida por una gran variedad de factores de crecimiento y citocinas. La presión de oxígeno tisular regula los niveles de VEGF: la hipoxia induce rápida y reversiblemente la expresión de VEGF incrementando la transcripción y estabilización del mRNA (Shweiki D., Itin A., Sofer D., *et al.*, 1992).

La sobreexpresión de VEGF se ha encontrado en un gran número de líneas celulares de cáncer humano (Blood CH & Zetter BR, 1990).

El FGF constituye una amplia familia de factores de crecimiento relacionados. El miembro más caracterizado es el bFGF, un polipéptido con una potente función angiogénica. Está implicado en el crecimiento de las células musculares lisas y células endoteliales, en la proliferación de células epiteliales y fibroblastos, en la diferenciación de células endoteliales y musculares, y en la angiogénesis (Shing Y, Folkman J, Sullivan R., *et al.*, 1984). La actividad angiogénica del bFGF y del VEGF pueden ser sinérgicas (Kohn EC, Liotta LA, 1995).

El bFGF y el VEGF, entre otros factores proangiogénicos, pueden unirse a la heparina en la matriz extracelular y en la superficie celular, lo cual les confiere protección de las enzimas proteolíticas capaces de degradarlos, pudiendo formar así un reservorio de factores de crecimiento (Folkman J, Shing Y; 1992; Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A 2000). Dado que la heparina -uno de los principales mediadores de los mastocitos (MC)-, facilita la formación de estos complejos resistentes al clivaje proteolítico, a través de ella, se favorece el proceso angiogénico.

El HGF es secretado por fibroblastos y es mitogénico para células epiteliales y endoteliales. Tiene una gran afinidad con el heparán sulfato y está implicado en la regeneración tisular, la cicatrización de las heridas y la angiogénesis (Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D *et al.*, 1998).

Del grupo de factores inhibidores de la angiogénesis con aproximadamente 40 miembros, los más importantes son la angiostatina, endostatina y trombospondina-1 (Stepien HM, Kolomecki K, Pasięka Z, Komorowski J, Stepien T, Kuzdak K., 2002).

La trombospondina-1, una glicoproteína, es uno de los componentes esenciales de la matriz extracelular. Produce efectos antiproliferativos y proapoptóticos en las células endoteliales. Su síntesis es regulada por el gen p53. La mutación de este gen altera la transcripción del mRNA de la trombospondina, e incrementa la angiogénesis (Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA & Bouck N, 1994).

La angiostatina, inhibe selectivamente la proliferación de células endoteliales a la vez que induce apoptosis en éstas (Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J., 1998). También, inhibe la migración de células endoteliales a través de la matriz extracelular (Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA, 1999).

La endostatina, por su lado, induce apoptosis en las células endoteliales a través de una marcada disminución de proteínas antiapoptóticas, e inhibe la invasión de células endoteliales a través de un bloqueo de la actividad catalítica de la metaloproteinasa de matriz (MMP-2) (Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG., 2000).

Muchos de los inhibidores de la angiogénesis, debido a su rol potencial en el tratamiento de cáncer, han sido objeto de investigación de experimentos en fase clínica I/II. En los últimos años, se demostró que la terapia con angiostatina o endostatina produce casi la supresión completa de la angiogénesis inducida por el tumor, lo cual muestra una fuerte actividad antitumoral (Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D, 1999).

4.2.2. Rol de los mastocitos y la heparina en la angiogénesis

Los mastocitos se acumulan en situaciones normales y patológicas donde se desarrollan procesos angiogénicos y su migración quimiotáctica al sitio de neovascularización es inducida por factores de crecimiento como SCF (factor de crecimiento de células progenitoras), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), EGF (factor de crecimiento epidérmico), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Los mediadores químicos liberados por los mastocitos, especialmente proteasas, degradan la matriz del tejido conectivo y proveen un espacio para la

formación de nuevos vasos (Hiromatsu Y, Toda S, 2003).

Existen evidencias que mediadores de los mastocitos, como histamina, heparina, enzimas colagenolíticas (quimasa, triptasa y MMPs) que degradan la matriz extracelular, potentes citokinas proangiogénicas (cuatro isoformas del VEGF, bFGF, TGF-beta, TGF-alfa e IL-8) pueden, individualmente o sinérgicamente, estimular la angiogénesis (Norrby K, 2002).

La angiogénesis tumoral disminuye en ratones deficientes de mastocitos (W/W^v) implantados con células de melanoma B16BU6, habiendo una correlación entre el número de mastocitos y la densidad de microvasos en muchos tumores (Starkey JR, Crowle PK, Taubenberger S, 1988).

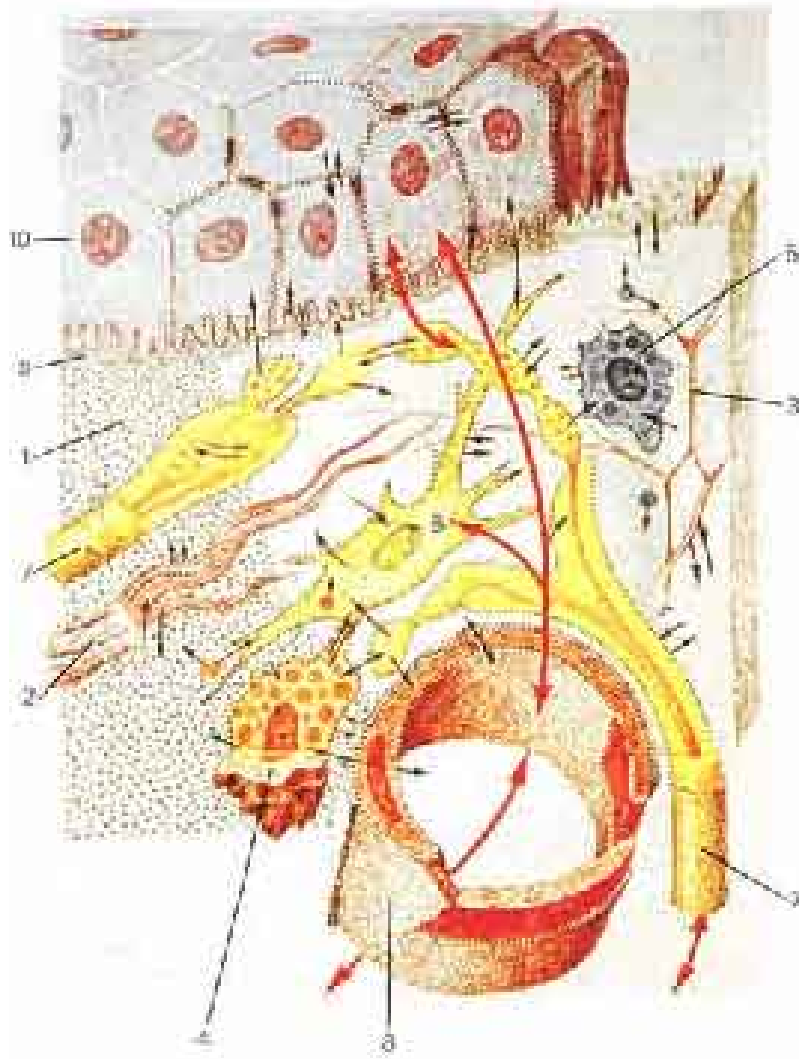
Kessler y Folkman implantaron tumores en la membrana corio-alantoidea del embrión de pollo y encontraron incrementada 40 veces la cantidad de mastocitos en torno al tumor implantado antes de que arribaran nuevos capilares (Kessler DA, Langer RS, Pless NA, Folkman J, 1976). Subsecuentemente, Azizkhan y Zetter encontraron que el lisado de mastocitos o su medio condicionado pudo estimular la locomoción de células endoteliales *in vitro*. Todos los productos de los mastocitos fueron testeados y sólo la heparina pudo estimular la locomoción de células endoteliales capilares y sustituir al lisado de mastocitos o su medio condicionado (Azizkhan RG, Azizkhan JC, Zetter BR, Folkman J, 1980). Cuando pequeñas cantidades de heparina (6-25 ig) se agregaron al embrión de pollo, el porcentaje de crecimiento capilar (estimulado por el extracto tumoral) aumentó significativamente (Taylor S, Folkman J, 1982). Una fracción no coagulante de la heparina tuvo un efecto similar (Rosenberg RD, Lam L., 1979). A partir de estos experimentos se puede pensar que alguna parte de la molécula de heparina actúa como regulador positivo de la angiogénesis (Folkman, 1986). Klagsbrun y Shing, encontraron que la heparina o fragmentos de ella pueden unir selectivamente en la superficie de células endoteliales vasculares, mitógenos celulares endoteliales que son también angiogénicos (Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M, Shing Y, 1984). Estudios realizados por Vlodavsky (1990) y colaboradores, demostraron que la actividad angiogénica de la heparina es mediada por la interacción con FGF (Vlodavsky I, Corner G, Ishai-Michaeli R, *et al.*, 1990). La heparina puede liberar bFGF de la matriz extracelular, y este factor de crecimiento actúa como un fuerte mitógeno de células endoteliales (Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, *et al.*, 1989).

4.3. Matriz extracelular

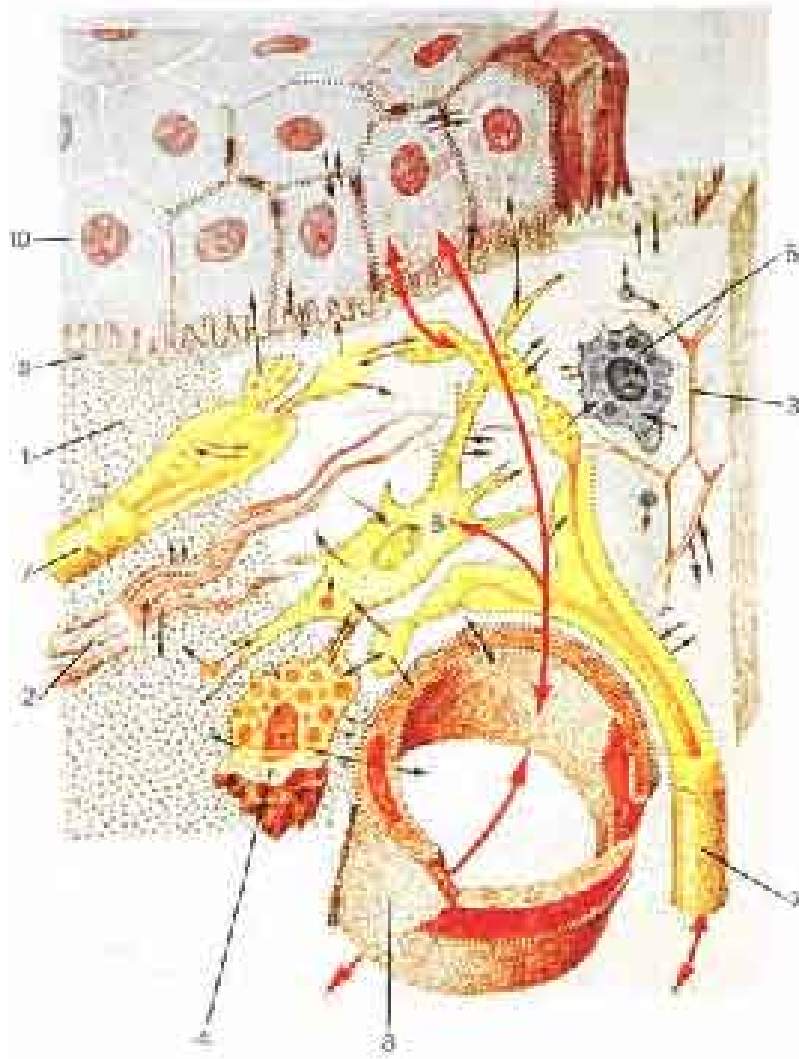
La matriz extracelular (MEC) es una malla fibrilar altamente organizada, que entre otras funciones, sirve como sustrato para la adhesión celular y la migración. También mantiene la integridad tisular, regula la difusión molecular y transferencia de estímulos. Además, la MEC forma un microambiente celular dinámico, el cual juega un importante rol en la determinación del fenotipo celular (Boudreau N, and M.J. Bissell, 1998; Streuli, C., 1999).

La MEC está formada por colágenos, glicoproteínas de adhesión como fibronectina y laminina, proteoglicanos, y glicosaminoglicanos (Aumailley M., and B. Gayraud, 1998; Zagrís N., 2001). A través de sus componentes media la información desde y hacia las células, modulando la función de factores de crecimiento/citoquinas y otros factores regulatorios incluyendo la producción de enzimas y sus inhibidores (Lehti, K., Lohi, J., Valtanen H., Keski-Oja, J. 1998).

La MEC incluye la membrana basal (MB) y el estroma intersticial. El estroma intersticial está formado en los distintos tejidos por células de tejido conectivo como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, y macrófagos, específicos de cada uno de ellos. Presenta además, una malla de fibras proteicas –colágeno y elastina- embebidas en sustancia amorfa (Aumailley M., and B. Gayraud, 1998). La MB, por su parte, separa las capas de células epiteliales y endoteliales de las células subyacentes del estroma. Al microscopio electrónico está formada por dos capas laminares: la que está vecina a las células y se denomina lámina rara o lúcida, y la segunda capa que se denomina lámina densa y se asocia a una tercera capa llamada lámina fibroreticular que contiene fibrillas colágenas, la cual es continua con el estroma intersticial. (Tryggvason, K; M. Hoyhtya, and T. Salo. 1987). Los cuatro tipos predominantes de moléculas de la MB son el colágeno tipo IV, perlecan (proteoglicano de heparan-sulfato) laminina y entactina, además

**Matriz extracelular**

1) glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas; 2) fibras de colágeno; 3) elastina; 4) mastocito; 5) macrófago; 6) fibroblasto; 7) axones terminales; 8) capilar; 9) membrana basal; 10) células epiteliales.



Matriz extracelular

1) glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glicoproteínas; 2) fibras de colágeno; 3) elastina; 4) mastocito; 5) macrófago; 6) fibroblasto; 7) axones terminales; 8) capilar; 9) membrana basal; 10) células epiteliales.

En condiciones normales, la MB y el estroma intersticial, forman una barrera relativamente impermeable a células y macromoléculas. Sin embargo, en el sitio de contacto de la MEC con un tumor invasivo, ésta es digerida por enzimas proteolíticas liberadas por el tumor, permitiendo el pasaje de células y macromoléculas. Durante la transición del carcinoma *in situ* al invasivo, las células neoplásicas penetran la membrana basal e ingresan en el estroma intersticial. Una vez allí, tienen acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos, para diseminarse a distancia. La infiltración celular de la matriz, depende indudablemente, de múltiples factores que incluyen propiedades de las células infiltrantes y de las células del hospedador, como así también propiedades de la matriz en sí misma (Liotta, 1986).

Se ha postulado una hipótesis de tres pasos para describir la secuencia de eventos bioquímicos que ocurren durante la invasión de células tumorales a la matriz extracelular. El primer paso es el anclaje de células tumorales vía sus receptores de superficie, los cuales se unen específicamente a los componentes de la matriz como laminina y fibronectina. Luego, las células tumorales ancladas, secretan enzimas hidrolíticas (o inducen a las células del hospedador a secretar enzimas) las cuales pueden degradar localmente la matriz (incluyendo la degradación de componentes de anclaje). La lisis de la matriz se localiza en una región cercana a la superficie de la célula tumoral. Finalmente, el tercer y último paso es la migración de las células tumorales hacia la región de la matriz modificada por proteólisis en respuesta a un estímulo quimiotáctico específico (Mc Carthey, 1985). Estos pasos se reiteran cíclicamente durante la invasión y son cruciales en la diseminación metastásica de células tumorales (Terranova, 1986).

4.4. Alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión

Uno de los primeros eventos en la invasión de células tumorales es la pérdida de contactos entre células adyacentes en el tejido tumoral por la interrupción de las asociaciones célula-célula y célula-matriz extracelular. La pérdida de la cohesividad es consecuencia de la alteración de la expresión y función de varias moléculas de adhesión (Brodth P, Dedhar S, 1996). Estas normalmente impiden la migración e invasión de células dentro del estroma circundante al mantener la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Moléculas asociadas a la superficie celular, como la familia de receptores de integrina, cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen un rol importante en la migración de células tumorales y pueden contribuir a la progresión de dichas células hacia la metástasis (Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Kreuser ED, 1996).

Se ha demostrado que la progresión de una neoplasia requiere alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión en la célula tumoral (Velasco- Velazquez, Molina-Guarneros, Oviedo, Orozco, Mendoza-Patiño, Mandoki, 2000).

Mediante diversos modelos experimentales se ha estudiado la importancia de las moléculas de adhesión en las neoplasias, observándose que los cambios en la expresión y/o funcionalidad de los receptores de adhesión intervienen en la progresión de la enfermedad. Por ello, las moléculas de adhesión han sido señaladas como blancos para el desarrollo de terapias neoplásicas (Velasco- Velazquez, *et al.*, 2000).

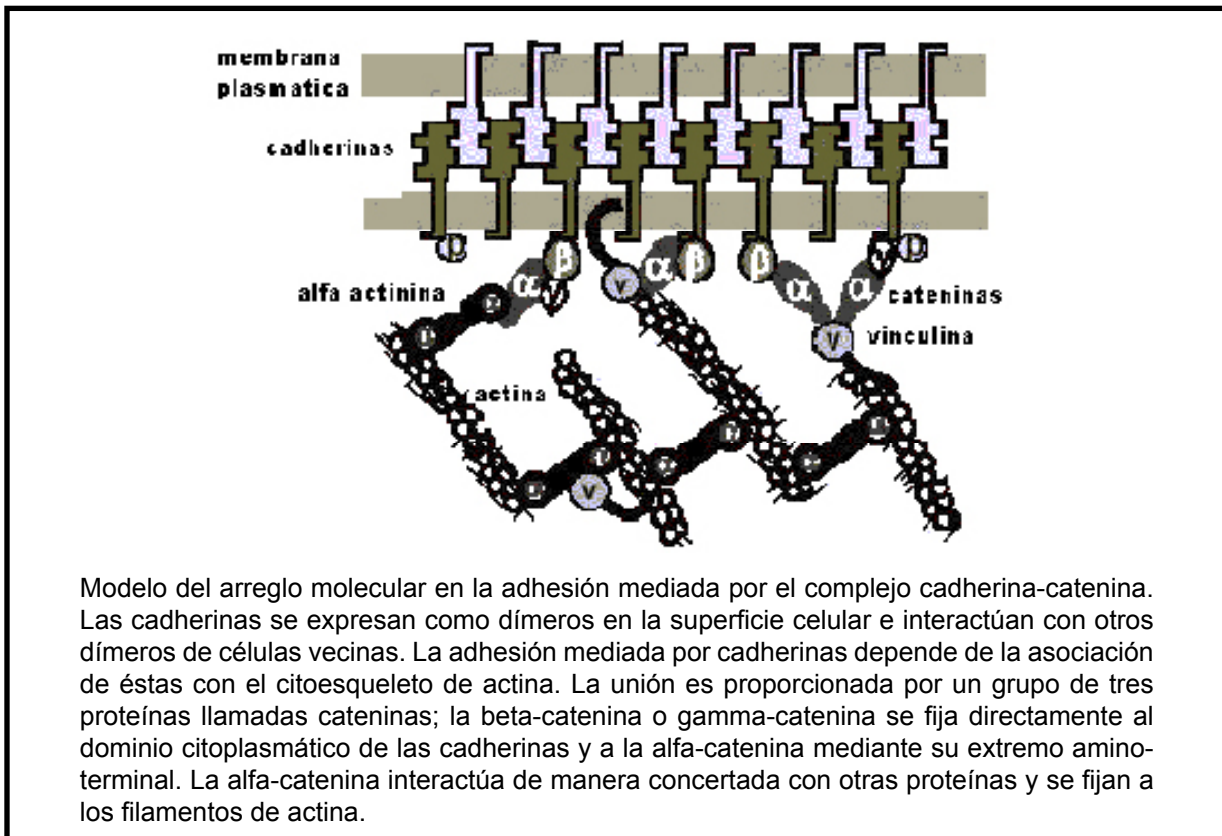
La información actual muestra que las moléculas de adhesión no sólo se expresan en forma anormal en los tumores, sino que participan activamente en su crecimiento y desarrollo, e inclusive algunas de ellas les confieren el potencial metastásico. Por lo tanto, su caracterización puede contribuir a la comprensión de algunos de los mecanismos que emplean las células tumorales y que no sólo pueden tener importancia en el diagnóstico como marcadores de malignidad, sino que también son relevantes en el tratamiento, al permitir inhibir los procesos relacionados con la formación de metástasis (Roa Iván E , *et al.*, 2001).

4.4.1. Cadherinas:

Las cadherinas son glicoproteínas de membrana, capaces de mediar la adhesión célula-célula en una manera dependiente de calcio. Las cadherinas expresadas en la superficie de células adyacentes se unen entre sí (unión homotípica), para mantener las células juntas y conservar la arquitectura tisular; además participan en el desarrollo de órganos y vasos, y en la cicatrización de heridas (Roa Iván E, *et al.*, 2001).

Las cadherinas fueron nombradas de acuerdo al tipo de células que las expresan: E-cadherina se encuentra en células epiteliales, la N-cadherina en tejido neural, y la P-cadherina en placenta (Gumbiner BM, 1996).

La región citoplasmática (extremo carboxilo terminal) de las cadherinas está conectada al citoesqueleto de actina mediante proteínas de la familia de cateninas. Los complejos cadherina-catenina, además de favorecer la fuerte adhesión entre células, están involucrados en la generación de señales que regulan la proliferación y migración (Guilford P., 1999). Existe evidencia que indica que las alteraciones en los com-



Siendo la mayoría de las neoplasias de origen epitelial, los cambios de expresión y funcionalidad de la E-cadherina han sido los más reportados. Se ha postulado que la adhesión mediada por E-cadherina actúa como un sistema que suprime la invasión; por ello se prevee que la reducción en la expresión de esta molécula aumenta la capacidad metastásica (Velasco-Velazquez, *et al.*, 2000).

La expresión de E-cadherina es menor en las metástasis que en los tumores primarios, en todos los tipos histológicos con excepción del adenocarcinoma; esto puede indicar que los mecanismos celulares que favorecen la progresión son diferentes en el adenocarcinoma (Bohm M., *et al.*, 1994; Shibamura H., 1998).

La pérdida de la expresión de E-cadherina, precede a la disminución de la expresión de β -catenina (Toyoyama H, *et al.*, 1999); esta reducción en la expresión también se asocia con un aumento en la invasión local y con el estado patológico (Shibamura H, *et al.*, 1998). En un estudio con muestras de carcinomas de células no pequeñas de pulmón se encontró que los niveles de expresión de β -catenina también se correlacionaban con los de E-cadherina. La baja expresión de β -catenina se asocia a la presencia de metástasis y a un pronóstico desfavorable (Retera JM., *et al.*, 1998).

Utilizando modelos murinos, se ha demostrado que las células tumorales con baja expresión de E-cadherina y β -catenina incrementan su capacidad de penetrar a la circulación vascular y de generar metástasis (Akimoto T, *et al.*, 1999). También, la expresión reducida de E-cadherina en el carcinoma de mama es un indicador de baja supervivencia (Charpin C., *et al.*, 1998). Por otro lado, en el carcinoma colorrectal y gástrico se ha demostrado que una expresión reducida de E-cadherina y β -catenina se relaciona con el aumento del potencial invasor de las células tumorales (Hebbar M, *et al.*, 1998).

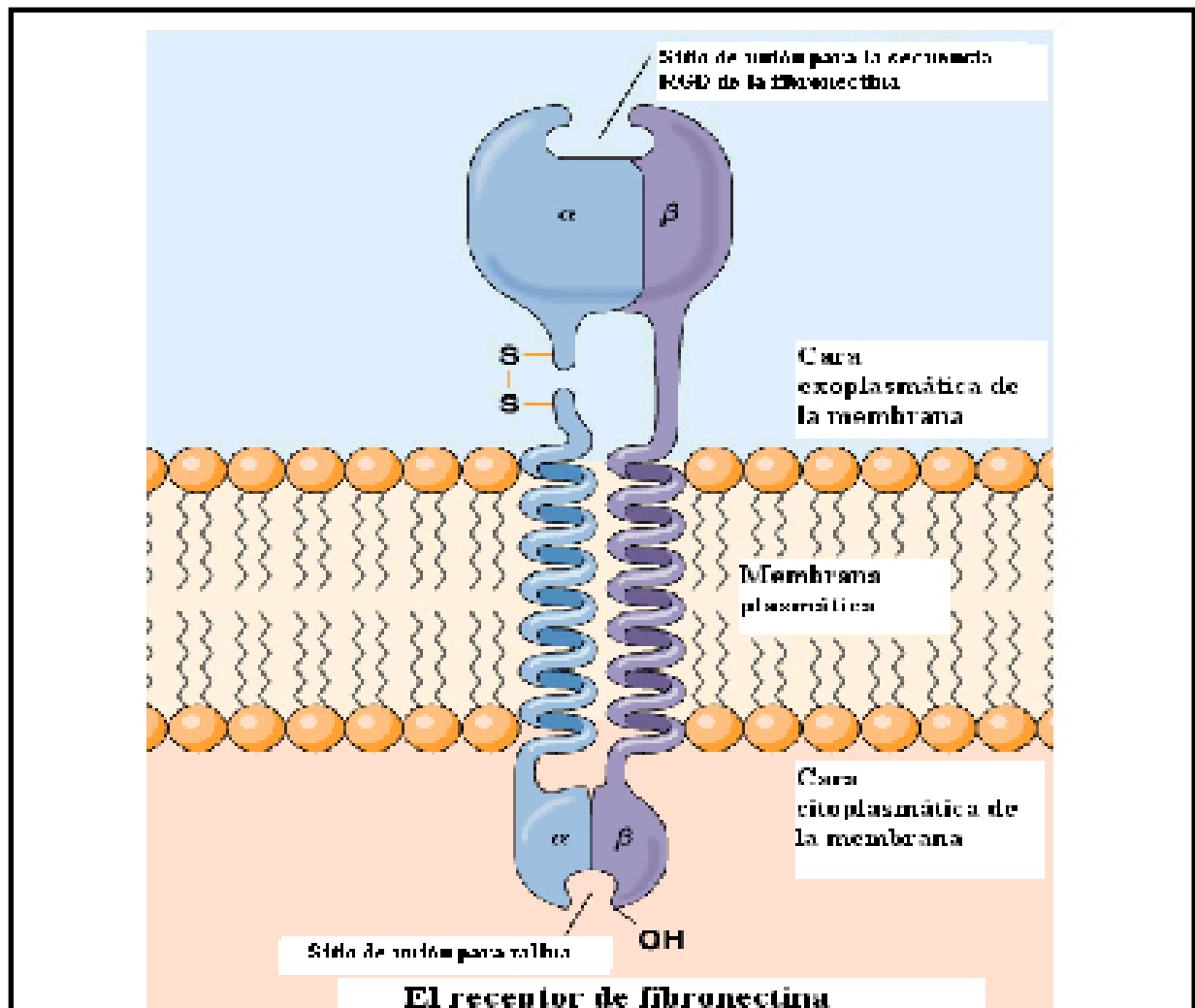
En base a todas estas observaciones, es posible afirmar que la supresión de la expresión de E-cadherina es uno de los principales eventos moleculares responsables de la disfunción en la adhesión célula-célula. La mayoría de los tumores tienen una arquitectura celular anormal, y pierden la integridad tisular lo cual puede dirigir la invasión local. Así, la pérdida de función de la proteína supresora de tumor E-cadherina se correlaciona con un incremento de la invasividad y metástasis tumoral, por lo cual el gen que la codifica es referido como un gen «supresor de la invasión» (Bussemakers MJG., *et al.*, 1994).

4.4.2. Integrinas:

Las integrinas constituyen una familia de glicoproteínas de superficie que funcionan como receptores a moléculas de MEC o como moléculas de adhesión célula-célula. Estos receptores están formados por dos subunidades transmembrana, una subunidad α y una subunidad β . La unión entre ambas subunidades es de tipo no covalente (Roa Iván E, *et al.*, 2001).

Las integrinas participan en la agregación plaquetaria, inflamación, reacción y respuesta inmune, cicatrización de heridas y en la patogénesis de las metástasis tumorales (Pignatelli M, et al., 1994; Tang DG, Honn KV, 1994-1995; Miyasaka M., 1995).

Originalmente clasificadas como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, en la actualidad se ha demostrado que existen al menos ocho cadenas α , dieciseis cadenas β , y por lo menos, veintidos heterodímeros (Hynes RO., 1992; Imhof BA, et al., 1995). La especificidad del ligando es el resultado de la combinación de los dominios extracelulares de ambas cadenas. La mayoría de las integrinas reconocen moléculas de MEC como laminina, colágeno, fibronectina o vitronectina; la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) contenida en estas moléculas se ha identificado como uno de los sitios de unión a integrinas (Ruoslahti E, 1996). Otras integrinas (sobre todos las $\alpha 2$) pueden participar en la adhesión célula-célula, reconociendo moléculas de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Como reguladoras de la adhesión, las integrinas participan en varias etapas del proceso de metástasis (Velasco-Velazquez MA., et al., 1999).



La adhesión entre las células y la matriz esta mediada esencialmente por las integrinas: son las principales clases de moléculas de adhesión celular que interaccionan entre la célula y la matriz (aunque las selectinas y proteoglicanos también intervienen en la fijación). Las integrinas están compuestas por dos subunidades diferentes (heterodímeros) que toman el nombre de alfa (con 16 tipos diferentes) y beta (con ocho tipos diferentes), lo cual permite un gran número de combinaciones. Aquí se muestra el receptor de fibronectina ($\alpha 5\alpha 1$), el cual tiene un sitio de unión a fibronectina en la cara explasmática de la membrana, y un sitio de unión a talina en la cara citoplasmática de la membrana. En ésta y otras integrinas, la subunidad alfa está dividida en dos segmentos que se mantienen juntos por una unión bisulfuro.

La alteración de la expresión de integrinas ha sido demostrada en algunas neoplasias epiteliales como el carcinoma de piel (Van Duinen CM., *et al.*, 1994), ovario (Cannistra SA., *et al.*, 1995), mama (Zutter MM., *et al.*, 1995), colon (Agrez MV., *et al.*, 1994), etc.

El nivel de expresión de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ (receptor de fibronectina) ha mostrado ser de valor pronóstico en diferentes tipos de neoplasias; en general, se acepta que la pérdida de esta integrina está asociada con un alto riesgo de recurrencia y con la disminución en la supervivencia de los pacientes, por lo que el gen que codifica para este receptor ha sido considerado como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios recientes en pacientes con melanomas malignos sugieren que la sobreexpresión de este gen se correlaciona con la progresión tumoral. También en otros tipos de cáncer se ha asociado esta sobreexpresión con un fenotipo maligno. Por lo tanto, estos resultados son contradictorios con resultados previos en los cuales se encontró que el receptor $\alpha 5 \beta 1$ juega un rol importante en la supresión tumoral (Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M., 2000). Estas discordancias dificultan la identificación de los mecanismos por los cuales el receptor de fibronectina participa en el curso de la enfermedad (Velasco- Velazquez, *et al.*, 2000).

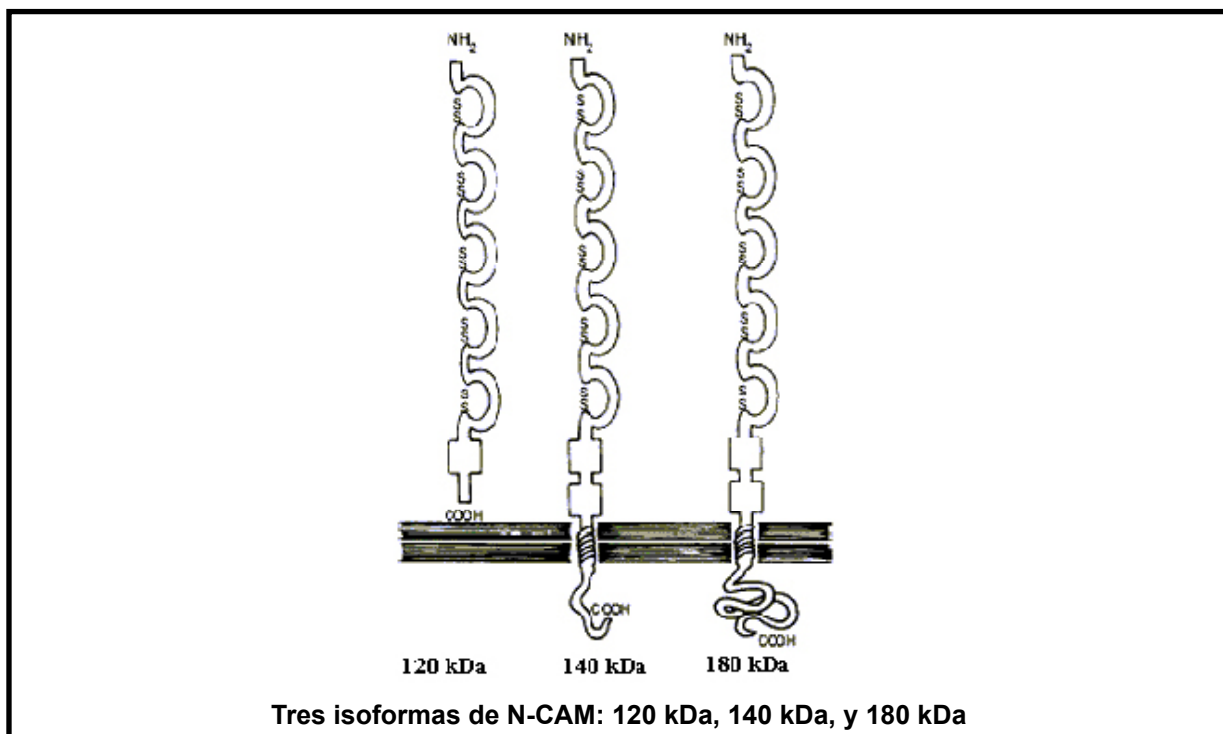
4.4.3. Superfamilia de Inmunoglobulinas:

Los receptores adhesivos de esta superfamilia son glicoproteínas que se caracterizan por contener en su porción extracelular, múltiples dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas. Fisiológicamente, estas moléculas participan en las interacciones célula-célula, ya sea manteniendo unidas a células de igual o distinta estirpe. En general, los cambios en la expresión de estas moléculas durante la oncogénesis pueden favorecer la formación de grandes agregados celulares y/o interferir en la adhesión de células tumorales con leucocitos, alterando la respuesta inmune (Velasco- Velazquez, *et al.*, 2000).

Entre las moléculas más importantes de esta familia se encuentran la N-CAM, e I-CAM (Roa Iván E, *et al.*, 2001).

La molécula de adhesión de células neurales (N-CAM) es mediadora de la adhesión homotípica, manteniendo unidas células que expresan N-CAM (Velasco- Velazquez, *et al.*, 2000). Existen varias isoformas de esta molécula, producidas por «splicing» alternativo a partir de un mismo gen; las principales son las de 180 kDa, 140kDa (ambas transmembranales) y 120 kDa (soluble).

Kibeelaar y colaboradores, investigaron la expresión de N-CAM en carcinomas de pulmón resecados quirúrgicamente mediante el uso de anticuerpos que reconocen diferentes epitopes de N-CAM. Sólo el 20% de los carcinomas de pulmón de células no pequeñas expresaron N-CAM, y el tiempo de supervivencia fue menor en pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas N-CAM positivos que en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas N-CAM negativos (Kibeelaar RE, *et al.*, 1991). Casi todos los carcinomas de células pequeñas expresan N-CAM, por lo que esta molécula se ha propuesto como marcador diagnóstico (Ledermann JA, *et al.*, 1994).



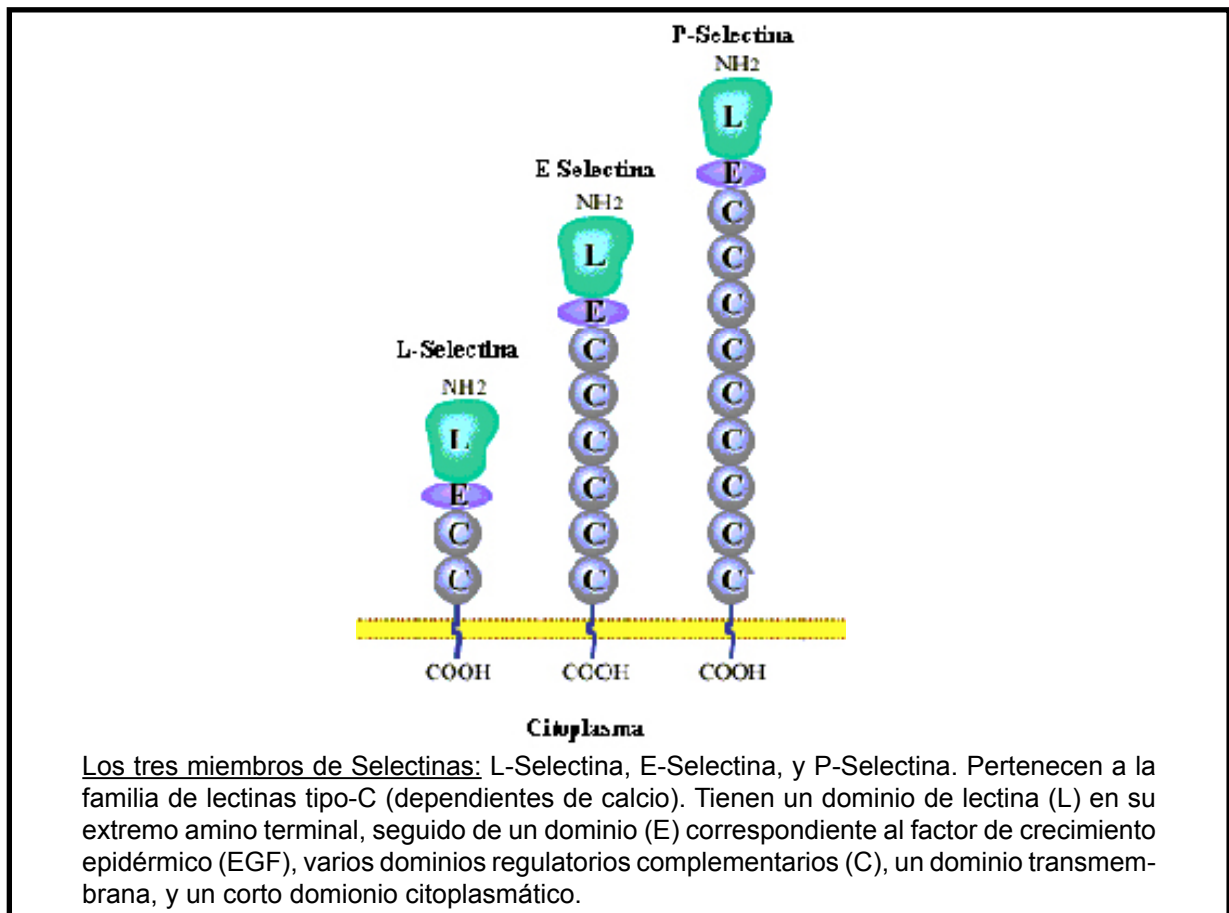
La molécula de adhesión intercelular 1, ICAM-1, se expresa en diferentes tipos de células, como linfocitos B, linfocitos T, fibroblastos, keratinocitos, y células endoteliales.

En las neoplasias pulmonares la expresión de ICAM-1 depende del tipo histológico. En estudios *in vitro* con diferentes líneas celulares se ha reportado que en las líneas provenientes de carcinomas epidermoides y de carcinomas de células grandes –ambos cánceres de pulmón de células no pequeñas- se expresa ICAM-1 en su superficie, mientras que en las líneas provenientes de carcinomas de células pequeñas no se expresa este receptor (Schardt C., *et al.*, 1993; Melis M, *et al.*, 1996). Aparentemente, la disminución en la expresión de ICAM-1 favorece el proceso de metástasis. Esto explica parcialmente, la sobrevida mayor en los pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Passlick B., *et al.*, 1996).

Una forma soluble de ICAM-1 (sICAM-1) ha sido identificada en el suero de sujetos sanos. En diversos estudios se ha analizado la expresión de sICAM-1 en sujetos con neoplasias pulmonares; en todos los casos se han encontrado niveles de expresión significativamente más altos en pacientes que en los controles sanos (Sprenger A, *et al.*, 1997; Taguchi O, *et al.*, 1997). En pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la concentración sérica de sICAM-1 con: a) el tamaño del tumor primario; (Osaki T, 1996) b) la etapa clínica; (Taguchi O, *et al.*, 1997; De Vita F, *et al.*, 1998) y c) el potencial metastásico (Grothey A., *et al.*, 1998). Melis y colaboradores, investigaron la actividad biológica de ICAM-1 soluble en fluidos del compartimiento pleural en pacientes con cáncer. Los resultados mostraron que ICAM-1 es liberada preferentemente de la superficie celular antes de ser sintetizada *de novo*. La expresión de sICAM-1 es regulada por macrófagos que liberan ICAM-1 vía un mecanismo dependiente del TNF α . Además, ICAM-1 mostró tener un rol clave en la inmunosupresión, al inhibir la adhesión de linfocitos citotóxicos y células tumorales (Melis M, Pace Elisabetta, Siena Liboria, Spatafora Mario, Tipa Annalisa, Profita Mirella, Bonanno Anna, Vignola Antonio M., Bonsignore Giovanni, Mody Christopher H. and Gjomarkaj Mark, 2003).

4.4.4. Selectinas:

Presentan una estructura unitaria homóloga con las inmunoglobulinas. Median las interacciones heterotípicas entre células endoteliales y leucocitos, lo cual se requiere para la extravasación al tejido blanco durante el proceso inflamatorio. La familia de Selectinas consta de 3 miembros: E-Selectina, L-Selectina, y P-Selectina (Roa Iván E, *et al.*, 2001).



Las E-Selectinas son inducibles en el endotelio vascular bajo estimulación de citoquinas. Las L-Selectinas son expresadas en casi todos los leucocitos. Las P-Selectinas si bien, se encontraron originalmente en plaquetas activadas, su expresión es también inducida en el endotelio vascular. Las P-Selectinas son almacenadas como proteínas transmembrana preformadas en gránulos citoplasmáticos, y ellas son translocadas a la superficie celular bajo estimulación. Los ligandos para L-Selectinas se encuentran en las células endoteliales mientras que los ligandos para E- y P-selectinas se hallan en los leucocitos (Imai Y, *et al.*, 1991).

La E-Selectina participa en la adhesión de las células de cáncer de colon al endotelio vascular. Los vasos sanguíneos de los márgenes de las lesiones tumorales invasoras expresan E-Selectina y P-Selectina, como así también I-CAM1 (Brummer J., *et al.*, 1995).

Un aumento en los niveles séricos de E-Selectina guarda relación con un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama (Hebbar M., *et al.*, 1999), así como también en el cáncer pulmonar de células pequeñas (Tsumatori G, *et al.*, 1999).

4.5. Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. También participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares (Schmit A, Hall MN. 1998; Small JV, Rother K, Kaverina I. 1999). Está involucrado en la regulación de la forma, la motilidad y la adhesión celular, por lo que alteraciones en su función contribuyen a la transformación maligna. Interacciona tanto con moléculas intracelulares como con los receptores de adhesión, conectando así el microambiente externo con el interior de la célula. Se sabe que los cambios en el citoesqueleto pueden modular la actividad de los receptores de adhesión y de otros oncogenes, y viceversa, participando de esta manera, en la progresión tumoral (Velasco-Velazquez, *et al.*, 2000).

En las células normales los microfilamentos de actina son muy estables, y por lo tanto, las células tienen muy poco movimiento; en las células cancerosas la desorganización del citoesqueleto de actina impide la formación de contactos célula-célula y facilita la migración. Entre las anomalías en el cáncer de pulmón también se encuentran cambios en el citoesqueleto y en las proteínas asociadas a éste. Desde hace dos décadas se sabe que los carcinomas pulmonares metastásicos tienen un nivel de actina polimerizada (F-actina) disminuido y un decremento en la integridad del citoesqueleto (Bernal S, Baylin S, Shaper J, Gazdar A, Chen L, 1983).

Las relaciones y funciones de la actina del citoesqueleto son moduladas por vías de señalización que responden a estímulos que inciden sobre la membrana plasmática, especialmente sobre receptores de proteínas tirosina kinasa que activan a Ras. La superfamilia de proteínas Ras, dentro de las cuales se incluye la familia de proteínas Rho, son componentes de las vías de señalización. Algunas de las proteínas de esta superfamilia o de sus reguladores resultan ser oncogénicas, y de hecho, las mutaciones o la sobreexpresión de estas se hallan implicadas en diferentes tipos de cáncer (Khorravi-Far R, Campbel S, Rossman KL, Der CJ., 1998).

4.6. Proteasas

4.6.1. Importancia en la invasión tumoral y clasificación

La degradación de la MEC y la migración de la célula tumoral son eventos complejos que requieren la producción, liberación y activación de una variedad de enzimas degradantes de la MEC. Se ha encontrado que existe una sobreexpresión de esas enzimas en casi todas las células del microambiente hospedador-tumor (Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J. 1985; Plow EF, Miles LA., 1990).

Para que tome lugar el proceso de invasión, es necesario que ocurra no sólo una exagerada producción de enzimas por parte de las células tumorales y de las células de los tejidos adyacentes, sino que también se requiere una extensa lisis de los componentes de la MEC. De modo que la célula tumoral invasora usa la proteólisis en una forma altamente organizada, espacial y temporalmente (He CS, Wilhem SM, Pentland AP, 1989).

La degradación tisular observada en procesos normales y en ciertas enfermedades es similar a la que ocurre en el cáncer. Sin embargo, las células tumorales pueden además: 1) inducir la producción de proteasas en células vecinas, a través de la secreción de citoquinas y/o factores de crecimiento, y también inducir la producción de sustratos para las proteasas, como las formas latentes de TGF- β las cuales pueden ser activadas proteolíticamente por MMP-2 y MMP-9 (Yu Q, *et al.*, 2000; Whitelock JM, *et al.*, 1996), 2) producir y secretar ellas mismas sus proteasas, o bien 3) producir factores que pueden inhibir o activar proteasas presentes localmente (DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell B., 1989).

Las proteasas se agrupan en cuatro familias:

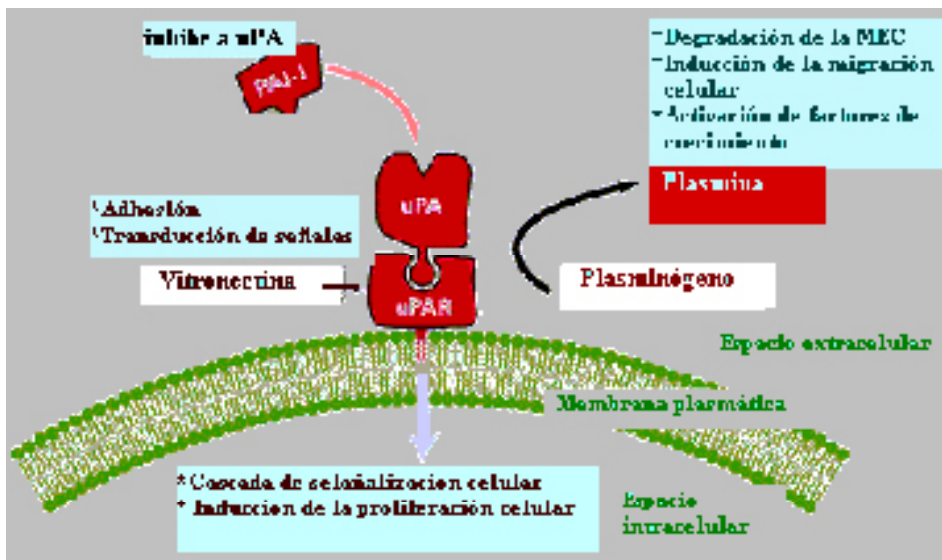
1. **Serinoproteasas:**

Dentro de este grupo de enzimas proteolíticas se encuentran los activadores del plasminógeno, que convierten el plasminógeno en plasmina y desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación. El sistema de la activación del plasminógeno es, además, un complejo sistema de cascada proteolítica que, junto a otros sistemas enzimáticos, participa en la degradación de la MEC durante los procesos de remodelación tisular en condiciones normales y patológicas, incluyendo la invasión cancerosa (Dano K, *et al.*, 1985). Hasta el momento, se han descrito dos tipos genética e inmunológicamente diferentes de estas enzimas: el tipo urokinasa -uPA- (Urokinase-type plasminogen activator) y el tipo tisular -tPA- (Tissue plasminogen activator) (Saksela O, *et al.*, 1988).

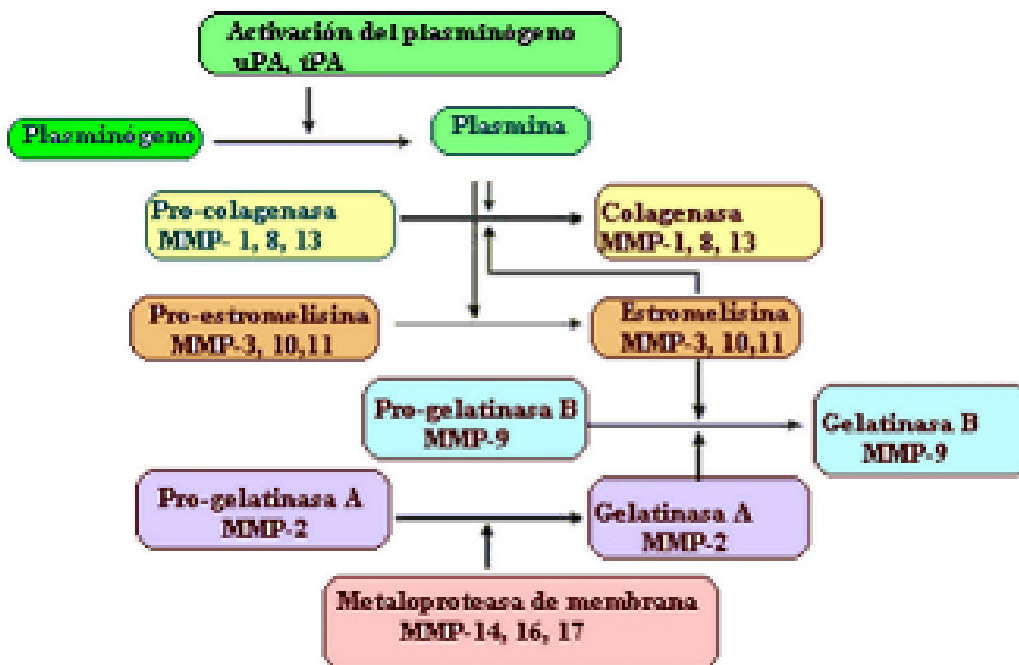
El uPA es una enzima que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina activa (Duffy MJ, 1993). La plasmina, una proteinasa neutra de amplia especificidad, tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores de la superficie de las células tumorales (Miles LA, Plow EF, 1988) y desarrolla una amplia actividad fibrinolítica catalizando la degradación de diferentes componentes de la MEC incluyendo fibrina, fibronectina, colágeno tipo IV, vitronectina y laminina (Gravilovicc J, *et al.*, 1989). También se ha demostrado que la plasmina puede activar otras enzimas proteolíticas, conduciendo a una amplificación de la reacción. Así pues, como resultado de la activación del uPA se produce la ruptura de una amplia variedad de proteínas de la MEC (Saksela O, Rifkin DB., 1988).

El uPA se sintetiza y secreta por una amplia variedad de células tumorales y estromales en forma de una proenzima inactiva (pro-uPA) que se une a receptores específicos de la superficie de las células tumorales (Dano K, *et al.*, 1985). Tras esa unión, la proenzima puede ser activada por la plasmina y otras enzimas como la calicreína (Ichinose A, *et al.*, 1986) o las catepsinas B y L (Kobayashi H, *et al.*, 1991). De este modo, los receptores del uPA también son un componente esencial de la migración de la célula tumoral, ya que permiten la regulación continua de la actividad proteolítica en los contactos celulares mediante las diferentes localizaciones de uPA y sus inhibidores (Mangel WF, 1990).

Diversos estudios sugieren que el uPA puede desempeñar un papel relevante en la progresión de diversos carcinomas humanos. Además, los valores intratumorales elevados de uPA han sido asociados con una menor supervivencia de pacientes afectados de cáncer de mama (Foekens JA, *et al.*, 1992), colorrectal (Mulcahy *et al.*, 1994), gástrico (Nekarda H, *et al.*, 1994), pulmonar (Pedersen H *et al.*, 1994), vejiga urinaria (Hasui Y, *et al.*, 1992) y gliomas (Hsu Dw, *et al.*, 1995). Sin embargo, la actividad resultante del uPA dependerá, en gran medida, del equilibrio con su inhibidor natural específico PAI-1 (plasminogen activator inhibitors) también producido por las células tumorales. Se ha observado además, que los valores intratumorales del receptor específico para la enzima también tienen importancia en el proceso de invasión tumoral (Reuning U, *et al.*, 1998). En este mismo sentido, se destacan los estudios clínicos que demuestran la significación pronóstica de los inhibidores de los activadores del plasminógeno -PAI- (plasminogen activator inhibitor). Así, en relación con el inhibidor del uPA (PAI-1) se ha descrito que, sorprendentemente, los valores elevados del mismo están asociados con un pronóstico adverso en el cáncer de mama (Jänicke F, *et al.*, 1991) y en el de cérvix uterino (Kobayashi H, *et al.*, 1994). Por el contrario, se ha señalado que los valores elevados del inhibidor del tPA (PAI-2) están asociados a un pronóstico favorable en el cáncer de mama (Foekens JA, *et al.*, 1994). Aunque estos datos pueden resultar desconcertantes, se debe considerar, que cada vez resultan más los efectos asignados a los inhibidores de las enzimas proteolíticas en la patología tumoral. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el PAI-1 también desempeña un papel importante en la promoción de la angiogénesis, proceso que está ampliamente considerado como un factor de pronóstico adverso de los tumores (Montesano R, *et al.*, 1990). Además, también se considera que la excesiva liberación del PAI-1 podría ser importante para la reimplantación de las células tumorales circulantes, teniendo en cuenta que la formación del nuevo estroma en el lugar de las metástasis, requiere el bloqueo temporal de la degradación de la MEC ocasionado por el uPA



El receptor de uPA, uPAR, está anclado en la membrana plasmática de una amplia variedad de células, incluyendo las células tumorales. El uPA es secretado por células normales y tumorales, uniéndose con alta especificidad al uPAR. Esta unión activa al uPA y centraliza la actividad proteolítica en la superficie celular donde el plasminógeno es convertido a plasmina. Los componentes de la matriz extracelular son degradados por la plasmina, facilitando la migración y metástasis. El uPA y la plasmina también activan directamente algunos factores de crecimiento, ejerciendo un efecto mitogénico. La vitronectina interactúa con el uPAR, dirigiendo la activación de una cascada de señales intracelulares las cuales inducen



Cascada proteolítica que involucra a miembros de la familia de MMPs. Debido a que las MMPs son generadas como proenzimas, el clivaje por proteasas activadoras es requerido para producir la enzima activa. Las cascadas proteolíticas involucran MMPs río arriba y río abajo, formando una red compleja, en la cual están presentes varios puntos regulatorios.

1. Cisteínopterasas:

Son proteasas dependientes de cisteína, como la catepsina B y L. Ambas participan en la invasión y metástasis (Chauhan SS, Goldstein LJ., 1991).

La catepsina B pese a ser una enzima lisosomal, ha sido encontrada en la membrana plasmática de las células tumorales y en el medio condicionado de líneas celulares cultivadas *in vitro* (Sloane BF, Hohn KV., 1982). La catepsina B no solamente es importante debido a su capacidad para degradar proteínas de la MEC, sino porque tiene además la capacidad de convertir tanto el pro-uPA inactivo como al complejo uPA - uPAR, en un uPA enzimáticamente activo en células tumorales.

Por su parte, la catepsina L tiene una alta capacidad para degradar las proteínas de la MEC, como el colágeno, laminina y elastina (Chauhan SS, Goldstein LJ, 1991). Sin embargo, su actividad proteolítica es más alta que la de la catepsina B, pues esta enzima tiene también la capacidad de activar al pro-uPA (Goretzki L. SchmittM., 1992).

2. Asparticoproteasas:

Son proteasas dependientes de aspartato, como la catepsina D que es una enzima lisosomal (Rocheffort H, *et al.*, 1990). Estudios *in vitro* realizados por Johnson y colaboradores (1993), han mostrado una correlación entre los niveles de catepsina D y la conducta invasiva de algunas líneas celulares de mama. También se ha hallado que la sobreexpresión de la catepsina D puede estimular la proliferación celular en focos de micrometástasis en ratones (Liaudet E, Derocq., 1995). Los estudios experimentales sugieren que la catepsina D puede facilitar el crecimiento de las células tumorales en sitios distantes a través de: 1) la inactivación de inhibidores de crecimiento, 2) activación de factores de crecimiento, o 3) a través de su interacción con receptores para factores de crecimiento (García M., 1996).

3. Metaloproteasas:

Denominadas también metaloproteasas de matriz (MMPs), son un grupo de enzimas dependientes de zinc que degradan moléculas de la MEC, proteoglicanos, glucoproteínas y varios tipos de colágeno (Okada A, Bellocq JP, Rouyer N., 1995).

Las metaloproteasas son producidas por una gran variedad de células y son secretadas en una forma inactiva (pro-metaloproteasas) (Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH., 1984). Originariamente, las MMPs fueron consideradas importantes casi exclusivamente en la invasión y metástasis; sin embargo, estudios recientes revelaron que las MMPs están involucradas en varios pasos de la progresión tumoral del cáncer. Estas enzimas y sus mecanismos de acción -degradación de proteínas- regulan varios comportamientos de relevancia en la biología del cáncer como crecimiento de células tumorales, diferenciación, apoptosis, migración e invasión, regulación de la angiogénesis tumoral y vigilancia inmune (Egeblad M., Werb Z, 2002).

Por su importancia en la progresión tumoral, sus características serán explicadas en el siguiente apartado.

4.6.2. La familia de metaloproteasas de matriz (MMPs)

Más de 21 MMPs humanas y sus homólogas en otras especies, pueden clivar cualquier componente de la MEC. Históricamente fueron divididas en colagenasas, gelatinasas, estromelisin y matrilisinas en base a su especificidad por los componentes de la MEC. Sin embargo, como la lista de sustratos de MMPs ha crecido, se ha adoptado para su denominación un sistema secuencial de numeración, y las MMPs son ahora agrupadas de acuerdo a su estructura (Egeblad M, Werb Z, 2002).

Existen ocho clases estructurales diferentes de MMPs: cinco son secretadas y tres son MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) (Egeblad M., Werb Z, 2002). Estas están covalentemente unidas a la membrana celular, sin embargo las MMPs secretadas, también pueden localizarse en la superficie celular uniéndose a integrinas (Brooks, PC *et al.*, 1996) o al receptor CD44 (Yu, Q & Stamenkovic I., 2002), o a través de interacciones con la superficie celular asociándose a proteoglicanos heparan sulfato, colágeno tipo IV o al inductor de MMPs (EMMPRIN) el cual puede estimular la síntesis de MMPs en fibroblastos (Stemlich

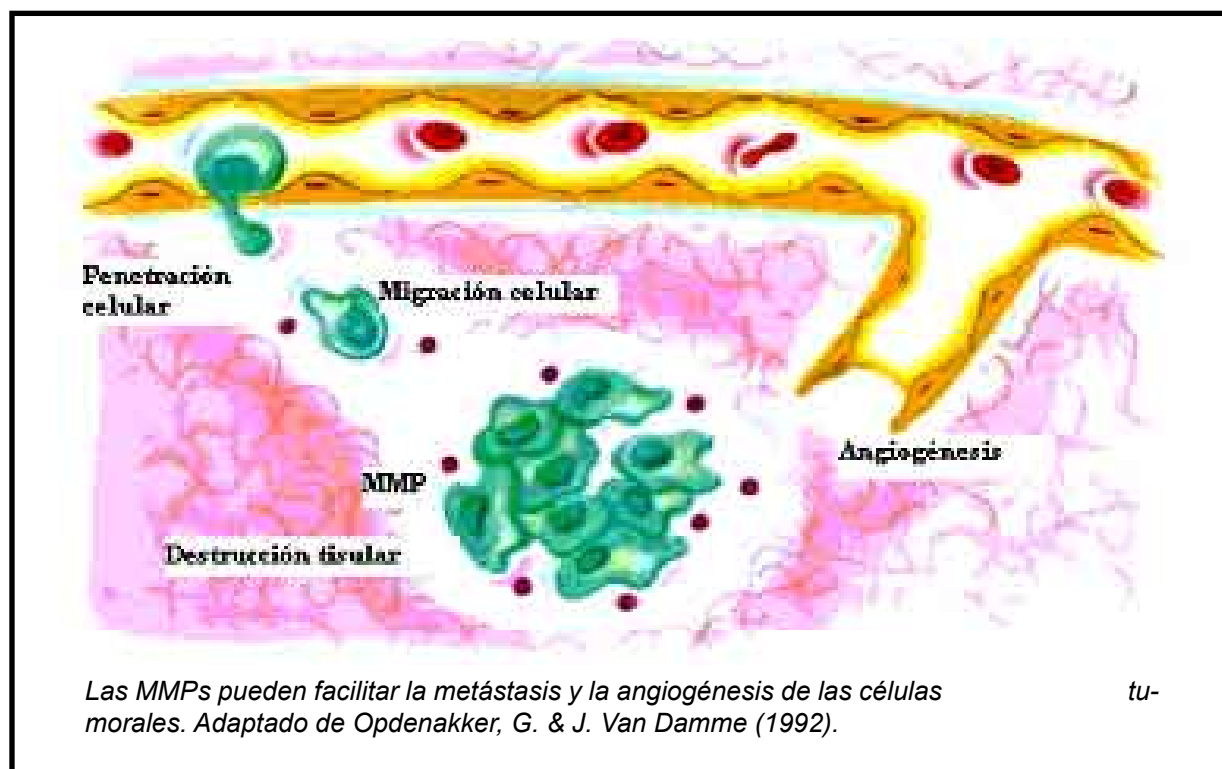
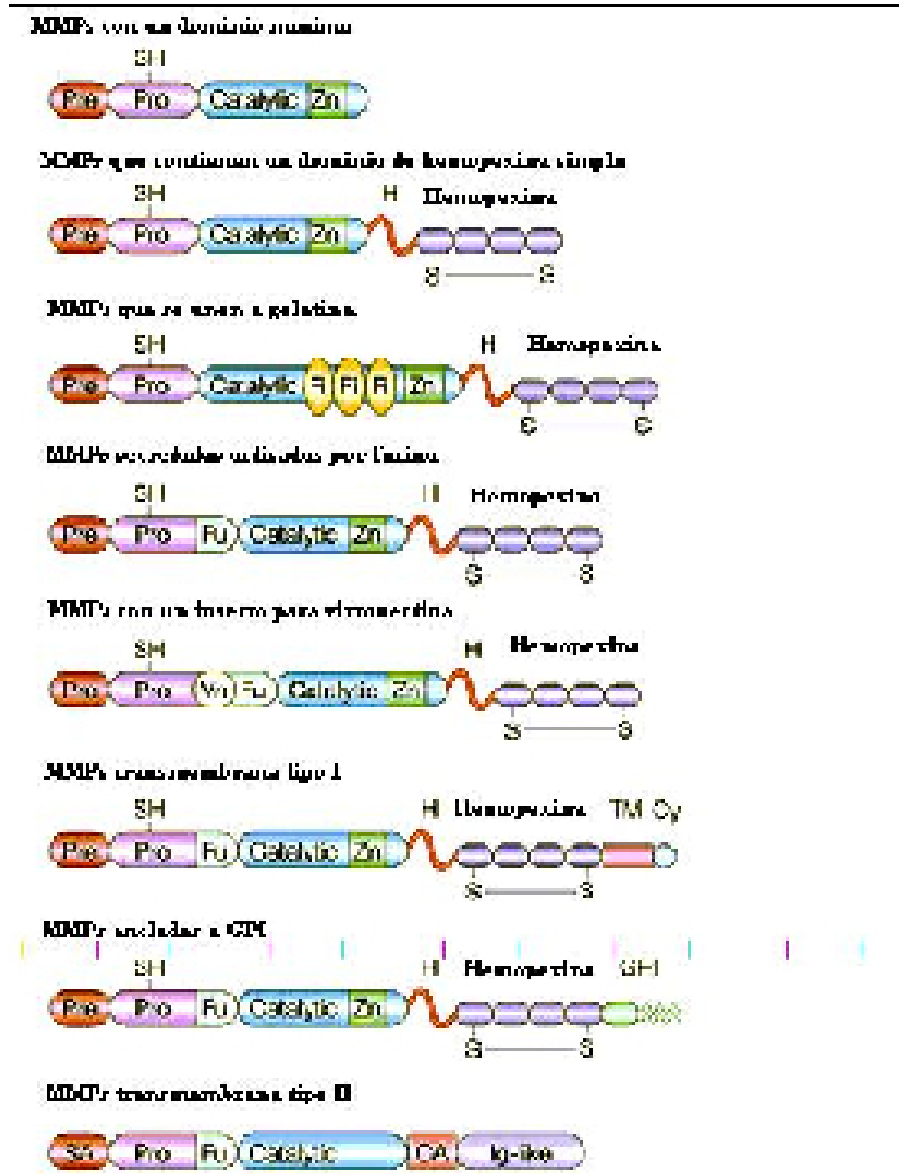


Tabla I. Clasificación de las MMPs en base a su estructura

Enzima	Clasificación Numérica N°	Pseudónimos	Peso Molecular (latente/activa)	Sustratos de colágeno	Sustratos adicionales
MMP-1	3.4.24.7	Colagenasa-1, Colagenasa intersiticial, Colagenasa tisular	55000/45000	I, II, III, VII, VIII, X	Aggrecan, gelatina, MMP-2 y 9
MMP-2	3.4.24.24	Gelatinasa de 72kDa Gelatinasa A	72000/66000	I, II, III, IV, V, VII, X, XI	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-9 y 13
MMP-3	3.4.24.17	Procolagenasa Estromelisin-1	57000/45000	II, III, IV, IX, X, XI	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-7, 8 y 13
MMP-7	3.4.24.33	Matrilisina, Proteasa PUMP-1 Metaloproteasa uterina	28000/19000	IV, X	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-2 y 9
MMP-8	3.4.24.34	Colagenasa-2, Colagenasa neutrofílica, Colagenasa PMNL	75000/58000	I, II, III, V, VII, VIII, X	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina
MMP-9	3.4.24.25	Gelatinasa de 92 kDa Gelatinasa B	92000/86000	IV, V, VII, X, XIV	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina
MMP-10	3.4.24.22	Estromelisin-2 Transina-2	57000/44000	III, IV, V	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-1 y 8
MMP-11		Estromelisin-3	51000/44000		Aggrecan, Fibronectina, Laminina

MMP-12	3.4.24.65	Metaloproteasa macofágica, MME, HME	54000/45000 y 22000	IV	Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina
MMP-13		Colagenasa-3	60000/48000	I, II, III, IV	Aggrecan, Gelatina
MMP-18		Colagenasa- IV de Xenopus	70000/53000		
MMP-19		Estromelisinina-IVRASI	54000/45000		Fibronectina, Aggrecan, Laminina,
MMP-20		Enamelisina	54000/22000		Aggrecan, Amelogenina
MMP-23		CA-MMP			
MMP-26		Matrilisina-2	28000/19000	IV	Gelatina, Fibronectina
MMP-28		Epylisina			
MT1-MMP		MMP-14, Metaloproteasa tipo membrana-14	66000/56000	I, II, III	Aggrecan, Elastina, Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-2 y 13
MT2-MMP		MMP-15 Metaloproteasa tipo membrana-15	72000/60000		Fibronectina, Gelatina, Laminina, MMP-2
MT3-MMP		MMP-16 Metaloproteasa tipo membrana-16	64000/52000		MMP-2
MT4-MMP		MMP-17 Metaloproteasa tipo membrana-17	57000/53000		Fibrina, Gelatina
MT5-MMP		MMP-24	- / 62000		
MT6-MMP		MMP-25, Leucolisina		IV	Gelatina, Fibronectina, Laminina-1

**Estructura proteica de las MMPs
(Egeblad & Werb, 2002)**



Las MMPs pueden ser divididas dentro de ocho grupos estructurales diferentes, cinco de los cuales son MMPs secretadas y tres son MMPs tipo membrana (MT-MMPs). Las MMPs secretadas incluyen: MMPs con un dominio mínimo, MMPs que contienen un dominio de hemopexina simple, MMPs que se unen a gelatina, MMPs secretadas activadas por furina, MMPs con un inserto para vitronectina, mientras que las MMPs unidas a membrana incluyen MMPs transmembrana tipo I, MMPs unidas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y MMPs transmembrana tipo II (Egeblad & Werb, 2002).

4.6.2.1. Regulación y activación de las MMPs

En la actualidad, se sabe que las MMPs tienen diferentes sitios de regulación: a) a nivel transcripcional, a través de factores de crecimiento y citocinas (Birkedal-Hansen H, Moore WG, 1993), b) a nivel post transcripcional, por cambios en la estabilidad del ARNm (Schontal A, Herlich P, Rahmsdorf HJ., 1988), y c) a nivel post traduccional, a través de la activación de la forma latente secretada. Asimismo, pueden también ser inhibidas por sustancias endógenas conocidas como inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) (Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ., 1993).

La regulación transcripcional es el punto de control más importante para determinar la expresión de la metaloproteasa latente. Sin embargo, los mecanismos reguladores extracelulares pueden finalmente controlar el nivel de actividad en términos de degradación de MEC. Con frecuencia, la activación de la enzima se lleva a cabo por una activación autocatalítica que da lugar a la pérdida de un péptido amino terminal (Browner MF, Smith WW, Castelahn AL., 1995).

Las MMPs pueden ser activadas *in vitro* por diversos agentes entre ellos los detergentes, los compuestos organomercuriales y las enzimas proteolíticas como plasmina, tripsina, calicreína y estromelina. Independientemente de cuál sea el agente activador, éste debe ser capaz de inducir un cambio conformacional en la molécula de la proenzima para que puedan interactuar con la molécula de zinc. Esta interacción finalmente activa a la proenzima (Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R., 1981).

4.6.2.2. Sustratos de las MMPs

El clivaje de componentes de la MEC por MMPs puede generar fragmentos con nuevas funciones, por ejemplo el clivaje de laminina-5 y colágeno tipo IV da lugar a la exposición de sitios críticos que promueven la migración (Xu, J *et al.*, 2001).

Las MMPs también pueden tener como sustratos receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular. Por ejemplo, el receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1) es clivado por la MMP-2 (Levi *et al.*, 1996). Los dominios extracelulares de los receptores son liberados, y pueden funcionar como receptores señuelos para sus respectivos ligandos (Egeblad, Werb, 2002). El clivaje de E-cadherina y CD44 produce la liberación de los fragmentos de los dominios extracelulares de estas moléculas de adhesión, y como consecuencia se produce un aumento del comportamiento invasivo. Por su parte, el clivaje de la subunidad α_v de la integrina por la MMP-14 aumenta la migración de las células tumorales (Deryugina, Ratnikox, Postnova, Rosanov & Strongin, 2001).

Finalmente, las MMPs clivan y activan sus propias formas inactivas, y también clivan otras MMPs e inhibidores de proteasas como las serpinas (Stemlich M D & Werb Z, 2001).

4.6.2.3. Sistema de inhibición de las MMPs

La función de las MMPs es regulada por inhibidores de metaloproteasas presentes naturalmente en el microambiente celular, los denominados inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) (Tanaka K, Iwamoto Y. 1995). Estos inhiben específicamente formas activas de MMPs, y en algunos casos, formas latentes de MMPs. Cualquier alteración en este balance puede conducir a situaciones patológicas en los tejidos. Las MMPs activas también pueden ser inactivadas por α -macroglobulinas, particularmente la α -2macroglobulina (Sottrup-Jensen, 1989).

Los TIMPs son moléculas producidas por las mismas células que sintetizan las MMPs o por células vecinas, hecho que permite controlar la proteólisis pericelular en situaciones normales. La familia de inhibidores de MMPs incluye: el TIMP-1, el TIMP-2, el TIMP-3 y el TIMP-4; todos ellos tienen una amplia especificidad para inhibir MMPs (Taylor KB, Windsor LJ, Caterina NCM, 1996). Actualmente, a los dos primeros se los ha asociado con la invasión y metástasis en el cáncer. Los inhibidores tisulares se unen con alta afinidad en una relación molar 1:1 a MMPs activas, con lo que originan una pérdida de la actividad proteolítica (Will H, Atkinson SJ, Butler G, 1996).

El papel de los TIMPs en los procesos de invasión y metástasis aún no es claro, ya que en algunos estudios experimentales los TIMPs favorecen la progresión del cáncer: TIMP-1 y -2 pueden inhibir la apoptosis de la célula tumoral, TIMP-2 y -3 pueden promover el crecimiento de la célula tumoral, y TIMP-1 puede promover la angiogénesis (Wang Z, Juttermann, Soloway, 2000).

Varios estudios clínicos muestran que altos niveles de TIMP-1 y TIMP-2 se correlacionan con un mal pronóstico. Estudios *in vitro* han mostrado que TIMP-1 y

TIMP-2 son mitógenos para una amplia variedad de células (Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, 1994).

Evidencias experimentales han demostrado una unión selectiva para el TIMP-1 y TIMP-2 en la superficie celular. Sin embargo, a la fecha no han sido aislados ni caracterizados los supuestos receptores para esos inhibidores (Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, 1995).

5. Los Mastocitos

5.1. Introducción

La acumulación de mastocitos (MC) se ha descrito en varias condiciones inflamatorias incluyendo artritis reumatoide y desórdenes alérgicos como asma (Robbye-Ryen, M. and M. Brown, 2002). También se ha encontrado que el aumento de crecimiento de algunos tumores y su capacidad invasiva está asociada con la acumulación de MC (Dimitriaudou, V. and M. Koutsilieris, 1997; Ribatti, D., *et al.*, 2001).

En nuestro laboratorio se observó que el número de MC peritumorales aumenta a medida que el tumor progresa, pero el papel que desempeñan aún no se conoce completamente (Lauria de Cidre, 1990).

Los MC fueron descubiertos en 1863 por F. Von Recklinghausen, y fueron denominados por Paul Ehrlich en 1876 como *mäszellen* (proveniente del alemán «mastig»= bien alimentado) debido a los gránulos citoplasmáticos característicos de estas células (Ehrlich, P., *Beiträge*, 1878). Algunos años después Elie Metchnikoff sugirió que los MC podrían contribuir a la defensa del hospedador por su capacidad fagocítica. Si bien los MC pueden fagocitar, esta es una habilidad principalmente concerniente a macrófagos y neutrófilos (Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, 2000; Arock, M., *et al.*, 1998).

La principal función de los MC probablemente es regular las funciones vasculares al iniciarse la respuesta inflamatoria, y activar otras células (Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, 2000).

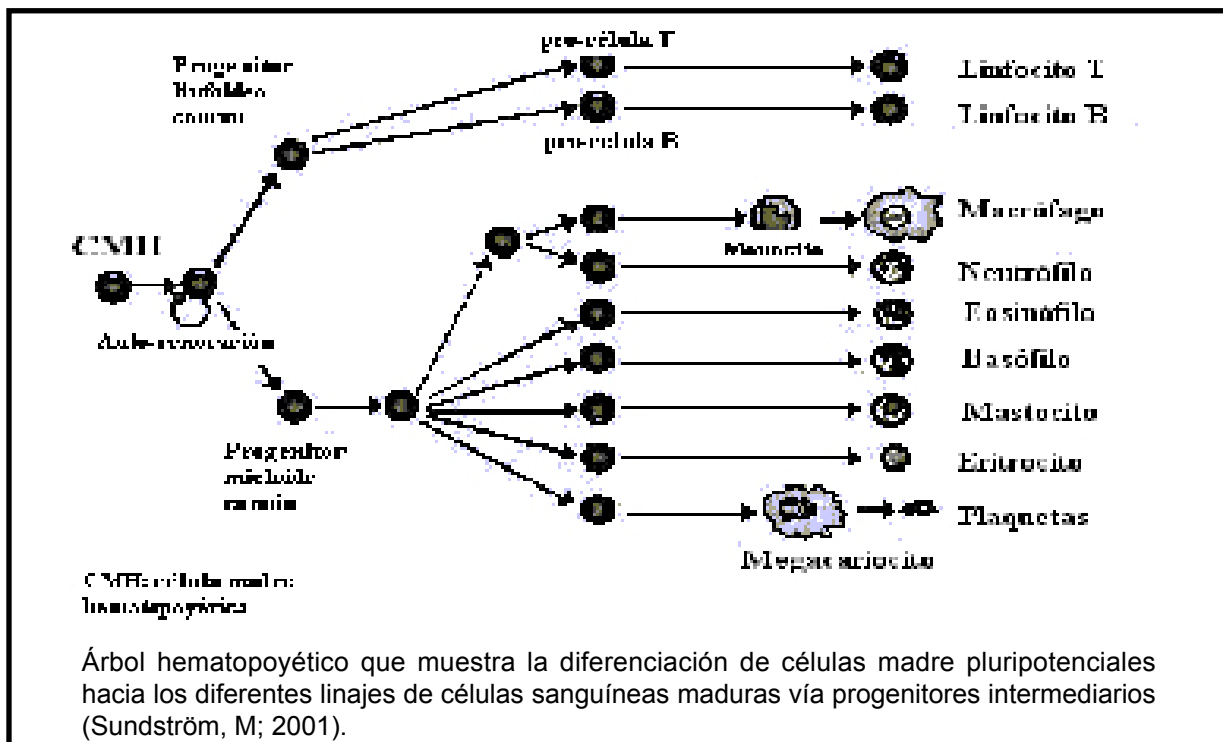
Los MC son una de las principales células efectoras del sistema inmune, y tienen un rol clave en la fase aguda de las reacciones alérgicas mediadas por Ig-E (Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, 2000).

Además de los desórdenes patológicos relacionados con la hipersensibilidad inmediata dependiente de Ig-E, los MC intervienen en la remodelación de tejidos, cicatrización de heridas, condiciones fibróticas, formación de vasos sanguíneos, respuesta del hospedador a parásitos y desórdenes inflamatorios crónicos y agudos (Kitamura, Y., *et al.*, 1977).

Cuando los MC son activados, liberan sus gránulos citoplasmáticos que contienen mediadores inflamatorios y otros compuestos. Estos mediadores preformados inducen rápidamente la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso bronquial. La activación de los MC y la subsecuente exocitosis de los gránulos, es seguida por la producción y secreción de citoquinas y otros factores que dirigen la infiltración leucocitaria y la inflamación local (Mekori, Y.A., 2000).

5.2. Origen, maduración y localización de MC

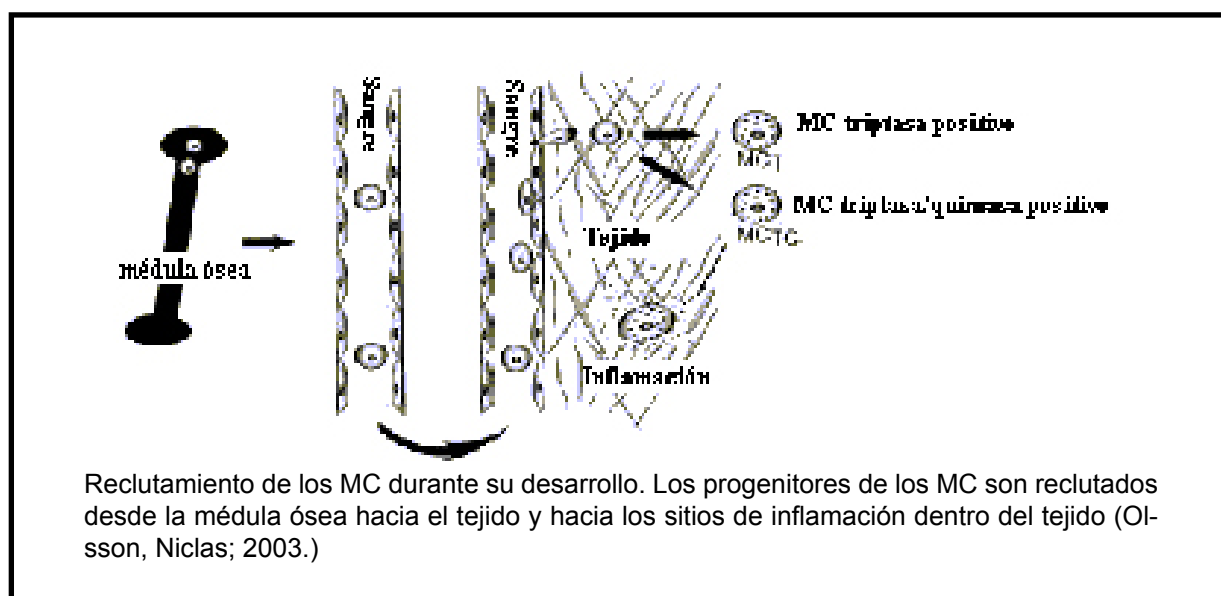
En 1991 se demostró que los MC humanos se originan de células madre hematopoyéticas CD34+ residentes en la médula ósea. Estas células también dan origen a otras células hematopoyéticas como los linfocitos, eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y basófilos (Kirshenbaum, A.S., *et al.*, 1991).



Los progenitores de MC abandonan la médula ósea, y circulan en la sangre como precursores antes de entrar en un tejido donde completan finalmente su maduración (Kirshenbaum, A.S., *et al.*, 1991). Los progenitores liberados dentro de la sangre periférica expresan c-kit+ (o CD117; receptor para el factor de crecimiento de células madre –SCF-), CD34+ (marcador de células hemotopoyéticas germinales que actúa como ligando para L-selectina), y CD13+ (metaloproteasa dependiente de zinc), pero no expresan Fc̄RI (receptor de IgE de alta afinidad), Fc̄RII (o CD23; receptor de IgE de baja afinidad), CD14 (receptor para lipo-polisacáridos bacterianos) y CD17 (glicosfingolípido de superficie celular, implicado en la transducción de señales). Cuando ellos entran en el tejido finalizan la maduración bajo la influencia de citoquinas –principalmente el SCF-, y adicionalmente interleuquina-3 (IL3) e interleuquina-4 (IL4) (Kirshenbaum, A.S., *et al.*, 1999).

Los precursores de los MC son capaces de producir metaloproteasa de matriz –gelatinasa- B/MMP9, la cual es esencial para su migración dentro de los tejidos (Tanaka A., *et al.*, 1999).

Los MC maduros, en condiciones normales, sólo se encuentran en los tejidos. Están ampliamente distribuidos a lo largo de todo el tejido vascular y son particularmente abundantes (3000-25000 MC/mm³) en la proximidad de superficies expuestas al ambiente, como la piel, y el tracto respiratorio y gastrointestinal. En estos tejidos ellos se encuentran cerca de los vasos sanguíneos, epitelio, músculos lisos, y nervios (Nilsson G., J.J. Costa, and D.D. Metcalfe, 1999).



5.3. El rol de SCF y su receptor c-kit en la biología de los MC

La presencia de MC en los tejidos periféricos depende de la acción del receptor transmembrana tirosina-kinasa tipo III en su superficie -c-kit-, y su ligando, el factor de células madre -SCF- (stem cell factor), el cual es normalmente expresado en células fibroblásticas y estromales. El SCF es liberado por ambos tipos celulares como un factor de crecimiento soluble, y es expresado en la superficie de células estromales (Nilsson G., J.J. Costa, and D.D. Metcalfe, 1999). Al unirse al receptor transmembrana c-kit de los MC, es capaz de inducir la diferenciación, migración, supervivencia, crecimiento, adhesión y desgranulación (Nilsson G., Metcalfe D.D., 1996). Diferentes estudios experimentales han mostrado la influencia que tiene el SCF sobre los MC:

- **SCF como factor de crecimiento y diferenciación:** el SCF es capaz de regular el número de MC en los diferentes tejidos, y junto con el SDF-1 α (factor derivado de células estromales) está involucrado en la localización de las células progenitoras desde la sangre periférica hacia el tejido (Lin TJ, Iseekutz TB, Marshall JS, 2000).
- **SCF como factor de supervivencia:** en base a estudios *in vitro* se demostró que el SCF es capaz de inhibir la apoptosis de los MC (Iemura A, Tsai M, Ando A, Wershil BK, Galli SJ, 1994).
- **SCF como factor de migración:** el SCF puede regular la distribución de los MC maduros dentro de los tejidos, induciendo la migración (Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR, 1992).
- **SCF involucrado en la adhesión:** el SCF puede intervenir en la adhesión de los MC a células que expresan SCF en su superficie (Adachi S, *et al.*, 1992), y estimular la adhesión de los MC a fibronectina (Dastych J, Metcalfe DD, 1994).

- SCF involucrado en la desgranulación: el SCF es capaz de aumentar la desgranulación de MC dependientes de IgE, y a concentraciones elevadas inducir directamente la liberación de histamina (Columbo M, *et al.*, 1992).

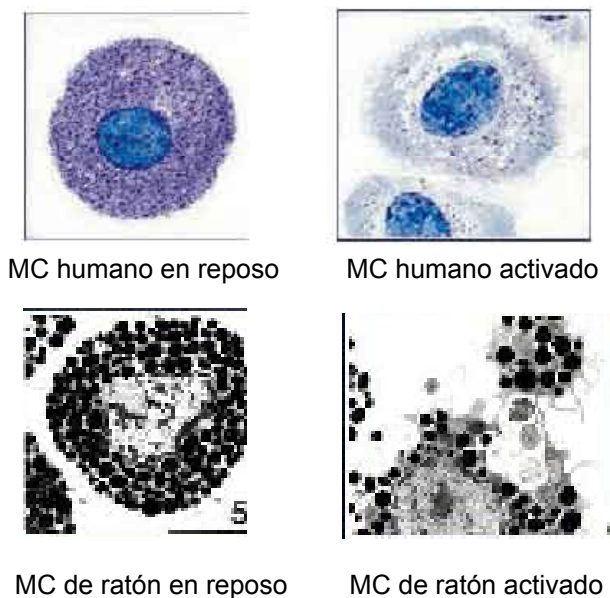
Por lo tanto, debido al rol de SCF en diferentes aspectos de la biología del MC, mutaciones en su receptor –c-kit- pueden conducir a la patogénesis. Así, estudios experimentales han reflejado que mutaciones en el dominio tirosina kinasa citoplasmático, son importantes para el desarrollo de mastocitosis, tanto de las formas benignas como malignas (Castells MC, 1997).

5.4. Morfología y heterogeneidad de los MC

El MC es una célula grande, mononuclear, que contiene receptores de alta afinidad para la IgE en su membrana celular, y gránulos grandes, intracitoplasmáticos, electro-densos que almacenan mediadores preformados de la inflamación (Serra E. – Baldrich, 1994).

Los MC comparten en diferentes tejidos muchas características como la expresión de Fc α RI y Kit, y gránulos conteniendo histamina y triptasa. Sin embargo, Enerbäck encontró variaciones en las propiedades de tinción de los MC de rata en sitios anatómicos diferentes, las cuales se deben a variaciones en la composición de proteoglicanos en sus gránulos (Enerbäck, L., 1996).

Los MC de roedores y humanos exhiben un alto grado de heterogeneidad que se debe al contenido de sus gránulos y a su localización tisular (Sundström, M, 2001).



Figuras 1 y 2. Mastocitos de la cavidad peritoneal.

Nótese en ambas figuras los gránulos citoplasmáticos densos de los MC.

E: eritrocito
 MC: mastocito

Coloración: azul de toluidina. Aumento 100X.

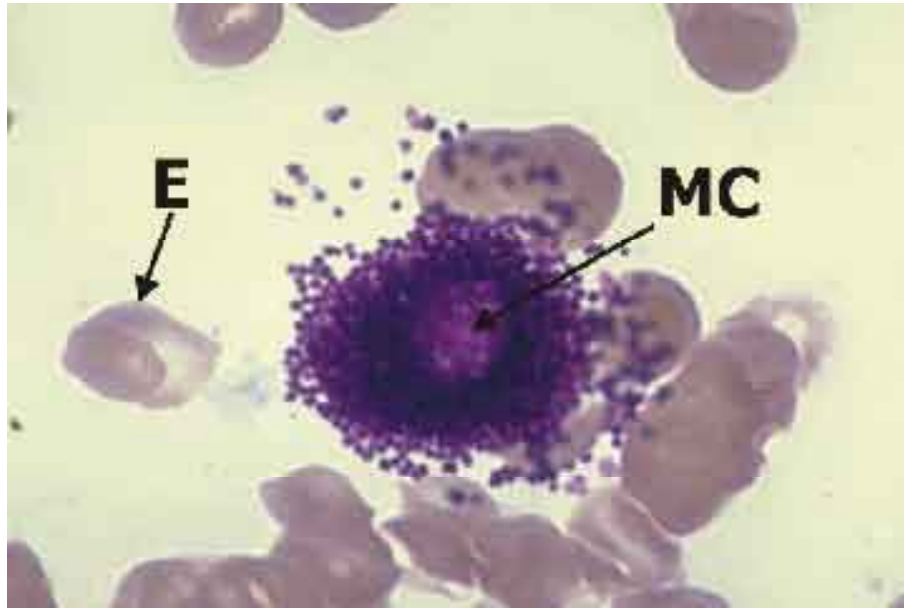


Figura 3. Mastocito parcialmente desgranulado

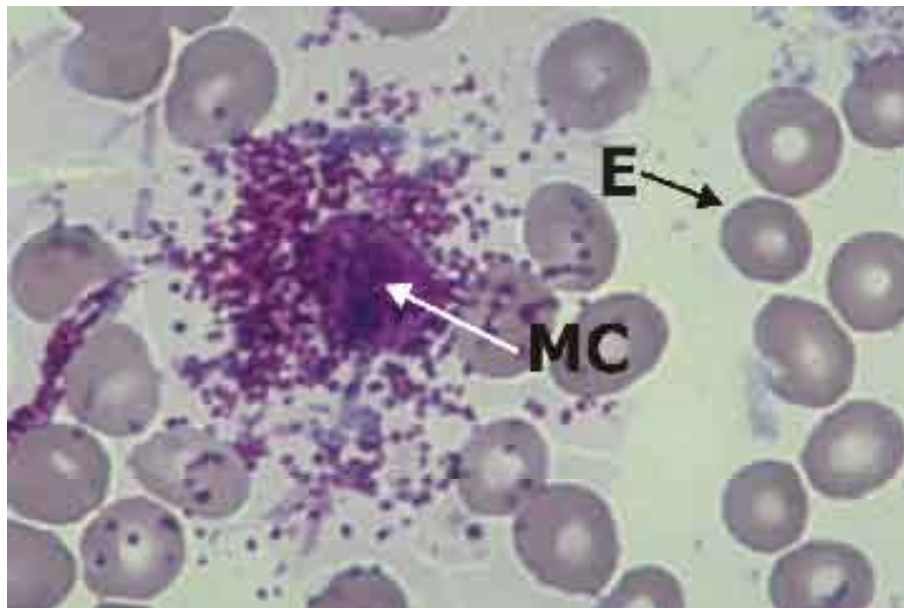


Figura 4. Mastocito completamente desgranulado

Hay dos poblaciones de MC de roedores fenotípicamente distintas basadas en la localización tisular, patrones de tinción, y contenido de mediadores químicos: los MC de tejido conectivo (CTMC) y los MC de mucosa (MMC). Ambos expresan receptores para el componente constante (Fc) de la Inmunoglobulina E (IgE) pero difieren en el contenido de sus gránulos.

Como indica su nombre, los MMC están localizados debajo de las superficies mucosas, como la lámina propia del tracto respiratorio y gastrointestinal, mientras que los CTMC se encuentran principalmente en la piel y en la cavidad peritoneal (Caufield K.P., Hein A., Moser G., and Sher A., 1981).

Algunas de las características de estos dos subtipos se encuentran en la tabla II (Dowdall, 2002).

Tabla II. Características de los dos subtipos de MC de roedores

	MC de Mucosa	MC de Tejido Conectivo
Características morfológicas	Redonda u ovalada; núcleo multilobulado	Redonda u ovalada núcleo regular
Gránulos	Tamaño variable	Grandes, tamaño uniforme
Duración de vida	Menor a 40 días	Mayor a 6 meses
Característica bioquímicas		
Proteoglicanos:		
Heparina	-	+
Condroitin sulfato di-B	+	-
Condroitin sulfato di-A	+	-
Condroitin sulfato di-E	+	+
Aminas Biogénicas	Histamina	Histamina y serotonina
Proteasas neutras	MMCP-1 y -2	MMCP-1, -2, -3, -4, -5, -6 y -7 y carboxipeptidasa
Activación de la desgranulación:		
IgE	+++	++
Ionóforo de Calcio	+	+
Sustancia P, compuesto 48/80	+++	+/-
Morfina	+	-

A diferencia de los MC de roedores, los subtipos de MC humanos no pueden distinguirse por simples análisis histoquímicos, ya que ambos tipos contienen heparina y por consiguiente, presentan las mismas propiedades de tinción. En lugar de ello, se utilizan técnicas inmunohistoquímicas, a través de las cuales, pueden distinguirse dos subtipos de MC: MC_T (MC triptasa positivo) y MC_{TC} (MC triptasa/quimasa positivo) (Irani, A.M., et al., 1989). Esta división está basada en el patrón de expresión de proteasas en los gránulos citoplasmáticos, los cuales difieren en diferentes tipos de tejidos (Irani, A.A., et al., 1986). Los MC_{TC} son el subtipo predominante en la piel y en la delgada submucosa intestinal, correspondiendo en términos de localización a los CTMC en roedores. Los MC_T que predominan en el pulmón y en la delgada mucosa intestinal, se corresponden por lo tanto, con los MMC de los roedores (Welle, M. 1997). Sin embargo, cabe destacar que la mezcla de los MC_{TC} y MC_T se encuentran en todos los tejidos, especialmente en la mucosa nasal la cual exhibe casi igual proporción de los dos subtipos (Weidner, N., and K. F. Austen, 1993).

Tabla III. Subtipos de MC humanos. MC_T indica mastocitos que contienen triptasa pero no quimasa. MC_{TC} indica mastocitos que contienen tanto triptasa como quimasa. (Modificada de Metcalfe et al, 1997)

	MC_T Triptasa	MC_{TC} Triptasa, Quimasa, Carboxipeptidasa A
Proteasas neutras		

Tabla IV. Distribución de los subtipos de MC humanos en base a la técnica de inmonuhistoquímica para la detección de triptasa y quimasa. (Irani AA., et al., 1986)

Tejido	MC_T	MC_{TC}
Piel	12%	88%
Intestino Delgado		
Mucosa	98%	2%
Submucosa	13%	87%
Pulmón/Bronquio/Bronquiolo		
Subepitelio	77%	23%
Alvéolo	93%	7%
Células dispersas	90%	10%

Estudios experimentales muestran que cuando los MC inmaduros cultivados *in vitro* son inyectados en ratones deficientes de MC, pueden adquirir el fenotipo maduro apropiado para el tejido específico en el cual se encuentran. Esto indica que las condiciones microambientales diferentes influyen en el fenotipo del MC maduro (Nakano T., *et al.*, 1985).

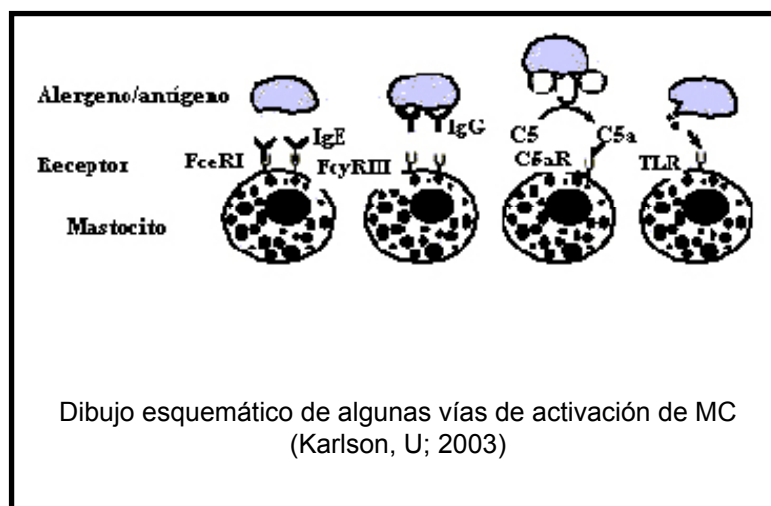
Por otra parte, existe también heterogeneidad en cuanto a las citocinas que expresan los diferentes tipos de MC. Estudios histoquímicos de localización de proteínas y de hibridación de ARN indican que existe una expresión diferencial de las citocinas IL-4, IL-5 y IL-6 en la piel, el tejido de la mucosa nasal y en los bronquios. La citoquina IL-4 se encuentra en forma preferencial en el subtipo MC_{TC}, con poca expresión de IL-4 en el subtipo de los MC_T. En cambio, las citoquinas IL-5 y IL-6 se restringen al tipo de los MC_T (Bradding P., Okayama Y., Church M.K., Holgate S.T., 1995). Estos hallazgos son consistentes con una síntesis y liberación de citocinas dependientes del tejido y del subtipo de MC, e indican una función biológica distinta para cada tipo de MC (Castells, M.C., 1997).

5.5. Activación del MC

Los MC pueden ser activados por una amplia variedad de compuestos inmunoológicos y no inmunoológicos (Serra E. – Baldrich, 1994). Morfológicamente, la desgranulación producida por estimulación inmunoológica y no inmunoológica presenta una apariencia similar, pero la cinética de los mediadores liberados y la cantidad de los productos liberados puede variar, dependiendo de la estimulación inicial (Inamura N., *et al.*, 1998).

La vía clásica de activación de los MC ocurre cuando un alérgeno interactúa con un anticuerpo IgE específico, el cual se une con alta afinidad al receptor-IgE (FcεRI) anclado en el MC, pudiendo así iniciar la señalización intracelular. Este acoplamiento sobre el receptor produce la desgranulación y transcripción de citocinas inflamatorias (Segal, D. M., J.D. Taurog, and H. Metzger, 1977).

Estudios experimentales han demostrado que además de la IgE, también la IgG puede activar la desgranulación de MC humanos por unión a FcγRI (Marone, G., S.J. Galli, and Y. Kitamura, 2002). Además, los MC pueden ser activados por neuropéptidos, factores de complemento, C3a y C5a a través de C3aR y C5aR (CD88). El factor de crecimiento nervioso (NGF) también puede activar a los MC a través de su receptor TrkA, como así también las lectinas por unión a la región Fc del FcεRI (Nilsson, G., *et al.*, 1997; Nilsson, G., *et al.*, 2000). Recientemente, se ha encontrado que los receptores donominados toll-like (TLR) —que desempeñan un papel crítico en la activación de la respuesta inflamatoria— pueden activar diferencialmente a los MC. A través de interacciones entre TLR con lipopolisacáridos (LPS) y proteoglicanos (PGN), los MC son directamente activados por diferentes bacterias, y en consecuencia contribuyen con la primera línea de defensa contra las infecciones bacterianas (Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001;



➤ importancia del proteoglicano heparina ha sido recientemente demostrada en ratones carentes de heparina sulfatada, los cuales presentaron CTMC con severos defectos en el almacenamiento del contenido de gránulos, como por ejemplo, falla en el almacenamiento de dos quimasas y de histamina (Forsberg, *et al.*, 1999; Humphries, D. E., *et al.*, 1999). La heparina es de especial interés en la progresión tumoral ya que aumenta la angiogénesis *in vivo*, y la migración y proliferación de las células endoteliales *in vitro* (Folkman J, 1985; Folkman J, 1994). Además, la heparina tiene la capacidad de liberar activador de plasminógeno del endotelio pudiendo contribuir a la lisis de la membrana basal, permitiendo así la migración de las células tumorales (Markwardt F, 1977; Roche WR, 1994).

➤ **Proteasas:** Las proteasas de los MC incluyen: quimasas, triptasas y carboxipeptidasa A. Las proteasas de MC de ratón incluyen cinco quimasas y tres triptasas (Metcalf DD, Baram D, Mekori Y., 1997). Una de las proteasas presente sólo en los CTMC es la carboxipeptidasa A (CPA) que es una metaloproteasa dependiente de Zn²⁺ con actividad de exopeptidasa (Goldstein, S. M., *et al.*, 1989).

Los MC humanos contienen triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A, todas acomplejadas con heparina en los gránulos. Además, los gránulos secretorios contienen metaloproteasas de matriz (MMPs) (Kanbe N, *et al.*, 1999).

Las proteasas de los MC degradan la MEC, facilitando la migración de las células endoteliales, y la liberación de factores de crecimiento unidos a heparina que actúan como compuestos pro-angiogénicos (tales como VEGF, cFGF, y TGF-beta) y anti-angiogénicos (como trombospondina-1, angiostatina, endostatina). Además, la quimasa y triptasa son capaces de actuar directamente como factores pro-angiogénicos. Por su parte, la MMP-9 secretada por los MC regula la angiogénesis y promueve la progresión tumoral (Norrby K., 2002). Recientemente, se ha encontrado en los MC un nuevo grupo de proteasas relacionado con la granzima B de las células T, la familia de rMCP-8 (rat mast cell protease-8), pero aún no se conoce su especificidad de sustrato (Lutzelshwab, C., M. R. Huang, M. C- Kulbberg, M. Aveskogh, and L. Hellman, 1998).

Tabla V. Mediadores de MC
(Norrby K., 2002 *Mast cells and angiogenesis*)

Mediadores preformados	
Asociados a gránulos	Eluidos rápidamente
Heparin/condroitin sulfato	Histamina
Triptasas	Serotonina (en algunas especies)
Quimasas	Factores quimiotácticos para macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos
Metaloproteasas de matriz: MMP-2, MMP-9, y MMPs adicionales	
Elastasa	
Carboxipeptidasa	
AExoglicosidasas	
Activador de Plasminógeno	
Arilsulfatasa A	
Heparanasa	
Mediadores sintetizados de novo:	
<u>Prostaglandinas:</u> PGD ₂ , PGE ₂ Tromboxanos HETEs (Hidroxicicosatrienoicos) HPETEs(Hidroperoxieicosatrienoicos)	<u>Citoquinas:</u> TNF-alfa, GM-CSF, SCF, IL-1-beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-14, IFN-gamma. BFGF, VEGF
<u>Leucotrienos:</u> LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PAF (factor activador de plaquetas).	<u>Quimioquinas:</u> MIP-1-alfa, MIP-beta, MCP-1, linfotactina.

5.7. Rol de los MC en la progresión tumoral

Los MC han sido asociados con diversos cánceres humanos (Meininger, C.J., and B.R. Zetter, 1992), y su número se halla aumentado en patologías tumorales. Ehrlich (1879), a un año de haberlos descubierto, ya los encontró asociados a procesos de proliferación celular malignos.

El papel que desempeñan los MC durante el desarrollo tumoral es controvertido, aunque hay unanimidad de criterio en el hecho de que su número aumenta durante la progresión tumoral (Lauria *et al.*, 1990).

Se ha encontrado que varios tipos de células tumorales expresan SCF y otros factores que actúan como quimioattractantes de MC, lo cual podría proveer una explicación para el elevado número de MC asociados a los tumores (Poole, T.J. and B.R. Zetter, 1983; Turner, A. M., *et al.*, 1992).

En los procesos de invasión y metástasis están involucrados fenómenos de proliferación celular, neovascularización, y degradación de la MEC. En cada uno de ellos, los MC pueden intervenir modificando por ejemplo, el crecimiento tumoral ya sea inhibiéndolo (Henderson *et al.*, 1981; Farram, 1989; Lauria de Cidre, 1996) o activándolo (Hartveit, 1981; Nordlund, 1983; Norrby, 1985; Roche, 1985). También pueden actuar potenciando el proceso angiogénico (Smith, 1970; Kessler *et al.*, 1976; Azizkhan *et al.*, 1980), o facilitando la invasión mediante la liberación de enzimas proteolíticas capaces de clivar colágeno tipo IV, fibronectina, elastina y proteoglicanos (Dexter *et al.*, 1981; Choi, *et al.*, 1987; McKerrow, 2000) o bien activando la procolagenasa de los fibroblastos y estimulando su secreción (Dabbous *et al.*, 1986).

La asociación de MC a pequeños vasos, y la presencia de componentes angiogénicos en sus gránulos indican que ellos pueden contribuir con el proceso angiogénico (Meininger, C.J., 1992; Metcalfe DD, Baram D, Mekori, 1997). Estudios experimentales basados en la manipulación de niveles de SCF demostraron que los MC están asociados con la angiogénesis. El incremento en la expresión de SCF por células tumorales produjo una acumulación de MC, la cual indujo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y también el crecimiento tumoral (Zhang, W., *et al.*, 2000).

Además, los MC pueden inducir la angiogénesis por expresión de mitógenos -los cuales inducen el crecimiento de fibroblastos, células endoteliales y epiteliales-, y de proteasas, las que a su vez llevan a cabo la remodelación de la MEC (Coussens, LM., *et al.*, 1999). Consecuentemente, ratones deficientes en MC *W/W^w* presentan una disminución de la angiogénesis asociada al tumor (Starkey, J.R., P.K., Crowle, and S. Taubenberger, 1988). En contraste, también se ha sugerido que los MC participan en la defensa anti-tumoral inflamatoria por exhibir una citotoxicidad natural contra las células tumorales. Similarmente, ratones deficientes en MC *W/W^w* han mostrado un incremento de metástasis e incidencia tumoral (Dimitriadou, V. and M. Koutsilieris, 1997). Por lo tanto, mientras que algunos investigadores no encuentran ninguna correlación entre el pronóstico tumoral y la infiltración de MC, otros reportan una correlación con valor pronóstico positivo o negativo (Dimitriadou, V. and M. Koutsilieris, 1997). Por ejemplo, se ha encontrado que en carcinomas de mama con un elevado número de MC la supervivencia es mayor, sin embargo, carcinomas de intestino con elevado número de MC presentan metástasis (Fisher ER, Sass E, Watkins G *et al.*, 1985). Otros estudios muestran que pacientes con adenocarcinoma de pulmón con elevado número de MC presentan un pronóstico menos favorable que aquellos que tienen un número menor, siendo mayor la supervivencia en estos últimos (Imada A, Shijubo N, Kojima H, Abe S., 2000). Contrariamente, un elevado número de MC alrededor del carcinoma cervical está asociado con una mayor supervivencia. Estudios histológicos de MC en sarcoma muestran que los sarcomas menos agresivos están asociados con un elevado número de MC peritumorales (Ueda T, Aoyasa K, Tsujimoto M, Yoshijawa H, Kato T. Ono K *et al.*, 1988). Cuando diferentes sarcomas fueron divididos en grados de malignidad, se encontró que los tumores de mayor grado presentaban significativamente menor número de MC que los de grado intermedio y menor (Donhuijsen K., Sastry B., Volker B., Leder L D., 1992).

Como consecuencia de los resultados experimentales obtenidos que reflejan un efecto contradictorio de los MC, se han propuesto dos hipótesis:

➤ **Los MC promueven una reacción de defensa del organismo contra el tumor:**

La presencia de MC en el tejido peritumoral es interpretada como una simple respuesta antitumoral del hospedador (Csaba G, *et al.*, 1961; Ghiara P., *et al.*, 1985; Parwaresch MR, *et al.*, 1985). Esto sugiere que los MC como sus productos de desgranulación, tendrían un efecto protector del organismo contra los tumores o serían citotóxicos para los tumores *in vitro* (Farram E., *et al.*, 1980; Henderson WR, *et al.*, 1981). La citoquina -TNFá- presenta efectos citotóxicos y es sintetizada por los MC, de modo que podría ser responsable de tal reacción (Benyon RC, *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que la incidencia de tumores inducidos experimentalmente en ratones genéticamente deficientes en MC (*W/W^w*) es significativamente mayor en relación con ratones que tienen un número normal de MC (Tanooka H, *et al.*, 1982; Burtin C, *et al.*, 1985). Además, se ha observado el crecimiento de metástasis pulmonares del melanoma B16 en ratones deficientes de MC y no en ratones normales (Schitteck A., *et al.*, 1985).

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que los MC aumentan durante la progresión tumoral (Lauria de Cidre, 1990) e inhiben el crecimiento *in vitro* y la incidencia tumoral *in vivo* de un adenocarcinoma mamario murino. Existen fuertes evidencias que la heparina, secretada por los MC, podría ser en parte la responsable de los efectos biológicos observados, ya que se demostró que las células mamarias tumorales poseen receptores específicos para la heparina (Bertolesi, 1995) y ésta es capaz de inhibir su proliferación (Bertolesi, 1994).

➤ **Los MC promueven el crecimiento tumoral y la metástasis:**

Bajo esta hipótesis se postula que las CT alterarían la reactividad de los MC, obteniendo ventajas de ellos. Por lo tanto, se sugiere que los MC podrían promover el crecimiento de los tumores malignos alterando la MEC, favoreciendo la migración y la neovascularización (Hartveit, F., 1981; Roche, W., 1985; Dabbous MKh, *et al.*, 1986).

Los MC activados por distintos tumores descargan sustancias que podrían promover el crecimiento tumoral. Además, estudios *in vitro* muestran que los productos solubles de los MC aumentan la proliferación de las células tumorales (Dabbous MK, *et al.*, 1991). Estas observaciones están sustentadas por experimentos realizados *in vivo* con adenocarcinomas mamarios de rata que muestran que una supresión farmacológica de la actividad de los MC resulta en una inhibición significativa del crecimiento tumoral (Nordlund J., *et al.*, 1983; Roche WR, 1986; Dabbous MK, *et al.*, 1991).

Por otro lado, los MC se caracterizan por su habilidad de sintetizar y liberar numerosas moléculas activas (Galli, S.J. 1990). Así, a través de sus mediadores, los MC pueden actuar directamente sobre algunos pasos críticos del desarrollo tumoral como la neovascularización, invasión y metástasis (Dimi-triaudou, *et al.*, 1997).

OBJETIVO

El objetivo general de este seminario de licenciatura es evaluar la influencia de mastocitos de ratón y de sus medios condicionados (McoMC) en la progresión tumoral *in vivo* e *in vitro* de un adenocarcinoma de pulmón murino: la línea LP07, derivada del adenocarcinoma pulmonar murino espontáneo P07.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Evaluar** la capacidad espontánea para reclutar MC por parte de la línea tumoral LP07 *in vivo*.
- **Investigar** si el McoMC tiene la capacidad de influir en la adhesión, migración e invasión de las CT LP07, como así también en la organización del citoesqueleto de actina de las mismas.
- **Determinar** si las CT y los MC con capaces de producir enzimas del tipo MMPs (Metaloproteasas) o uPA (Activador de Plasminógeno tipo uroquinasa) muy comprometidas en la biología tumoral, y a su vez si la interacción CT-MC y CT-McoMC afecta la expresión de estas enzimas.

HIPÓTESIS

La asociación de MC a tejidos neoplásicos ha sido reconocida en una gran variedad de tumores, sin embargo, el significado funcional de este fenómeno es aún objeto de controversia debido a los resultados contradictorios observados. La investigación registrada en la bibliografía se llevó a cabo en tumores de distinta estirpe y distinta agresividad, y en muy pocas líneas experimentales se analizó el rol de los MC.

En este trabajo nos propusimos evaluar la influencia de los MC y del McoMC en la línea de adenocarcinoma de pulmón LP07, no investigada hasta el presente.

Nuestra hipótesis es que los MC y el McoMC pueden ejercer una acción moduladora sobre distintos parámetros de la progresión tumoral de nuestro modelo.

1. Animales

Se trabajó con ratones BALB/c de 9 a 12 semanas de edad, endocriados en el Bioterio del Instituto de Oncología "A. H. Roffo" bajo condiciones controladas de luz y temperatura (20°C y de 12 horas luz-12 horas de oscuridad). Los animales se alimentaron con pellet y agua ad libitum.

2. Células tumorales

Se utilizaron cultivos de la línea LP07 derivada del adenocarcinoma de pulmón murino espontáneo P07.

Esta línea ha sido caracterizada y descrita por Urtreger *et al.* (New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes; International Journal of Oncology 18 (3):639-647, 2001).

El tumor P07 es un adenocarcinoma de pulmón murino que apareció espontáneamente en hembras

BALB/c endocriadas en el Bioterio del Instituto de Oncología "A. H. Roffo". Este tumor es transplantable en ratones singeneicos generando metástasis de pulmón espontáneas.

Los animales portadores del adenocarcinoma P07 desarrollan síndromes paraneoplásicos, como leucocitosis, hipercalcemia, y caquexia, atribuidos a factores producidos por el tumor, como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) y PTHrP (péptido relacionado con la hormona paratiroide).

Debido a que los tumores de pulmón son resistentes a las terapias convencionales, las líneas celulares constituyen una herramienta en la búsqueda de nuevas terapias. Por lo tanto, la línea LP07 –derivada del adenocarcinoma pulmonar P07- que induce síndromes paraneoplásicos en ratones singeneicos, es de gran importancia para estudiar la biología del tumor de pulmón, así como también para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

La línea LP07 se obtuvo por sucesivas divisiones *in vitro* de los cultivos primarios del adenocarcinoma P07. Está compuesta en su mayor parte por células poliédricas epitelioides heterogéneas en la forma y tamaño del núcleo y del citoplasma.

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas y de microscopía electrónica, se puede observar que las células LP07 establecen muchas uniones intercelulares rudimentarias y forman conductos de tipo glandular. Sus citoplasmas presentan abundantes ribosomas libres, y membranas del retículo endoplásmico. Además, las mitocondrias de esta línea muestran alteraciones morfológicas, y la presencia de gránulos secretorios indicarían un origen glandular epitelial, sugiriendo la presencia de componentes neuroendócrinos.

Según los análisis citogenéticos realizados en el trabajo científico de Urtreger *et al.*, las células LP07 son triploides, presentando como término medio 58 cromosomas, mientras que más del 40% de las células estudiadas, presentaron entre 56-65 cromosomas.

Por otro lado, las células LP07 muestran un tiempo de duplicación poblacional de 25 horas, una baja eficiencia de plaqueo, e incapacidad para crecer en agar blando.

La habilidad migratoria de esta línea es alta, y aumenta por enriquecimiento con suero. En esta notable movilidad está involucrado el uPA (activador de plasminógeno tipo urokinasa), el cual es secretado por estas células en grandes cantidades a diferencia de las MMPs que son secretadas en pequeñas cantidades.

Los estudios *in vivo* de las células LP07, mostraron que éstas son más agresivas que el tumor parental P07, presentando elevada tumorigenicidad y elevada incidencia de metástasis pulmonares experimentales.

Los estudios histopatológicos, revelaron que los tumores LP07 son adenocarcinomas poco diferenciados.

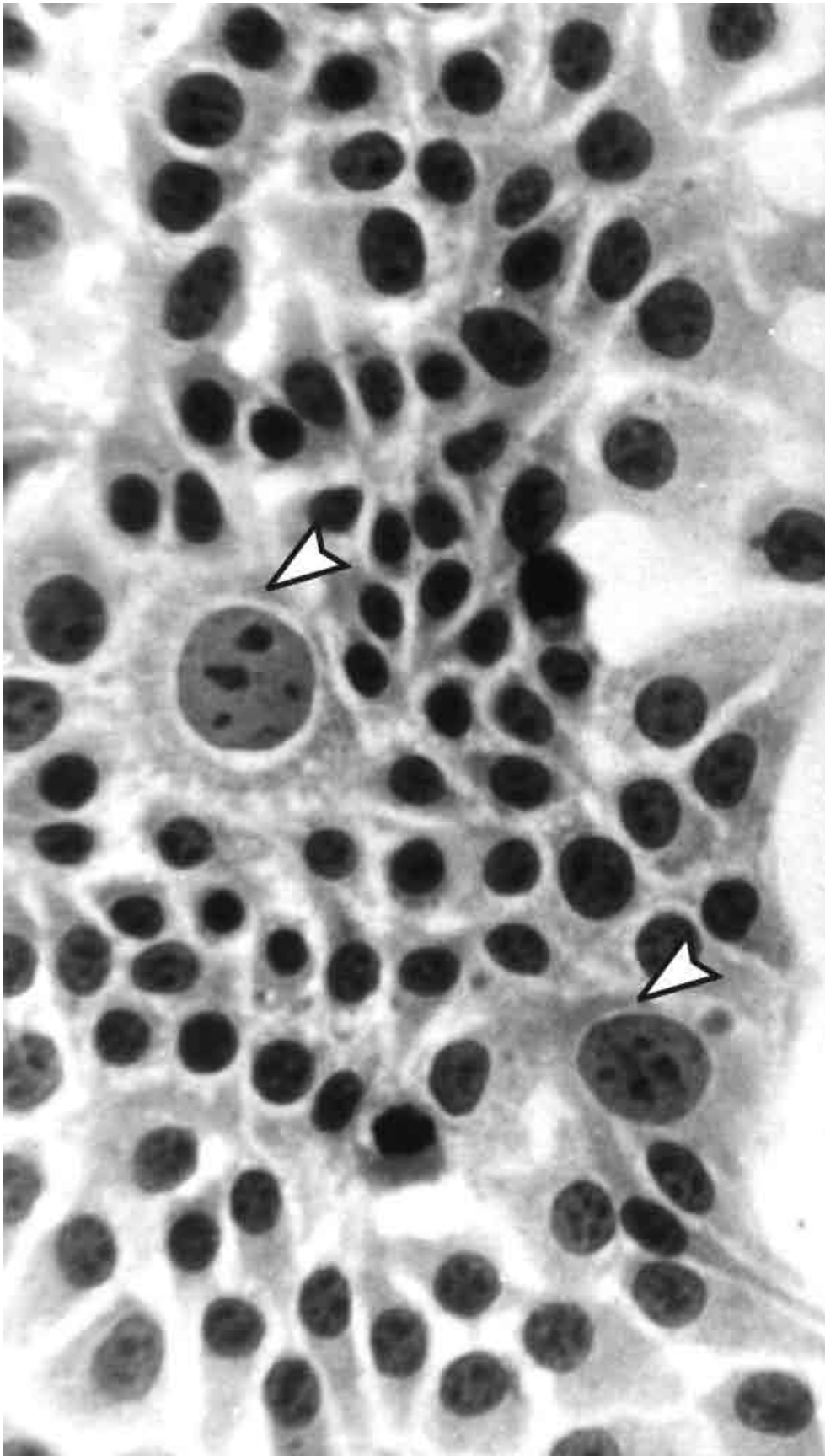


Figura 1. Cultivo de la línea LP07

Se observan células poliédricas de diferentes tamaños, y con relación núcleo/citoplasma variable. En menor porcentaje se observan células gigantes (punta de flecha). Aumento de observación 1000X.

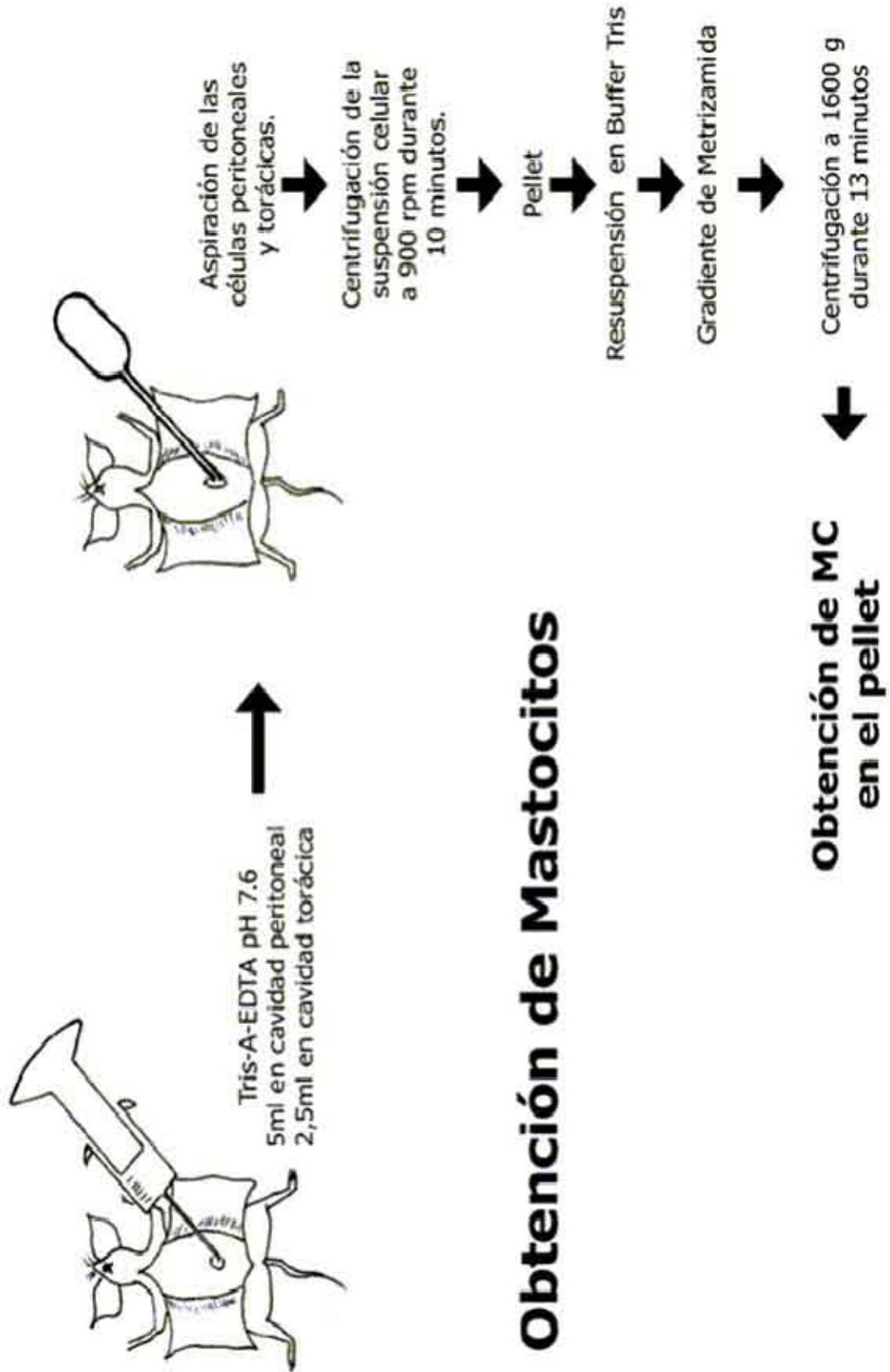


Figura 2. Obtención de MC

4. Obtención de medios condicionados

Las células pueden secretar al medio de cultivo factores de crecimiento, anticuerpos, citokinas, enzimas, inhibidores de proteasas, componentes (o fragmentos) de matriz extracelular, etc. Este medio enriquecido con secreciones celulares recibe el nombre de medio condicionado (Mco), y puede utilizarse como fuente de dichos productos o para analizar la actividad celular mediante distintas técnicas biológicas o bioquímicas.

a. Medio condicionado de mastocitos (McoMC)

Para obtener McoMC, se sembró en cada hoyo de una placa de 24, 0,2 ml de suspensión de dichas células en medio MEM sin SFB con el agregado de ionóforo de calcio A23187 (Sigma Chemical Co.) 0,1 mM, a fin de provocar la desgranulación y la consecuente liberación de mediadores químicos. Se incubaron durante 24 horas a 37°C en estufa gaseada y atmósfera húmeda, luego de las cuales se cosechó el medio, se lo centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a fin de eliminar detritos celulares, y el sobrenadante se alicuotó y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

Las células adheridas a la placa se levantaron y lisaron con PBS-tritón 1%, y se cuantificó la concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tuvo en cuenta el número total de MC utilizados para la obtención del Mco y el volumen total del mismo, tal de poder respetar en los ensayos una relación 10 CT: 1 MC.

b. Medios condicionados de células tumorales (Mco de CT), Mco resultante del cocultivo de CT con MC, y Mco resultante del cultivo de CT en McoMC.

A fin de obtener Mco de CT, Mco de CT cocultivadas con MC, o Mco de CT cultivadas en McoMC, se sembraron 45000 células por hoyo en 0,2 ml de medio MEM y suero al 5% en una placa multiwell de 24. A las 48 horas se obtuvo un 80% de confluencia.

Para obtener **Mco de CT**, las células se lavaron con 0,5 ml de PBS dos veces, y luego se incubaron 24 horas con 0,2 ml de MEM (control). Luego de las 24 horas, los medios fueron cosechados, centrifugados a 13000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se alicuotó y congeló a -20°C.

A fin de obtener **Mco de CT cocultivadas con MC** o **Mco de CT cultivadas en el McoMC**, las células se lavaron con 0,5 ml de PBS dos veces, y luego se incubaron durante 24 horas con 0,2 ml de MEM conteniendo MC en una proporción un MC cada diez CT o un MC cada cinco CT, o bien se las incubó con el Mco de mastocitos activados, obtenido previamente en un volumen que respetó la relación 1MC:10CT o 1MC:5CT. Los medios fueron cosechados, centrifugados a 13000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se alicuotó y congeló a -20°C.

Las células adheridas a la placa se levantaron y lisaron con PBS-tritón 1%, y se cuantificó la concentración proteica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

c. Medio condicionado de pulmón (Mco de pulmón).

Se sacrificaron dos ratones BALB/c de nueve semanas de edad, y se extrajeron los pulmones en esterilidad. Éstos fueron lavados con PBS, y cortados en pequeños trozos de 1 mm³ aproximadamente. Se pesaron y luego se sumergieron en 2ml de medio MEM por cada 250 mg de tejido. Se sembraron en placas de Petri de 3,5 cm, y se incubaron en estufa gaseada a 37°C durante 24hs. Luego se tomó el medio condicionado y se lo centrifugó a 2000 rpm durante diez minutos. Se descartó el pellet y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000 rpm durante media hora a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y se congeló a -20°C para su posterior utilización.

5. Ensayo *in vivo*:

a. Evaluación de la capacidad de reclutamiento espontáneo de MC *in vivo*

Se determinó en primera instancia el número óptimo de células tumorales a inyectar.

Se ensayó en primer lugar la inoculación de 5.10⁴ células de la línea LP07 en 0.1 ml de MEM en el flanco lateral de 10 ratones BALB/c. Esta concentración se basó en datos bibliográficos (Urtreger A. J. *et al*, 2001). Debido a que la latencia fue muy grande (mayor a 15 días), y el porcentaje de toma tumoral fue bajo, se ensayaron inoculaciones con suspensiones celulares más concentradas. Se adoptó la inoculación de 1.10⁶ células de la línea LP07 en 0,1 ml de MEM en el flanco lateral de cada ratón. Se utilizaron lotes de 10 ratones. Se realizó un seguimiento de los ratones cada dos días mediante palpación de la zona de inoculación. Cuando el 50% alcanzó un diámetro mayor o igual a 2 mm se sacrificaron dos ratones, y a partir de ese momento se sacrificaron dos ratones dos veces por semana. Se extirparon los tumores, se fijaron las biopsias y se procesaron según la rutina clásica histológica, obteniéndose cortes de 5mm. Se colorearon con azul de toluidina 0,5% con el fin de detectar la presencia de mastocitos peritumorales e

intratumorales dada su característica metacromásica. Éstos fueron cuantificados bajo microscopio óptico con objetivo de 40X y ocular de 10X provisto de una grilla cuya superficie a este aumento corresponde a 0,0144 mm². La medición se efectuó en 24 campos adyacentes en las zonas peri e intratumorales, y luego se calculó el número de MC peri e intratumorales por mm².

6. Ensayos *in vitro*

a. Ensayo de adhesión:

El ensayo de adhesión, consistió en determinar el número de CT que permanecen ancladas al fondo del hoyo de una placa de cultivo en presencia de McoMC, con el fin de probar si éste ejerce alguna influencia en la capacidad de adhesión de las células tumorales. Para ello, se probaron tres metodologías, que serán descriptas a continuación:

a) En 6 hoyos de una placa de 24 se efectuó un "coating" de fibronectina (FN) (2µg/cm²) en MEM (0,2 ml por hoyo) durante una hora a temperatura ambiente en el flujo laminar. Luego se trató con 0,2 ml de MEM con 1mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) durante 60 minutos a temperatura ambiente sobre dichos hoyos y sobre 6 hoyos sin tratamiento previo, con el fin de bloquear sitios de adhesión inespecíficos (Figura 3). Ambos procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad en el flujo laminar.

Se sembraron 5. 10⁴ CT por hoyo en 0,2 ml de medio MEM solo o con el agregado de Mco de mastocitos activados por ionóforo de calcio. En todos los casos se sembraron las células en ausencia de SFB. Se incubaron los distintos tratamientos durante 30 minutos a 37°C. Las células adheridas se lavaron dos veces con 0,2 ml de PBS, se levantaron con 0,2 ml de tripsina, y se contaron en cámara de Neubauer. Todos los tratamientos se efectuaron por triplicado.

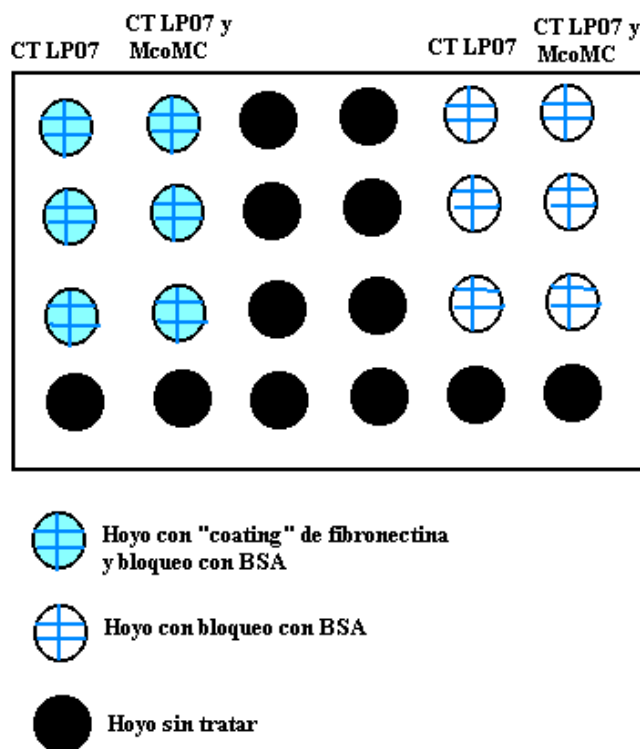


Figura 3. Esquema de la placa utilizada para realizar el ensayo de adhesión

- b) Se siguió la misma metodología que en a), con la diferencia de que en vez de tripsinizar, las células fueron fijadas con formaldehído 4%, y en cada hoyo se contó el número de células a lo largo de una transecta (diez campos). Los resultados se expresaron como número de células promedio en diez campos, cuya superficie equivale a 16,5 mm². Todos los tratamientos se efectuaron por triplicado.
- c) En placas de 96 hoyos, se siguió la misma metodología que en a). Se sembraron distintas concentraciones de CT ($4 \cdot 10^4$, $8 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$) en 0,1 ml de medio MEM sin SFB por hoyo. Al igual que en a) se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Las células adheridas fueron lavadas una vez con 0,1 ml de PBS, fijadas con 0,1 ml de metanol y luego fueron teñidas con cristal violeta durante diez minutos a 37°C. Los hoyos fueron lavados con 0,5 ml de PBS cinco veces y secados a 50°C durante una hora. Finalmente las células fueron lisadas en 0,1 ml ácido acético 33%v/v. La absorción inespecífica del plástico se determinó en hoyos sin células sobre los que se efectuó el mismo tratamiento. Se midió la absorbancia a 530 nm. Todos los tratamientos fueron efectuados por triplicado.

b. Ensayos de migración e invasión:

Para evaluar si el McoMC ejerce alguna influencia en la capacidad migratoria e invasiva de las CT LP07, se utilizaron cámaras Transwell de cultivo celular (Costar 3422, Cambridge, Ma), que están constituidas por una cámara inferior correspondiente a un hoyo de una placa multiwell de 24, y un inserto o cámara superior provista de un filtro de policarbonato con poros de 8 μ m de diámetro, los cuales permiten que las células puedan atravesarlo libremente. La cara inferior del filtro se cubre con gelatina 0.1% en PBS.

En la cámara superior de la caja de cultivo se siembran las células tumorales, mientras que en la cámara inferior se agrega algún factor quimioattractante, para estimular el pasaje de las células a través de los poros.

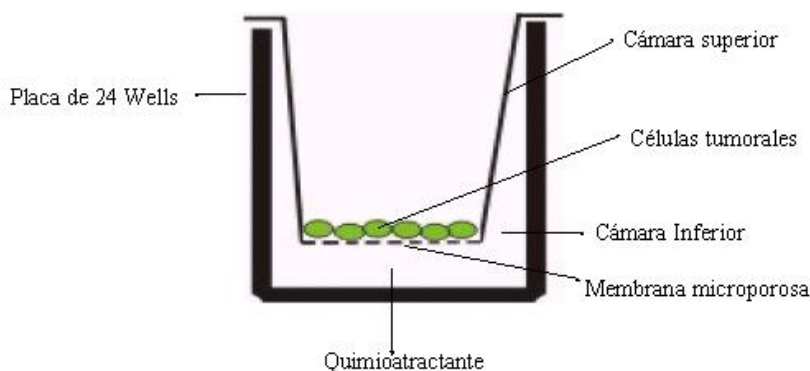


Figura 4. Esquema de la cámara de cultivo celular Transwell provista de una membrana microporosa (8 μ m de diámetro del poro)

A fin de medir la capacidad de migración e invasión de las CT, realizamos ensayos preliminares para poner a punto el tiempo y condiciones de los ensayos. En primera instancia, utilizamos fibronectina como factor quimioattractante, pero como el número de células que migraron e invadieron fue bajo, decidimos utilizar Mco de pulmón. Este contiene factores que pueden actuar como quimioattractantes para las CT y que son propios del órgano blanco de metástasis, en este caso, el pulmón.

La metodología utilizada para los ensayos de migración e invasión es la misma, con la excepción del agregado de Matrigel en la cámara superior para el segundo caso. El Matrigel es una matriz extracelular biológicamente reconstituida derivada del tumor Englebreth-Holm-Swarm (EHS) murino, que simula la presencia de la membrana basal presente *in vivo*. El Matrigel contiene colágeno IV, laminina, entactina, heparán sulfato, y proteoglicanos. La degradación enzimática del colágeno tipo IV por las células está altamente implicada en el proceso invasivo. De este modo, el Matrigel permite reproducir *in vitro* la invasión de las CT a través de la membrana basal.

Por lo tanto, para el ensayo de invasión se adicionó 100 μ l de Matrigel que se dejó secar a 37°C durante 24 horas en condiciones de esterilidad. Luego se rehidrató agregando 200 μ l de medio MEM-BSA 0,1% durante 1 hora. Posteriormente se lavó cada hoyo con PBS, y se siguió el mismo protocolo que para el ensayo de migración.

Para ambos ensayos –migración e invasión-, las CT se cuantificaron por visualización de sus núcleos a través de microscopio de fluorescencia, previa coloración de los filtros microporosos con reactivo de Hoescht-33258, el cual tiñe específicamente los núcleos celulares.

1) Ensayos preliminares de migración e invasión utilizando fibronectina como factor quimioattractante de las CT

Para estos ensayos, se colocó en la cámara superior 100 μ l de medio MEM-BSA 0.1% conteniendo $2 \cdot 10^5$ células de la línea LP07, y en la cámara inferior se agregó 500 μ l de MEM con 10 μ g de fibronectina. Se probaron tres tiempos de incubación: 13 hs, 20 hs y 40 hs, tras las cuales se detuvieron los ensayos, colocando luego, los insertos en fijador Carnoy durante 15 minutos. Luego se los sumergió en reactivo de Hoescht-33258 durante una hora, se los lavó en PBS tres veces, se limpió la cara superior de los filtros con un hisopo a fin de retirar las células sembradas que no atravesaron los poros, y se cortaron los filtros montándolos en PBS:glicerina 1:1. Se observaron los filtros bajo microscopio de fluorescencia a 20X, y se contó el número de núcleos en seis campos.

En las Figuras 5 y 6 se puede observar los esquemas de las cámaras Transwell correspondientes a los ensayos de migración e invasión preliminares utilizando fibronectina como quimioattractante.

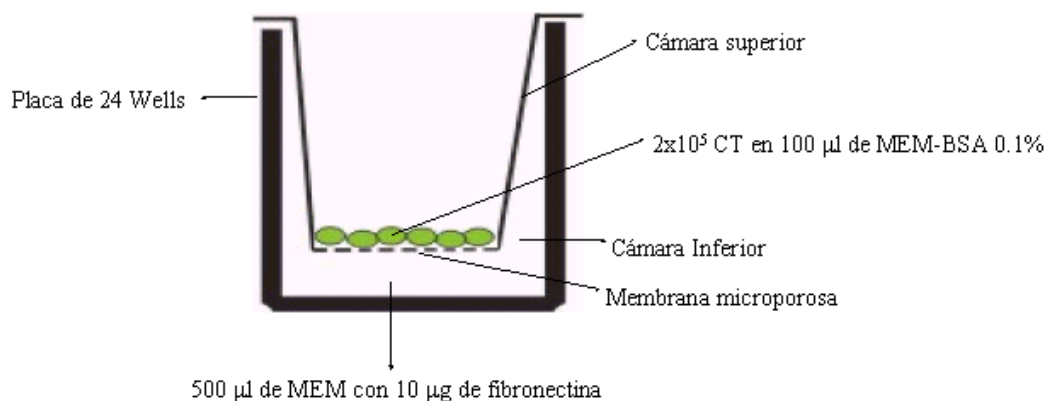


Figura 5. Esquema de la cámara de cultivo celular Transwell utilizada para el ensayo preliminar de migración, utilizando fibronectina como quimioattractante.

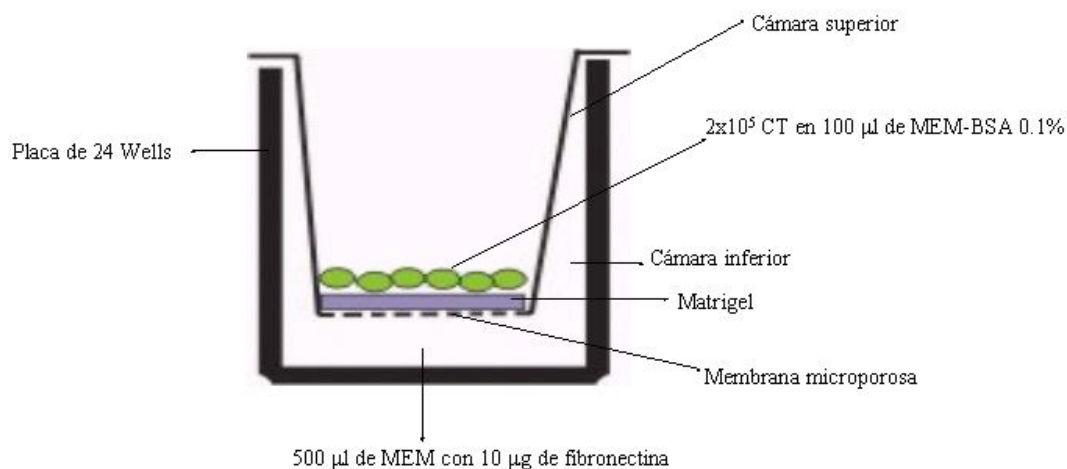


Figura 6. Esquema de la cámara de cultivo celular Transwell utilizada para el ensayo preliminar de invasión, utilizando fibronectina como quimioattractante. Nótese la presencia de Matrigel en la cámara superior.

2) Ensayos preliminares de migración e invasión utilizando Mco de pulmón como factor quimioattractante de las CT

Debido a la escasa cantidad de células que migraron e invadieron con el uso de fibronectina, se repitió la misma metodología que en el caso anterior, pero utilizando Mco de pulmón en lugar de fibronectina como factor quimioattractante. Se sembró en la cámara superior 100 μ l de medio MEM-BSA 0.1% conteniendo $2 \cdot 10^5$ CT de la línea LP07, y se colocó en la cámara inferior 500 μ l de medio MEM-BSA 0,1% con Mco de pulmón en una proporción 3:1 (MEM-BSA 0,1%: MCo pulmón). Para determinar el tiempo óptimo de migración e invasión, los ensayos se incubaron en estufa gaseada a 37°C, y se detuvieron a las 22 horas y a las 38 horas de incubación. Luego los insertos se colocaron en fijador Carnoy durante 15 minutos, y se los sumergió en reactivo de Hoescht-33258 durante una hora; se los lavó en PBS tres veces, se limpió la cara superior de los filtros con un hisopo a fin de retirar las células sembradas que no atravesaron los poros, y se cortaron los filtros, montándolos en PBS:glicerina 1:1.

El número de CT capaces de migrar e invadir se cuantificaron en seis campos a 20X equivalentes a una superficie de 17,04 mm². La observación se realizó bajo microscopio de fluorescencia.

Dado que el Mco de pulmón resultó ser un buen factor quimioattractante, decidimos utilizarlo para los ensayos definitivos, estableciendo como tiempo óptimo de migración e invasión 24 horas.

En las Figuras 7 y 8 se pueden observar los esquemas de las cámaras Transwell de cultivo celular utilizados para los ensayos preliminares con Mco de pulmón.

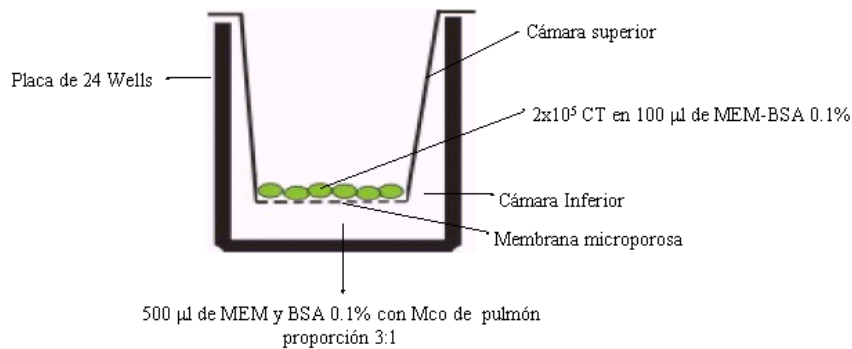


Figura 7. Esquema de la cámara de cultivo celular Transwell utilizada para el ensayo preliminar de migración, utilizando Mco de pulmón como quimioattractante.

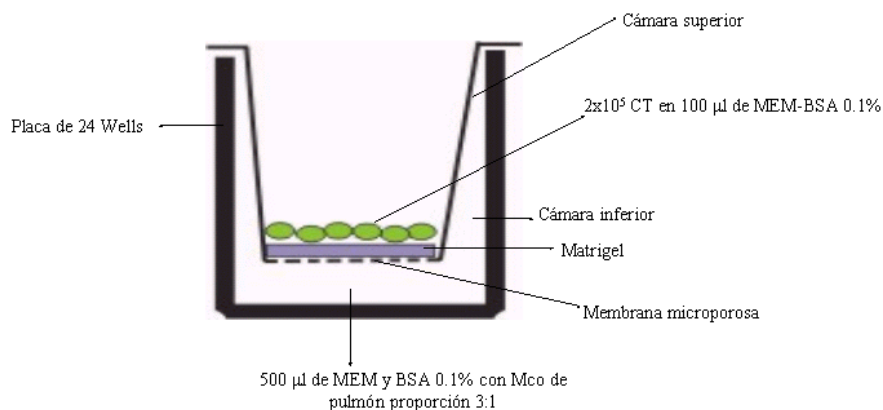


Figura 8. Esquema de la cámara de cultivo celular Transwell utilizada para el ensayo preliminar de invasión, utilizando Mco de pulmón como quimioattractante.

Nótese la presencia de Matrigel en la cámara superior.

1) Ensayos definitivos de migración e invasión

Los ensayos definitivos de migración e invasión se realizaron con Mco de pulmón como factor quimio-atractivo y un tiempo de incubación establecido en 24 horas. Se utilizó la misma metodología que en los ensayos preliminares con Mco de pulmón, y los tratamientos fueron los siguientes:

a) CT solas en 100 μ l de MEM-BSA 0,1%.

b) CT en medio MEM-BSA 0,1% y McoMC en una proporción CT10: MC1, hasta completar un volumen de 100 μ l.

Luego de las 24 hs de incubación, a cada filtro se le realizó la técnica de coloración con reactivo de Hoescht-33258 para efectuar el recuento celular. Los filtros se observaron bajo microscopio de fluorescencia a 40X, y se cuantificó el número de CT que migraron e invadieron, mediante la observación de sus núcleos, refiriéndose su número a mm^2 (superficie: $0,69 \text{ mm}^2$).

En las *Figuras 9 y 10* se pueden observar las cámaras de cultivo Transwell utilizadas en los ensayos de migración e invasión para el control (CT sin McoMC) y para el tratamiento (CT con el agregado de

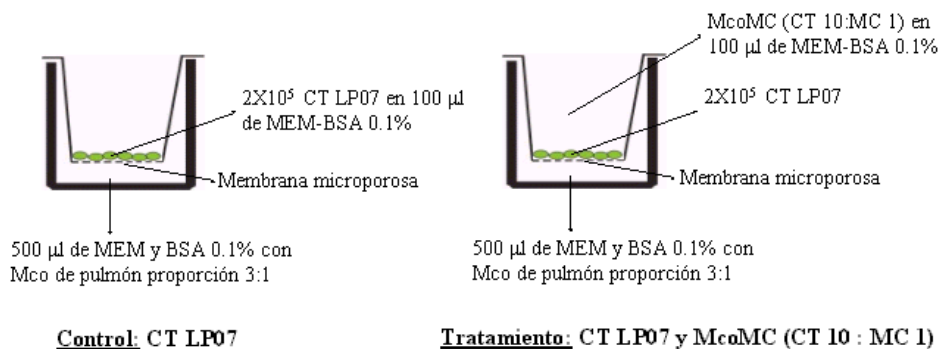


Figura 9. Esquema de la cámaras de cultivos Transwell utilizadas en el ensayo de migración para el control (CT sin McoMC) y para el tratamiento (CT con el agregado de McoMC).

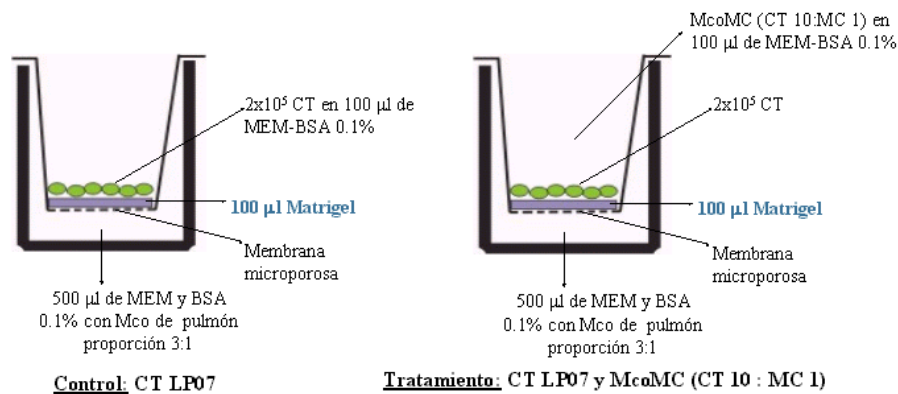


Figura 10. Esquema de la cámaras de cultivos Transwell utilizadas en el ensayo de invasión para el control (CT sin McoMC) y para el tratamiento (CT con el agregado de McoMC).

Secuencia de la invasión de una célula tumoral a través de la membrana microporosa (Matrigel), por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)

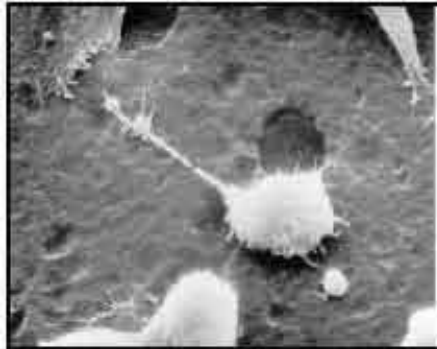


Figura 1: La célula tumoral se encuentra en la membrana microporosa en el inserto superior de la Cámara Transwell. Se observa que la célula aparece entrando y ocluyendo el poro.

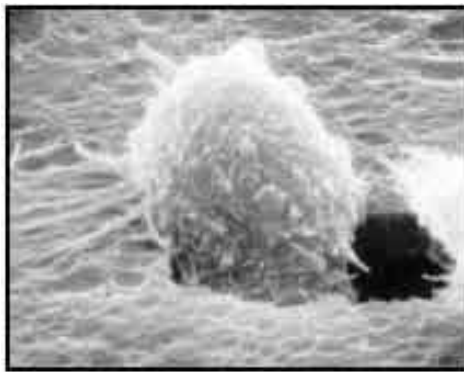


Figura 2: La célula tumoral, luego de la digestión del Matrigel, emerge de un poro en la cara inferior de la membrana (en el compartimiento inferior de la Cámara Transwell). Nótese los filipodios de la célula.



Figura 3: La célula tumoral luego de emerger completamente del poro en la cara inferior de la membra-

c. Ensayo para evidenciar la conformación del citoesqueleto de actina

Se colocó un vidrio por hoyo en una placa de 24 donde se sembraron 75000 células tumorales de la línea LP07 en 500 μ l de medio MEM solo o conteniendo Mco proveniente de 7500 mastocitos (relación CT10:MC1). Se las incubó en estufa gaseada durante 24 horas, y luego se fijaron con 200 μ l de formol 10% durante 15 minutos. Se trabajó con los vidrios sobre los que crecieron las células tumorales. Se lavó con PBS dos veces y se agregó 50 μ l de una solución que contiene 1 μ l de falodina-rodamina y 5 μ l reactivo de Hoescht en 200 μ l totales. Se dejó una hora a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS. Se montaron los vidrios con PBS-glicerina 1:1, y se observaron las muestras en un microscopio de fluorescencia a 40X. Se evaluó la presencia de actina cortical o fibras de stress.

d. Cuantificación de la actividad de metaloproteasas (MMPs)

Se valoró la capacidad gelatinolítica de metaloproteasas en los medios condicionados mediante zimografía directa de corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida (10%) copolimerizados con 0,1% de gelatina. La corrida se efectuó a 100V, con SDS y en condiciones no reductoras. El SDS se desplazó mediante dos lavados de 20 minutos con Tritón X-100 2,5%. Los geles se incubaron en un buffer conteniendo 0,25M de Tris-HCl, 1M de NaCl, 25mM de CaCl_2 (pH 7,4) durante 72 horas. Para confirmar que se trate de actividad específica de metaloproteasas se incubaron los geles en el mismo buffer conteniendo 25 mM de EDTA. Los zimogramas se fijaron y tñeron con Coomassie Blue (Biorad). Las bandas de degradación enzimática se observaron como tinción negativa, y se midieron con un densitómetro (Biorad, modelo 65-700). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ig de proteínas, y luego como porcentaje de actividad de MMPs respecto del control (cultivo de LP07).

e. Cuantificación de la actividad del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA).

La actividad de uPA en los medios condicionados se cuantificó utilizando la técnica de caseinólisis radial (Saksela O, 1981).

Se usaron placas de caseína-agarosa ricas en plasminógeno (2mg/ml), en las que se efectuó hoyos de 5mm. Se sembraron 10 μ l de la muestra a probar en cada hoyo, y se incubó durante 24 horas en cámara húmeda a 37°C. Se midió el halo de degradación, y se refirió la actividad de uPA a una curva standard de uroquinasa, en un rango de 0,1 a 50 UI/ml; los resultados se normalizaron según el contenido proteico de las monocapas, y se expresaron como UI de actividad de uPA/ ig proteínas, y luego como porcentaje de actividad de uPA/ ig proteínas respecto del control (cultivo de LP07).

f. Ensayo de proliferación celular

Se utilizó la solución MTS-PMS considerando el metabolismo celular como una medida indirecta de la proliferación.

El MTS –un compuesto tetrazolium- en presencia de PMS –un reactivo que acopla electrones-, es biorreducido por la deshidrogenasa mitocondrial de las células a formazan, un producto que es soluble en el medio de cultivo, y puede ser analizado colorimétricamente. La cantidad de formazan se mide en un espectrofotómetro, y la absorbancia medida es directamente proporcional al número de células vivas. Por lo tanto, el ensayo de MTS depende de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial para reducirlo, y sólo las mitocondrias de las células vivas presentan esta actividad.

Primeramente se puso a punto la concentración de células de la línea LP07 a sembrar de 96 hoyos. Para ello se sembraron distintas concentraciones celulares: 1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 y 6.9×10^4 células por hoyo y por triplicado en 200 μ l de medio MEM con suero fetal bovino al 5%; se dejó que se adhiriesen durante cuatro horas en estufa gaseada a 37°C. Se observó el porcentaje de confluencia al microscopio óptico:

10.000 células	40% de confluencia.
25.000 células	70% de confluencia.
50.000 células	90% de confluencia.
69.000 células	100% de confluencia.

Se optó por la concentración de 2.5×10^4 células, con la que se consiguió un 70% de confluencia luego de 4 horas.

Una vez elegida la concentración óptima, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: el primero, tendiente a observar qué efecto ejercen los MC sobre la proliferación de las CT, y el segundo, con el objetivo de observar qué acción produce el McoMC sobre la proliferación de éstas. Para ello se sembraron 2.5×10^4 células tumorales por hoyo en 200 μ l medio MEM y suero fetal bovino al 5% por triplicado, y se las dejó adherir durante 4 horas en estufa gaseada a 37°C. Se lavaron las células adheridas dos veces con 200 μ l de PBS, y luego se prepararon los siguientes tratamientos:

- a- control sin células
- b- CT LP07
- c- CT con el agregado de MC (CT10:MC1) o con el agregado de McoMC en una proporción CT10:MC1
- d- CT con el agregado MC (CT5: MC1) o con el agregado de McoMC en una proporción CT5:MC1.
- e- MC o McoMC (control del tratamiento c).
- f- MC o McoMC (control del tratamiento d).

En todos los hoyos se colocaron 200 μ l de medio MEM sin SFB, y se incubaron durante 24 horas en estufa gaseada a 37°C. Luego se lavaron los hoyos con 200 μ l de PBS, y se colocó 100 μ l de medio MEM, y 20 μ l de la mezcla MTS-PMS en una proporción PMS 1: MTS 20 en oscuridad. Se incubó nuevamente en estufa gaseada a 37°C durante una hora, y se obtuvo una lectura dual de absorbancia a 430 y 630-700 nm. Sobre todas las lecturas se descontó el tratamiento **a-** (background). Cabe destacar, que los tratamientos control de MC solos o de su Mco dieron un valor similar al background, razón por la cual no fueron tenidos en cuenta. Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia, y luego como porcentaje de proliferación respecto del control (cultivo de CT LP07).

7. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces y el que se muestra es uno representativo.

Los resultados fueron analizados utilizando el test de T-student o ANOVA con corroboración de Bonferroni, por medio del software Graph Pad Prism (Graphpad Software, Inc., San Diego). En los casos en los que resultó $p < 0,05$, la diferencia se consideró significativa.

Resultados

1. Estudio *in vivo*

a. Capacidad espontánea de las CT LP07 en el reclutamiento de MC

Los MC se han encontrado asociados a la mayor parte de tumores sólidos, pero sin embargo –como ya se comentó en la introducción–, su rol en la progresión tumoral es controvertido.

Ciertos estudios muestran que pacientes con adenocarcinoma de pulmón con elevado número de MC, presentan un pronóstico menos favorable que aquellos que tienen un número menor, siendo mayor la supervivencia en estos últimos (Imada A, Shijubo N, Kojima H, Abe S., 2000). Sin embargo, otros trabajos realizados en cáncer de pulmón muestran una relación inversa entre el número de MC y la cantidad de tejido tumoral, sugiriendo que éstos podrían actuar contra la expansión del tumor (Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T., 2003).

Decidimos entonces, evaluar si los tumores generados por células de la línea LP07 tienen también la capacidad de reclutar MC *in vivo*.

Como figura en Materiales y Métodos, se estableció el número óptimo de células tumorales a inocularse, determinándose un número de $1 \cdot 10^6$ CT en 100 μ l de MEM. Una vez determinada la concentración óptima de CT a inyectarse en forma subcutánea en el flanco lateral de cada ratón ($1 \cdot 10^6$ CT en 100 μ l de MEM), la latencia disminuyó a 7 días, y la toma tumoral fue del 100%.

Cuando el 50% de los ratones alcanzó un diámetro mayor o igual a 2 mm se sacrificaron dos ratones dos veces por semana. Se extirparon los tumores, y se procesaron las biopsias realizando cortes que luego fueron coloreados con azul de toluidina 0.5%

Las preparaciones histológicas así procesadas permitieron observar en la zona peritumoral, MC de color fucsia debido a la metacromasia producida por la presencia de heparina en sus gránulos (*Figura 1*). El diámetro mayor de los MC más frecuentemente observados en el tejido peritumoral fue de 20 μ m, mostrando algunos de ellos signos de desgranulación.

Los MC de la zona intratumoral presentaron un diámetro menor (15 μ m), y en el tejido conectivo se observa un color rosado (*Figura 2*). Muchos MC (*Figura 2*, punta de flecha), muestran escaso número de gránulos citoplasmáticos. Por otro lado, el tamaño menor, conjuntamente con la metacromasia suave en el estroma tumoral, induce a pensar en una exocitosis mayor respecto a la que se presenta en los MC peritumorales.

Con el objeto de evaluar la capacidad de reclutamiento de MC por parte de la línea tumoral LP07, se

cuantificaron los MC peritumorales e intratumorales bajo microscopio óptico en 24 campos adyacentes, y el número de MC registrados se refirió a 1 mm². Se encontró sorpresivamente la presencia de MC, no sólo en la zona peritumoral sino también en la zona intratumoral, siendo esta última un área del tumor donde la mastocitosis no es normalmente evidente. Con la misma metodología, se procedió a evaluar el número de MC/mm² presentes en la zona subcutánea de ratones sanos (comparable con la peritumoral) donde el número fue de 536,7± 27,3 (n=5).

En las muestras de tumores generados por las células de la línea LP07, se vio un aumento significativo en el número de MC peritumorales respecto del control, desde el primer día de muestreo –día 12- (*Figura 3*). A partir de este día se observó una disminución significativa en el número de MC peritumorales, la que a partir del día 14 permaneció estable hasta el final del experimento, y siempre fue significativamente mayor que el control.

Fue llamativo el reclutamiento de MC en la zona intratumoral respecto a lo observado en otros adenocarcinomas. Como se observa en la *Figura 2*, estas células se vieron ubicadas en las delgadas trabéculas de tejido conectivo que rodean los acúmulos de células tumorales.

El aumento de los MC intratumorales fue estadísticamente significativo desde el primer día de muestreo (día 12) respecto del número de MC que se registran en animales libre de tumor –control- (*Figura 4*). Este aumento alcanzó su máximo valor al día 14 de portación tumoral observándose que a partir del día 18 el número de MC se mantuvo prácticamente estable. Es importante destacar que si bien el número de MC es estable a partir del día 18, sigue siendo una medición significativamente elevada respecto a la determinada en el día 12 de portación.

Figura 1. Mastocitos peritumorales.

Los MC peritumorales se observan de color fucsia, debido a la metacromasia producida por la presencia de heparina en sus gránulos citoplasmáticos.

G: gránulo en exocitosis

N: núcleo

MC: mastocito

TC: tejido conectivo

TCPT: tejido conectivo peritumoral

Coloración: azul de toluidina. Barra= 30µm

Figura 2. Mastocitos intratumorales.

Nótese que las fibras del tejido conectivo intratumoral tienen un color rosado. Esta metacromasia puede deberse a la presencia de heparina, proveniente de MC previamente desgranulados.

MC: mastocito

PT: parénquima tumoral

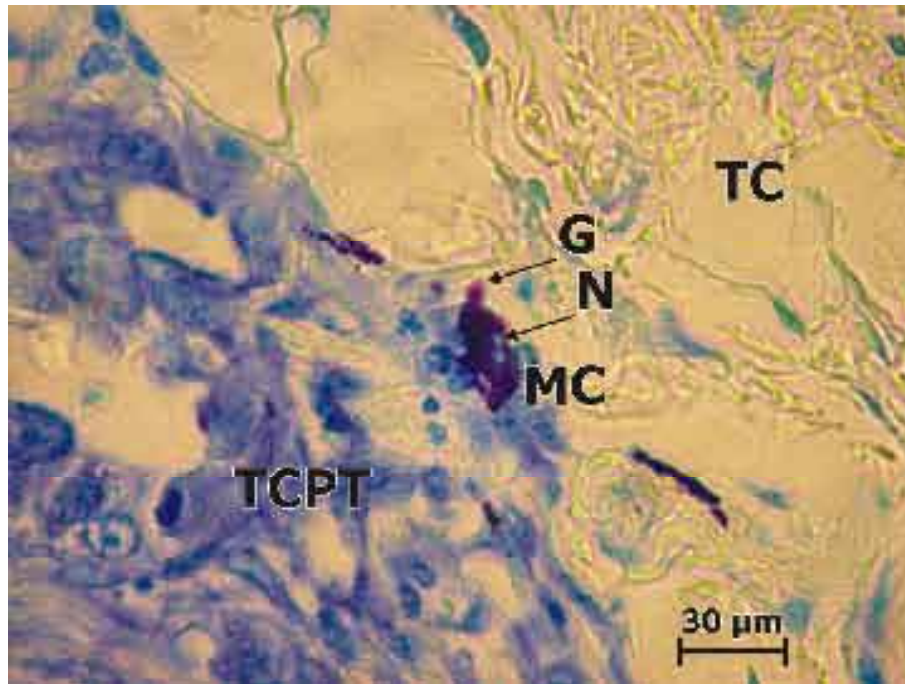


Figura 1. *Mastocitos peritumorales*

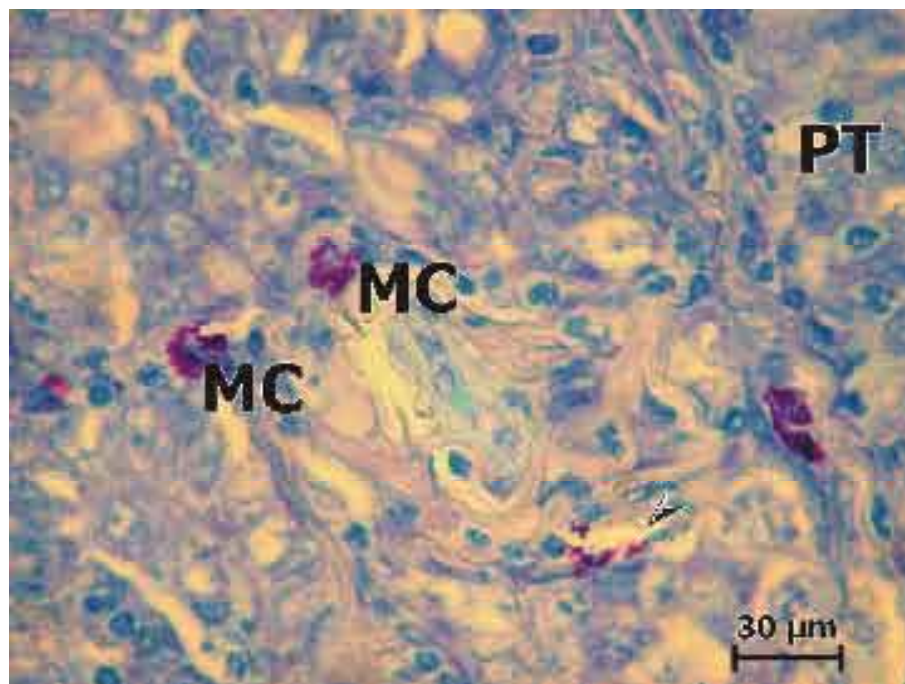


Figura 2. *Mastocitos intratumorales*

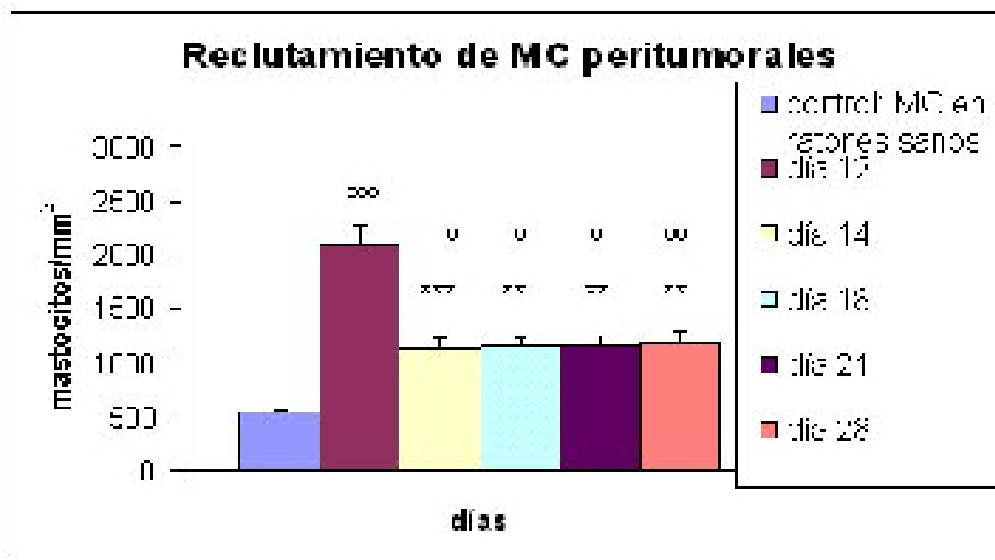


Figura 3. Reclutamiento espontáneo de MC (ubicación peritumoral) en muestras de tumores de la línea LP07.

*Nivel de significancia entre los días del experimento respecto del primer día de muestreo o Nivel de significancia entre el control (MC en ratones sanos) y experimentales (MC en ratones portadores de tumor).

Comparación	Significancia
Control vs día 12	*** (p<0.001)
Control vs día 14	* (p<0.05)
Control vs día 18	* (p<0.05)
Control vs día 21	* (p<0.05)
Control vs día 28	** (p<0.01)
Día 12 vs día 14	*** (p<0.001)
Día 12 vs día 18	** (p<0.01)
Día 12 vs día 21	** (p<0.01)
Día 12 vs día 28	** (p<0.01)

2. Estudios *in vitro*

a. Puesta a punto del cultivo de la línea LP07

En el trabajo científico de caracterización de la línea LP07 (Urtreger *et al.*, 2001) se establecieron las condiciones óptimas para su cultivo, pero para realizar cada uno de los ensayos propuestos en nuestro trabajo, primeramente debimos determinar las condiciones necesarias y adecuadas para cada experimento.

➤ Determinación de la concentración de SFB

Se probaron distintas concentraciones de SFB para adicionar al medio de cultivo, obteniendo un crecimiento óptimo con concentraciones al 10% y 5%, según se necesitara activar o no la reproducción celular, respectivamente.

➤ Determinación del volumen de tripsina y de su tiempo de exposición

Dado que las células LP07 son muy adherentes, a fin de obtener suspensiones celulares al trabajar con frascos T-25 de cultivo celular, se probaron distintos tiempos de tratamiento con tripsina, obteniéndose el mejor resultado a los veinte minutos de exposición a la enzima. Por otra parte, el volumen de tripsina determinado para remover las células del soporte de frascos T-25, osciló entre 400 μ l y 600 μ l dependiendo del número de repique celular. Si bien trabajamos con células de la línea LP07 entre los repiques 15 y 25, observamos que en general, a partir del repique 20 se requería más volumen de tripsina para separar las células de su sustrato.

➤ Determinación de la concentración de células tumorales a sembrar en placas de 24 hoyos y en placas de 6 hoyos.

Con el fin de poner a punto la concentración inicial de células a sembrar para posteriores experimentos (que requieren 80% de confluencia), se efectuaron las siguientes pruebas:

a) Se sembraron distintas concentraciones de células tumorales: $1 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ en 0,5 ml de medio MEM con SFB al 5% en una placa de 24 hoyos.

Para las últimas dos concentraciones $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ se obtuvo a las 24 horas de cultivo, un 40% y un 50% de confluencia respectivamente, y a las 48 horas un 80% y un 90% de confluencia, respectivamente. Se estableció como concentración óptima $5 \cdot 10^4$.

b) Se sembraron distintas concentraciones de células tumorales: $1 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ en 2 ml de medio MEM con 5% de SFB en placas de 6 hoyos. Se obtuvo para la segunda concentración un 80% de confluencia a las 48 horas de cultivo. Se estableció como concentración óptima $2 \cdot 10^5$.

➤ Se determinó que para un crecimiento óptimo de las CT en medio de cultivo, las concentraciones de SFB a utilizar deben ser de 10% o 5%, según se necesitara activar o no la reproducción celular, respectivamente.

➤ Se determinó que para la obtención de suspensiones celulares, el tiempo óptimo de tratamiento con tripsina debe ser de veinte minutos, y el volumen de tripsina a utilizar al trabajar con frascos T-25 de cultivo debe ser entre 400-600 μ l dependiendo del número de repique celular.

➤ La concentración de CT para obtener un 80% de confluencia en 48 horas de cultivo, en placas de 24 hoyos debe ser $5 \cdot 10^4$.

➤ La concentración de CT para obtener un 80% de confluencia en 48 horas de cultivo, en placas de 6 hoyos debe ser $2 \cdot 10^5$.

b. Efecto del McoMC sobre la capacidad de adhesión de las CT

La adhesión de las células a otras células o a la matriz extracelular provee señales que influyen en su habilidad para sobrevivir, proliferar, migrar y diferenciarse.

Como se vio en la introducción de este seminario, la adhesión celular está mediada por receptores de adhesión a moléculas de la MEC como las Integrinas, y moléculas de superficie celular que median la interacción célula-célula, como las Cadherinas, la Superfamilia de las Inmunoglobulinas, y las Selectinas.

Por lo tanto, el conocimiento de la capacidad de adhesión de una línea tumoral, no sólo es importante desde el punto biológico sino también para aplicaciones clínicas, ya que células tumorales con alteraciones en la capacidad de adhesión muestran un fenotipo metastásico.

Nosotros nos propusimos evaluar si el McoMC ejerce algún efecto sobre la capacidad de adhesión de las CT LP07. Para ello se probó la adhesión de las CT a BSA y a fibronectina (FN), con el fin de observar su capacidad de adhesión a distintos sustratos. Las tres metodologías que se pusieron a prueba detalladas en Materiales y Métodos, fueron brevemente las siguientes:

a) con placa de 24 hoyos y contando número de células en Cámara de Neubauer.

- b) con placa de 24 hoyos y contando células en diez campos a través de una transecta en cada hoyo.
- c) con placa de 96 hoyos y tiñendo las células con cristal violeta y luego midiendo absorbancia a 530 nm.

Dado que se trata de células muy adherentes, la primera no resultó una metodología apropiada. Las células no pudieron ser removidas totalmente de los hoyos mediante el tratamiento con tripsina, razón por la cual no pudieron percibirse diferencias entre tratamientos.

Tampoco resultó buena la metodología c). El plástico adsorbe mucho colorante, y no se percibieron diferencias entre tratamientos. Además debe considerarse que es necesario hacer 5 lavados en PBS con el fin de eliminar absolutamente el colorante no incorporado en las células, lo que puede llevar, a pesar de la gran capacidad de adhesión de estas células, a despegarlas mecánicamente, dado que el experimento se lleva a cabo a los 30 minutos de haberlas sembrado.

La metodología elegida fue la segunda (b). Se probó la adhesión de CT LP07 durante 30 minutos a BSA y a FN, con o sin el agregado de McoMC. Cabe destacar que no se trabaja con cocultivos de CT y MC, ya que el aspecto en el microscopio óptico de ambos tipos celulares es similar, y llevaría a confusiones al momento de contar. Se contó en cada hoyo el número de CT a lo largo de una transecta cuya superficie equivale a 16.5 mm², y se refirió su número a CT/mm².

El agregado de McoMC provocó un aumento significativo en la adhesión de las CT a FN. En el trata-

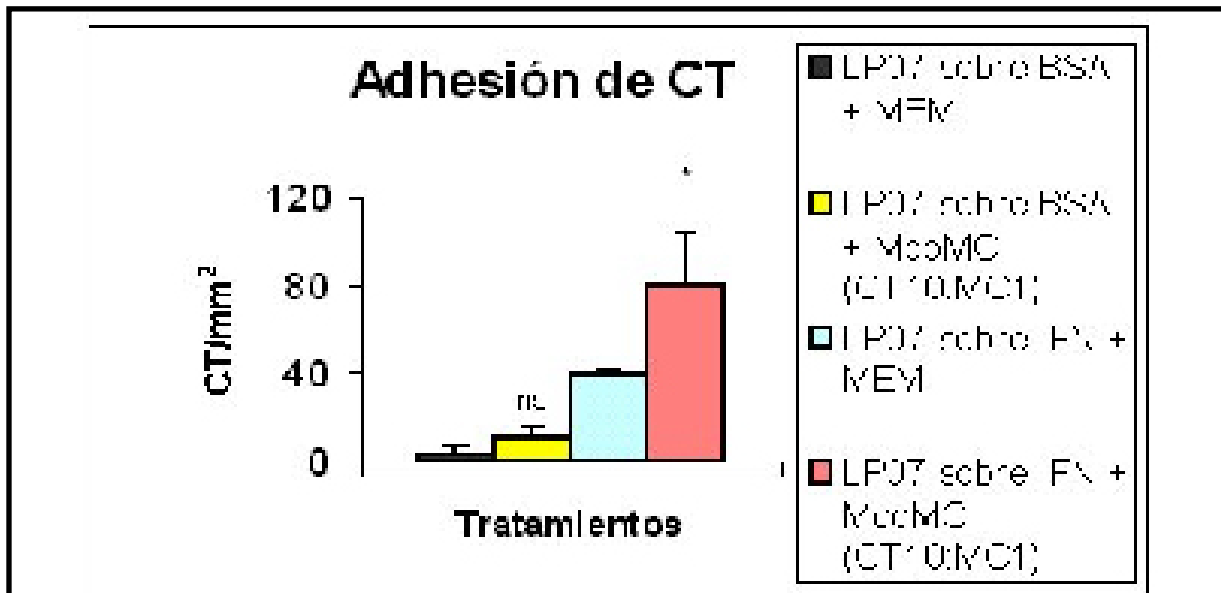


Figura 5. Efecto del tratamiento con McoMC en la adhesión de células tumorales.

- A- % CT LP07 sobre BSA
- B- % CT LP07 y McoMC en proporción CT 10: MC 1 sobre BSA.
- C- % CT LP07 sobre FN
- D- % CT LP07 y McoMC en proporción CT 10: MC 1 sobre FN.

En 6 hoyos de una placa de 24 se efectuó un "coating" de FN (2ug/cm²) en MEM (0,2 ml por hoyo) durante una hora a temperatura ambiente. Otros 6 hoyos se cubrieron con albúmina sérica bovina (BSA -1mg/1ml-) durante una hora a temperatura ambiente. Se sembraron en tres hoyos de cada condición, 5. 10⁴ CT en 0,2 ml de medio MEM solo o con el agregado de McoMC. Se incubaron los distintos tratamientos durante 30 minutos a 37°C. Las células adheridas se lavaron dos veces con 0,2 ml de PBS, y se fijaron con formaldehído al 4%. Se contó en cada hoyo el número de células a lo largo de una transecta cuya superficie equivale a 16,5 mm², y se refirió su número a CT/mm².

Tratamientos	Significancia
A vs B	ns
C vs D	s*p<0,05

Los resultados indican que el McoMC influyó en la adhesión de CT a FN a 30 minutos de tratamiento, produciendo un incremento significativo de 80 ± 14 CT/mm² respecto del control de CT LP07 sobre FN (40 ± 2 CT/mm²).

c. Efecto del McoMC sobre la capacidad migratoria e invasiva de las CT

Una de las características principales de las CT es su incontrolada y única capacidad de invadir tejidos vecinos. Este fenómeno es particularmente crítico cuando las células tumorales difunden a través del flujo sanguíneo provocando metástasis a distancia.

El crecimiento y otras propiedades biológicas de las células tumorales, como la migración e invasión están profundamente influenciadas por las células circundantes del hospedador, entre ellas los MC, que pueden actuar en pasos críticos de la progresión tumoral como la invasión y la metástasis.

Por lo tanto, decidimos evaluar la capacidad de las CT en el proceso migratorio e invasivo, examinando si la interacción del McoMC con las CT puede influenciar la motilidad de estas células *in vitro*.

1) Resultados de los ensayos preliminares de migración e invasión utilizando fibronectina como factor quimioattractante

La *tabla I* muestra los resultados de los ensayos preliminares de migración e invasión con el agregado de fibronectina a la cámara inferior. El número de células que migraron e invadieron en ambos casos, fue muy bajo, y no se detectaron diferencias marcadas en ninguna de los tres tiempos a los que se detuvieron los ensayos.

Tabla I. Número de células que migraron e invadieron en los ensayos preliminares, utilizando FN como quimioattractante.

Horas (tiempo de incubación)	Migración	Invasión
13	19	0
20	19	19
40	18	14

Se cuantificó el número de CT en seis campos observados a 20X bajo microscopio de fluorescencia.

2) Resultados de los ensayos preliminares de migración e invasión utilizando Mco de pulmón como factor quimioattractante.

La *tabla II* muestra los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de migración e invasión utilizando el Mco de pulmón como quimioattractante.

Tabla II. Número de células que migraron e invadieron en los ensayos preliminares, utilizando Mco de pulmón como factor quimioattractante.

Horas (tiempo de incubación)	Migración(CT/mm ²)	Invasión(CT/mm ²)
22	62	12
38	121	51

Se cuantificó el número de CT en seis campos observados a 20X bajo microscopio de fluorescencia. La superficie de los seis campos es equivalente a 17,04 mm², y los resultados se refirieron a CT/mm².

3) Ensayos definitivos de migración e invasión

En la *Figura 6* se muestran los resultados del ensayo definitivo de migración, refiriéndose el número

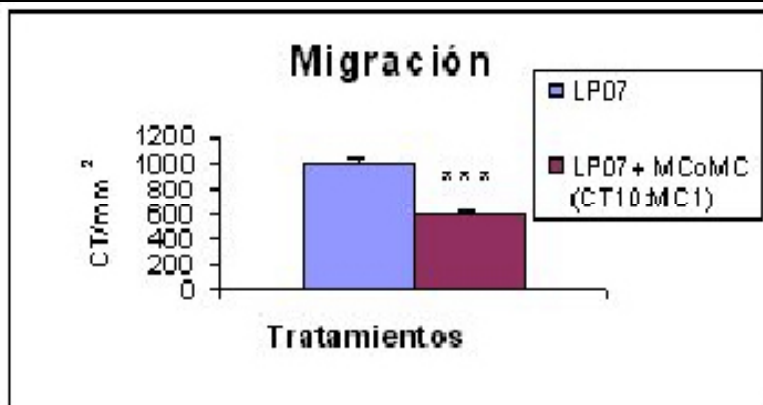


Figura 6. Ensayo de migración.

Tratamientos:

% Control: LPO7

% Tratado: LPO7 con el agregado de McoMC en proporción (CT10:MC1).

Se sembraron en la cámara superior $2 \cdot 10^5$ células en 100 μ l de medio MEM solo o con el agregado de McoMC respetando una proporción CT10: MC1. En la cámara inferior se colocó 500 μ l de medio MEM - BSA 0,1% con Mco de pulmón en una proporción 3:1 (MEM-BSA 0,1% : MCo pulmón). Luego de las 24 horas de incubación, a cada filtro se le realizó la técnica de coloración con reactivo de Hoescht-33258 para efectuar el recuento celular. Los filtros se observaron bajo microscopio de fluorescencia a 40X, y se cuantificó el número de CT que migraron mediante la observación de sus núcleos, refiriéndose su número a mm^2 (superficie: 0.69 mm^2).

Tratamiento	Número de CT/ mm^2
CT solas	1006 ± 62
CT + McoMC	607 ± 51

Se cuantificó el número de CT en tres campos observados a 40X bajo microscopio de fluorescencia. La superficie de los tres campos es equivalente a $0,69 \text{ mm}^2$, y los resultados se refirieron a

El McoMC afectó la capacidad migratoria de las CT, provocando una disminución significativa de la misma (607 ± 51 vs. 1006 ± 62).

En la *Figura 7* se muestra el número de CT que invadieron, refiriéndose su número a mm^2 . Se obtuvo una disminución significativa en presencia de McoMC ($p < 0,001$).

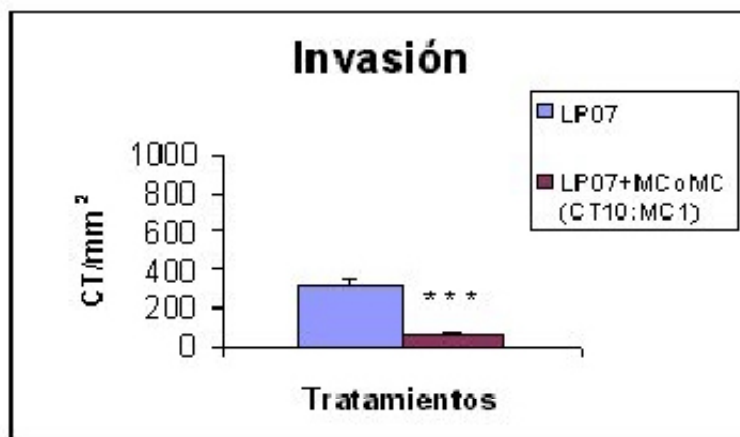


Figura 7. Ensayo de invasión.

Tratamientos:

% Control: LP07

% Tratado: LP07 con el agregado de McoMC en proporción (CT10:MC1).

Se sembraron en la cámara superior $2 \cdot 10^5$ células en 100 μ l de medio MEM solo o con el agregado de McoMC respetando una proporción CT10: MC1. En la cámara inferior se colocó 500 μ l de medio MEM - BSA 0,1% con Mco de pulmón en una proporción 3:1 (MEM-BSA 0,1%: Mco de pulmón). Luego de las 24 horas de incubación, a cada filtro se le realizó la técnica de coloración con reactivo de Hoescht-33258 para efectuar el recuento celular. Los filtros se observaron bajo microscopio de fluorescencia a 40X, y se cuantificó el número de CT que invadieron mediante la observación de sus núcleos, refiriéndose su número a mm^2 (superficie: 0.69 mm^2).

Tratamiento	Número de CT/mm ²
CT solas	317 ± 35
CT + McoMC	56 ± 16

Se cuantificó el número de CT en tres campos observados a 40X bajo microscopio de fluorescencia. La superficie de los tres campos es equivalente a 0.69 mm^2 , y los resultados se refirieron a

El McoMC afectó la capacidad invasiva de las CT, provocando una disminución significativa de la misma (56 ± 16 vs 317 ± 35).

d. Efecto del McoMC en la disposición del citoesqueleto de actina de las CT

El citoesqueleto de actina, una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas, está involucrado en la regulación de la forma, la motilidad y la adhesión celular, por lo que alteraciones en su función contribuyen a la transformación maligna.

Sabiendo que la migración de las CT está íntimamente relacionada con la organización del citoesqueleto de actina, y habiendo observado que el McoMC produjo una disminución de la capacidad migratoria e invasiva de las CT LP07, decidimos evaluar qué influencia ejerció el McoMC en la disposición del citoesqueleto de actina de las CT al disminuir su motilidad.

Las Figuras 8, 9, 10, y 11, muestran los resultados del experimento.

El tratamiento con McoMC provocó un cambio en la disposición del citoesqueleto de actina de las CT, ya que se acentuó la presencia de actina cortical y desaparecieron por completo las fibras de stress.

El tratamiento con McoMC provocó un cambio en la disposición del citoesqueleto de actina de las CT, ya que se acentuó la presencia de actina cortical y desaparecieron por completo las fibras de

Figuras 8 y 9. CT LP07 sin tratar.

Se colocó un vidrio por hoyo en una placa de 24 donde se sembraron 7.5×10^4 CT en 500 μ l de medio MEM. Se incubó en estufa a 37°C por 24hs, y luego cada hoyo se fijó con formaldehído al 4% durante 15 minutos. Se lavó dos veces con PBS y se agregó 50 μ l de una solución que contiene 1 μ l de falodina-rodamina y 5 μ l de reactivo de Hoescht en 200 μ l totales. Se dejó durante una hora a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados con PBS. Se montaron los vidrios con PBS: glicerina 1:1, y se observaron las muestras al microscopio de fluorescencia.

La marcación roja corresponde a falodina-rodamina (en ambas figuras), y la marcación azul al reactivo de Hoescht mostrando los núcleos (en la figura 9).

Figura 8: *Nótese la presencia de fibras de stress y la forma ahusada de las células en el cultivo.*

Figura 9: *Idem a Figura 8 resaltando los núcleos celulares con el reactivo de Hoescht.*

FS: fibras de stress

N: núcleo

Figuras 10 y 11. CT LP07 tratadas con McoMC.

Se colocó un vidrio por hoyo en una placa de 24 donde se sembraron 7.5×10^4 CT en 500 μ l de medio MEM conteniendo Mco de 7.5×10^3 MC (CT10: MC1). Se incubó en estufa a 37°C por 24hs, y luego cada hoyo se fijó con formaldehído al 4% durante 15 minutos. Se lavó dos veces con PBS y se agregó 50 μ l de una solución que contiene 1 μ l de falodina-rodamina y 5 μ l de reactivo de Hoescht en 200 μ l totales. Se dejó durante una hora a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados con PBS. Se montaron los vidrios con PBS: glicerina 1:1, y se observaron las muestras al microscopio de fluorescencia.

La marcación roja corresponde a falodina-rodamina (en ambas fotos), y la marcación azul al reactivo de Hoescht mostrando los núcleos (en la figura 11).

Figura 10: *Nótese la presencia de actina cortical y la ausencia total de fibras de stress.*

Figura 11: *Idem a la Figura 10 resaltando los núcleos celulares con el reactivo de Hoescht.*

AC: actina cortical

N: núcleo

Los resultados indican que el McoMC influyó en la adhesión de CT a FN a 30 minutos de tratamiento, produciendo un incremento significativo de 80 ± 14 CT/mm² respecto del control de CT LP07 sobre FN (40 ± 2 CT/mm²).

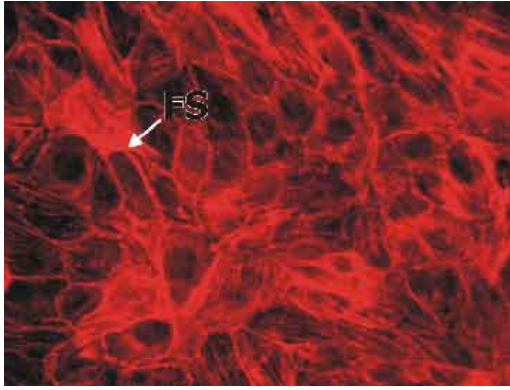


Figura 8. Control LP07
(Faloidina)

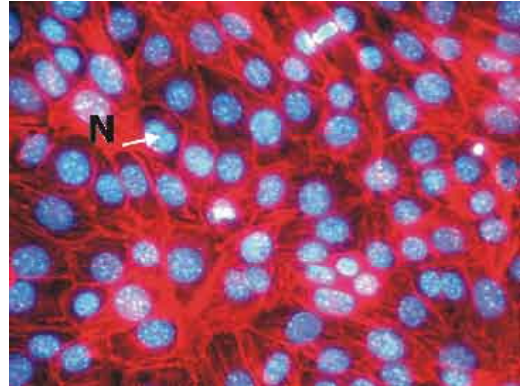


Figura 9. Control LP07
(Faloidina +Hoescht)

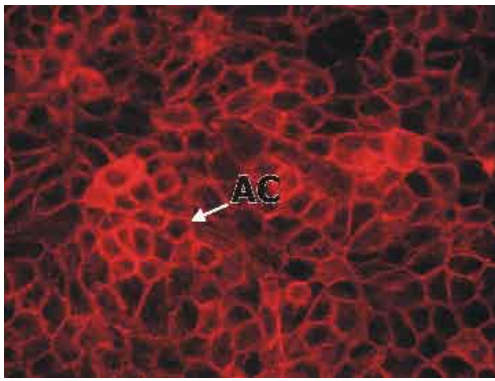


Figura 10. Tratado LP07 + McoMC
(Faloidina)

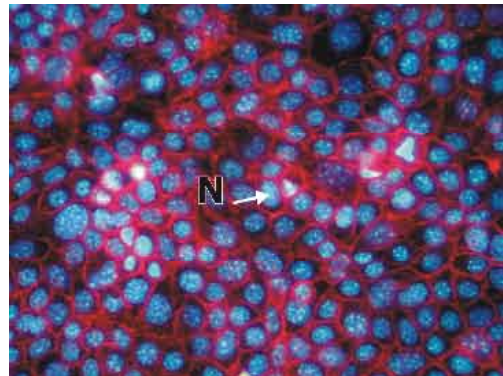


Figura 11. Tratado LP07+ McoMC
(Faloidina + Hoescht)

e. Investigación de la producción/actividad de MMPs secretadas por CT y MC.

El estudio de MMPs es de gran importancia ya que estas enzimas están asociadas con la invasión de las células tumorales, con la penetración de dichas células al flujo sanguíneo, y con la metástasis. También están implicadas en el crecimiento del tumor metastásico y en la angiogénesis, de modo que tienen un rol primordial en la progresión tumoral.

Las MMPs son producidas por células tumorales y por células de tejidos adyacentes, sin embargo, las CT además pueden inducir a las células vecinas a producir otras MMPs con el objetivo de llevar a cabo la proteólisis.

Decidimos investigar la producción/actividad de MMPs por parte las CT LP07 y de los MC, con el fin de poder evaluar luego, si la actividad de las MMPs secretadas por las CT se ve afectada cuando éstas se hallan en cocultivo con los MC, como así también si dicha actividad es influenciada en presencia del McoMC. Con las observaciones llevadas a cabo en estos ensayos esperamos poder establecer alguna correlación entre la actividad de MMPs –cuyo rol es clave en el proceso de migración e invasión- con los resultados obtenidos en la modulación que ejerce el McoMC en la capacidad migratoria e invasiva de esta línea tumoral. Podría esperarse que la disminución producida en la migración e invasión de las CT LP07 en presencia del McoMC, esté relacionada con una disminución en la expresión de MMPs, probablemente debido a la intervención de algún mediador mastocitario que inhiba su expresión a través de alguna vía de señalización.

Se detectó por zimografía la actividad gelatinolítica en medios condicionados provenientes de cultivos de 24 horas de CT LP07 o de MC.

Se observó que los MC producen dos MMPs con actividad gelatinolítica, una de 116 KDa y otra de 15 KDa. (Figura 12). Se comprobó que se trata de MMPs y no de otro tipo de proteasas con el agregado de EDTA en el buffer de incubación.



Figura 12. Actividad de MMPs en Mco proveniente de cultivo de 24 hs de MC.

Las muestras se fraccionaron en geles de poliacrilamida (10%) copolimerizados con 0.1% de gelatina. Luego de la corrida, los geles se lavaron en Tritón X-100 2.5% y se incubaron por 72 hs en buffer 0.25M Tris-HCl/1M NaCl/25mM CaCl₂ (pH 7.4). Los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Blue. Las bandas de degradación enzimática se observaron como tinción negativa, y se midieron con un densitómetro.

Los MC producen dos MMPs con actividad gelatinolítica, una de 116 KDa y otra de 15 KDa.

Por otro lado, al analizar por zimografía la actividad de MMPs de medio condicionado proveniente del cultivo de 24 horas de CT, se vio que éstas producen varios péptidos con actividad gelatinolítica. También se comprobó que se trata de metaloproteasas mediante el agregado de EDTA. Las bandas se corresponden con PM de 116 KDa, 72 KDa, 66 KDa, 54 KDa, 50 KDa, 43 KDa y 39 KDa (*Figura 13*).

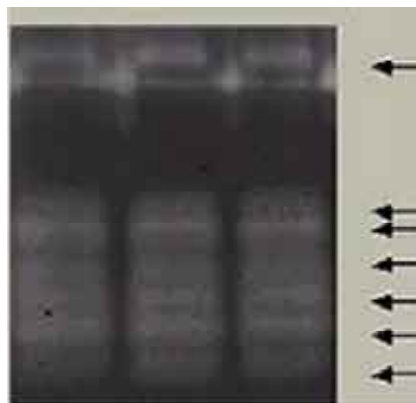


Figura 13. Actividad de MMPs en Mco proviente de cultivo de 24 hs de CT LP07.

Las muestras se fraccionaron en geles de poliacrilamida (10%) copolimerizados con 0.1% de gelatina. Luego de la corrida, los geles se lavaron en Tritón X-100 2.5% y se incubaron por 72 hs en buffer 0.25M Tris-HCl/1M NaCl/25mM CaCl₂ (pH 7.4). Los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Blue. Las bandas de degradación enzimática se observaron como tinción negativa, y se midieron con un densitómetro.

Las CT producen varias MMPs con actividad gelatinolítica

f. Modulación de la actividad de MMPs ejercida por el Mco de cocultivos de CT y MC.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior, de donde determinamos que tanto las CT como los MC producen MMPs, decidimos evaluar si la presencia de MC en cocultivo con CT produce alguna modificación sobre la actividad de las MMPs y viceversa.

Se realizaron cocultivos de CT LP07 y MC en proporción CT5: MC1 durante 24 horas, y se midió la actividad gelatinolítica de los medios condicionados de dichos cocultivos por medio de zimografía cuantitativa (Figura 14). No se obtuvieron resultados significativos, aunque hay una tendencia inhibitoria de la actividad gelatinolítica en presencia de MC (Figura 15).

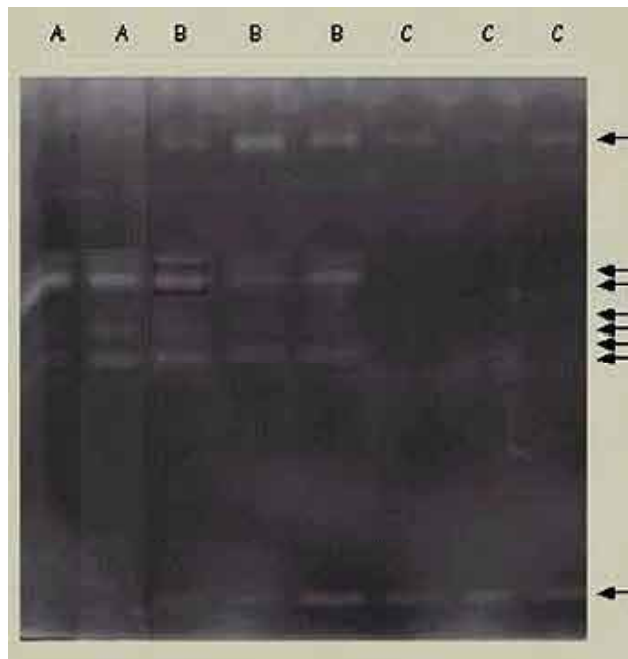


Figura 14. Actividad de MMPs en medios condicionados de:

A-CT LP07
 B- CT+MC (CT5:MC1)
 C-MC

Las muestras se fraccionaron en geles de poliacrilamida (10%) copolimerizados con 0.1% de gelatina. Luego de la corrida, los geles se lavaron en Tritón X-100 2.5% y se incubaron por 72 hs en buffer 0.25M Tris-HCl/1M NaCl/25mM CaCl₂ (pH 7.4). Los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Blue. Las bandas de degradación enzimática se observaron como tinción negativa, y se midieron con un densitómetro.

Nótese en la zimografía que en el Mco de cocultivo de CT y MC aparece la banda de bajo PM (15 KDa) presente en el Mco del cultivo de MC solos.

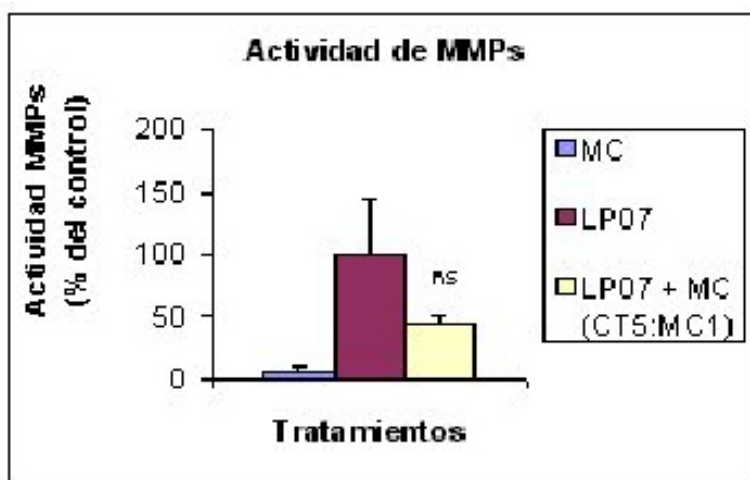


Figura 15. Actividad de MMPs en Mco de cocultivos de CT y MC.

Se expresó como unidades arbitrarias/mg de proteínas, y luego como porcentaje de actividad de MMPs respecto del cultivo de CT LP07.

A- % Mco de MC

B- % Mco de CT

C- % Mco de cocultivo LP07 + MC (CT5:MC1)

Tratamientos	Significancia
B vs C	ns

El cocultivo de CT y MC produjo un Mco con una producción/actividad de MMPs menor, aunque no significativa.

g. Modulación de la actividad de MMPs ejercida por el Mco resultante del cultivo de CT en McoMC

Además de analizar si la presencia de MC en cocultivo con las CT afecta la actividad de las MMPs –que por lo visto en el apartado anterior, ejerce un efecto con tendencia inhibitoria-, también decidimos investigar qué efecto tiene el McoMC sobre la actividad de las MMPs secretadas por las CT, y observar si esta modulación sobre la actividad de MMPs es diferente a la que ocurre cuando los MC están en contacto con las CT.

Se cultivaron las CT durante 24 horas con McoMC, y se midió la actividad gelatinolítica de los medios condicionados por medio de zimografía (Figura 16).

Se obtuvo nuevamente, una tendencia inhibitoria de la actividad de MMPs cuando las CT están en cultivo con el McoMC (Figura 17).

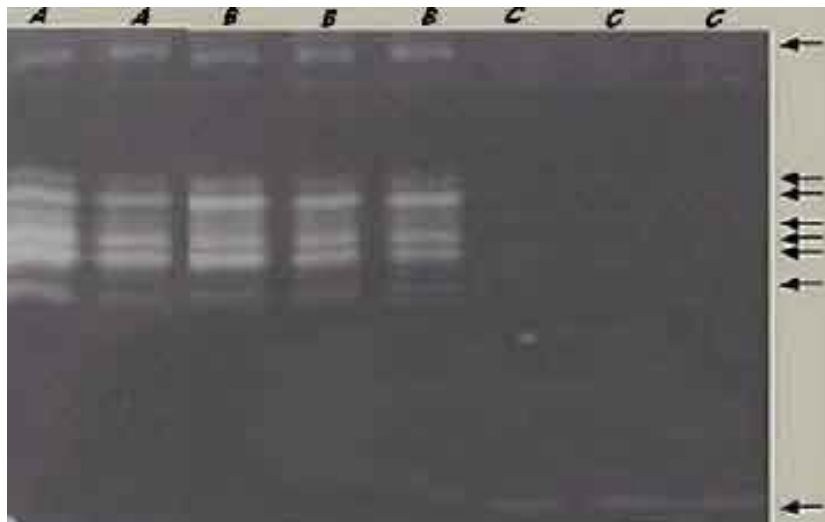


Figura 16. Actividad de MMPs en medios condicionados de:

- A- CT LP07
- B- CT + McoMC (CT10:MC1)
- C- MC

Las muestras se fraccionaron en geles de poliacrilamida (10%) copolimerizados con 0.1% de gelatina. Luego de la corrida, los geles se lavaron en Tritón X-100 2.5% y se incubaron por 72 hs en buffer 0.25M Tris-HCl/1M NaCl/25mM CaCl₂ (pH 7.4). Los geles se fijaron y tiñeron con Coomassie Blue. Las bandas de degradación enzimática se observaron como tinción negativa, y se midieron con un densitómetro.

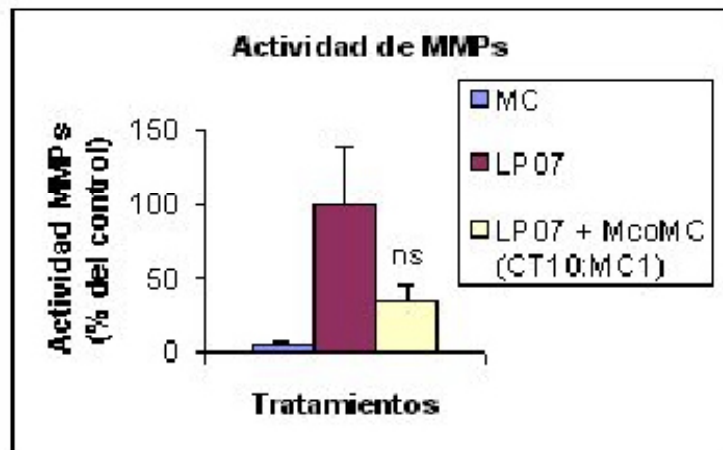


Figura 17. Actividad de MMPs en Mco de CT cultivadas con McoMC.

Se expresó como unidades arbitrarias/mg de proteínas, y luego como porcentaje de actividad de MMPs respecto del cultivo de CT LP07.

- A- % Mco de MC
- B- % Mco de CT
- C- % Mco resultante del cultivo de CT LP07 en McoMC (CT10:MC1)

Tratamientos	Significancia
B vs C	ns

La presencia de McoMC en cultivo con las CT produjo una tendencia inhibitoria de la actividad de las MMPs.

h. Modulación de la actividad de uPA ejercida por el Mco de cocultivos de CT y MC.

El activador de plasminógeno tipo urokinasa –uPA- es una serinoproteasa que, además de degradar algunos componentes de la matriz extracelular, cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina, la cual al unirse a receptores de superficie en las células tumorales puede activar otras enzimas conduciendo a una amplificación de la cascada proteolítica.

El uPA es sintetizado y secretado por células tumorales y estromales en forma de proenzima inactiva, y se une a receptores de superficie en las células tumorales donde puede activarse, y producir a su vez la activación del plasminógeno, lo cual se incrementa hasta 40 veces cuando el uPA está unido a su receptor (uPAR). De este modo, el uPA y su receptor uPAR, constituyen un componente esencial en la migración e invasión celular *in vivo* e *in vitro*.

Según estudios realizados en nuestro laboratorio, las CT de la línea LP07 secretan elevadas cantidades de uPA (aproximadamente, 40 UI/mg prot./24 horas), no habiéndose detectado uPA asociado a la superficie de estas células (Urtreger *et al.*, 2001).

Cabe destacar también, que no se detectó actividad medible de uPA en Mco de cultivo de MC solos.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los ensayos realizados hasta el momento, podríamos pensar que el aumento de la adhesión de las CT por acción del McoMC, se condice con la disminución de la capacidad migratoria e invasiva de las CT en presencia del McoMC, lo cual también podría correlacionarse con la tendencia inhibitoria de la actividad de las MMPs que el McoMC ejerció en cultivo con las CT. Hasta este punto de nuestra investigación, podríamos afirmar que los MC estarían ejerciendo cierta acción inhibitoria en la progresión tumoral *in vitro* de esta línea. Por ello, al investigar la actividad del uPA, cuyo rol es importante en la migración e invasión de las CT, esperaríamos que los MC o el McoMC provocasen una disminución en dicha actividad, pero sorprendentemente, como se verá a continuación, la actividad del uPA aumentó ya sea por efecto de los MC en cocultivo con CT, o por acción del McoMC en contacto con las CT.

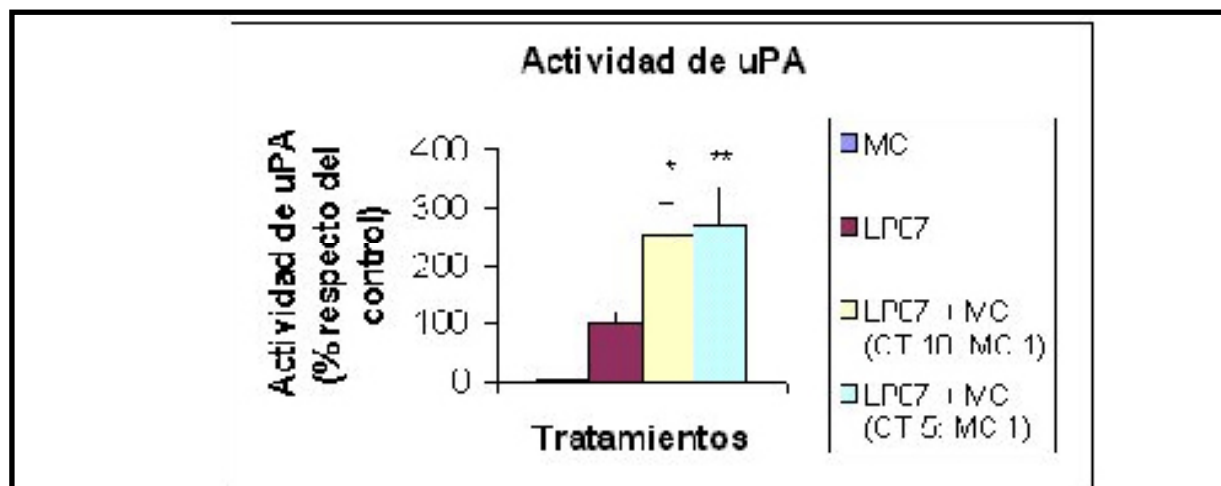


Figura 18. Actividad de uPA en Mco de cocultivos de CT y MC

Se expresó como UI de uPA/ig de proteínas, y luego como porcentaje de actividad de uPA respecto del cultivo de CT LP07.

A- % Mco de MC (carente de actividad medible; barra equivalente a 0)

B- % Mco de CT LP07

C- % Mco del cocultivo CT-MC en proporción CT 10: MC 1

D- % Mco del cocultivo CT-MC en proporción CT 5: MC 1

Se utilizaron placas de caseína–agarosa ricas en plasminógeno (2mg/ml), en las que se efectuó hoyos de 5 mm. Se sembró en cada hoyo 10 μ l de las muestras y se incubó durante 24 horas en cámara húmeda a 37°C. Se midió el halo de degradación. Se refirió la actividad de uPA a una curva standard de uroquinasa, en un rango de 0.1 a 50 UI/ml, y los resultados se normalizaron según el contenido proteico de las monocapas.

Tratamientos	Significancia
B vs C	S* p< 0,05
B vs D	S** p<0,01
C vs D	ns

La interacción de CT y MC produjo un aumento de $250,0 \pm 68.4\%$ en la actividad del uPA respecto del control de células solas.

i. Modulación de la actividad de uPA ejercida por el Mco resultante del cultivo de CT en McoMC

Dado que los MC en cocultivo con las CT produjeron un aumento significativo de la actividad del uPA, quisimos evaluar qué efecto producía el McoMC en presencia de las CT, y observar así, si la modulación ejercida por el contacto directo entre CT y MC es distinta a la que podrían ejercer los mediadores químicos presentes en el McoMC en contacto con las CT.

Se realizó la misma técnica que en el apartado anterior (caseinólisis radial) pero utilizando medios condicionados provenientes de cultivos de células LP07 con el agregado de McoMC. El McoMC potenció en forma no significativa la actividad del uPA (Figura 19).

Nuevamente el McoMC careció actividad medible.

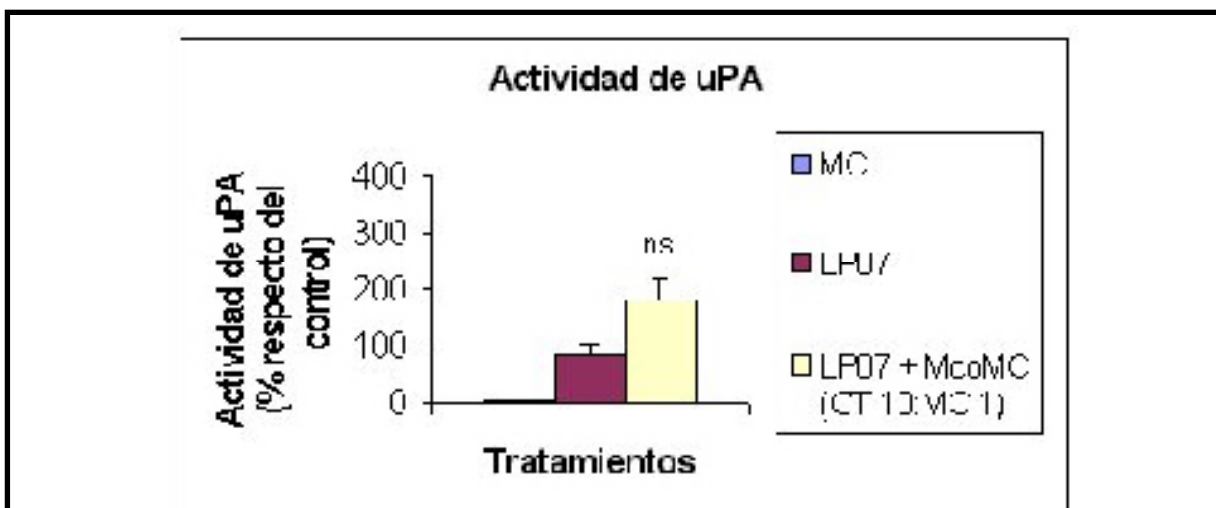


Figura 19. Actividad de uPA en Mco de cultivo de CT y McoMC

Se expresó como UI de uPA/ig de proteínas, y luego como porcentaje de actividad de uPA respecto del cultivo de CT LP07.

A- % Mco de MC (carente de actividad medible; barra equivalente a 0).

B- % Mco de CT LP07

C- % Mco resultante del cultivo de CT en McoMC (proporción CT 10: MC 1)

Se utilizaron placas de caseína-agarosa ricas en plasminógeno (2mg/ml), en las que se efectuó hoyos de 5 mm. Se sembró en cada hoyo 10 μ l de las muestras y se incubó durante 24 horas en cámara húmeda a 37°C. Se midió el halo de degradación. Se refirió la actividad de uPA a una curva standard de uoquinasa, en un rango de 0.1 a 50 UI/ml, y los resultados se normalizaron según el contenido proteico de las monocapas.

Tratamientos	Significancia
B vs C	ns

La interacción de las CT en cultivo con el McoMC produjo un aumento no significativo de la actividad de uPA.

j. Modulación ejercida por los MC sobre la proliferación de las CT *in vitro*

Como vimos en la introducción de este seminario, los MC pueden ejercer diferentes efectos biológicos sobre las CT, favoreciendo o inhibiendo la progresión tumoral.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los MC inhiben el crecimiento *in vitro* de un adenocarcinoma mamario murino (Lauria de Cidre, 1990). Teniendo en cuenta este antecedente sobre el efecto que los MC pueden ejercer sobre la proliferación de CT, decidimos investigar si afectan de algún modo el crecimiento de las CT LP07.

Para llevar a cabo este objetivo, evaluamos la actividad metabólica de las CT como medida indirecta de la proliferación, y confrontamos los resultados obtenidos con los observados por el método de recuento celular (no se muestran los datos), obteniendo por ambas metodologías una disminución significativa de la proliferación.

La *Figura 20* muestra los resultados del ensayo.

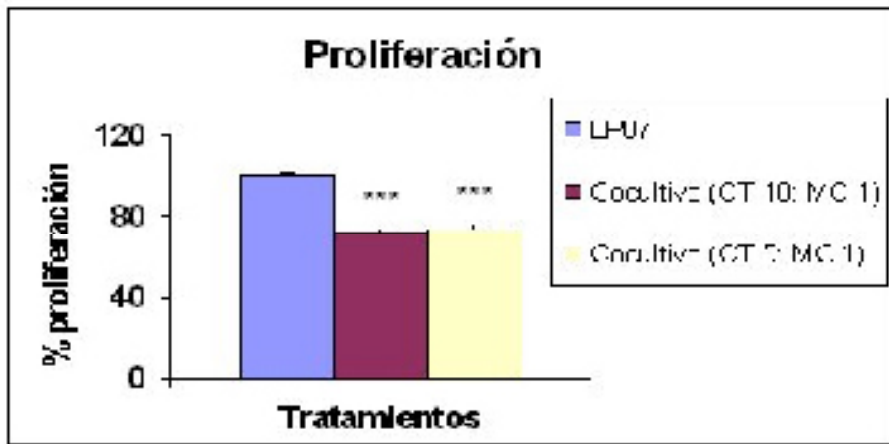


Figura 20. Acción de los MC sobre la proliferación de las CT luego de 24 horas de cultivo

Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia, y luego como porcentaje de proliferación respecto del cultivo de CT LP07.

A- % CT LP07

B- % CT y MC (CT 10: MC 1)

C- % CT y MC (CT 5: MC 1)

En una placa de 96 hoyos, se sembraron 2.5×10^4 CT por hoyo en 200 μ l de medio MEM y SFB 5%, se las dejó adherir cuatro horas en estufa a 37°C. Las células adheridas se lavaron dos veces con PBS, y se agregaron MC en proporción CT10:MC1 y CT5:MC1. En todos los hoyos se colocó 200 μ l de medio MEM sin SFB, y se incubó por 24 hs a 37°C. Los hoyos se lavaron con PBS, y se colocó en cada uno 100 μ l de medio MEM, y 20 μ l de la solución MTS-PMS en una proporción 1:20 (PMS 1: MTS 20) en la oscuridad. Se incubó nuevamente en estufa a 37°C durante 1 hora, y se realizó una lectura dual de absorbancia a 430 y 630-700 nm.

Tratamientos	Significancia
A vs B	$S^{Student}$ $p < 0,001$
A vs C	$S^{Student}$ $p < 0,001$
B vs C	ns

La acción de los MC produjo una disminución significativa de la proliferación celular a las 24hs de cultivo ($72 \pm 8.6\%$).

k. Modulación ejercida por el McoMC sobre la proliferación de las CT *in vitro*

Debido a la amplia variedad de mediadores químicos que presenta el McoMC, decidimos investigar si este tiene algún efecto sobre la proliferación celular de la línea LP07, y observar si existe alguna diferencia sobre dicha proliferación cuando las CT interactúan directamente con los MC, y cuando las CT se hallan en cultivo con el McoMC.

La *Figura 21* muestra los resultados del ensayo.

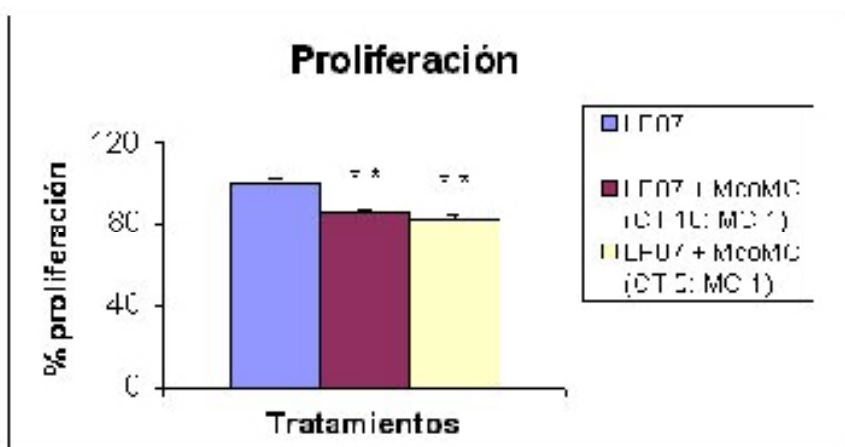


Figura 21. Acción del McoMC sobre la proliferación de las CT luego de 24 horas de cultivo.

Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia, y luego como porcentaje de proliferación respecto del cultivo de CT LP07.

A- % CT LP07

B- % CT y McoMC (CT 10: MC 1)

C- % CT y McoMC (CT 5: MC 1)

En una placa multiwell de de 96 hoyos, se sembraron 2.5×10^4 CT por hoyo en 200il de medio MEM y SFB 5%, se las dejó adherir cuatro horas en estufa a 37°C. Las células adheridas se lavaron dos veces con PBS, y se agregó el McoMC en proporción CT10:MC1 y CT5:MC1. En todos los hoyos se colocó 200 il de medio MEM sin SFB, y se incubó por 24 hs a 37°C. Los hoyos se lavaron con PBS, y se colocó en cada uno 100 il de medio MEM, y 20 il de la solución MTS-PMS en una proporción 1:20 (PMS 1: MTS 20) en la oscuridad. Se incubó nuevamente en estufa a 37°C durante 1 hora, y se realizó una lectura dual de absorbancia a 430 y 630-700 nm.

Tratamientos	Significancia
A vs B	S*** p<0,01
A vs C	S*** p<0,01
B vs C	ns

La acción del McoMC produjo una disminución significativa de la proliferación celular a las 24hs de cultivo ($82,7 \pm 12,8\%$).

Discusión

La expresión génica de las CT está controlada por varios factores ambientales, entre ellos, las células del estroma responsables de la homeostasis tisular. Estas células, entre las que se encuentran los MC, tienen influencia en el control de la tumorigenicidad y en el control de varias propiedades biológicas de las CT así como sobre las de las células normales del hospedador.

Los MC son una de las principales células efectoras del sistema inmune, y su acumulación está fundamentalmente relacionada con desórdenes alérgicos y procesos inflamatorios. Sin embargo, también se ha encontrado que su número se halla aumentado en patologías tumorales. Por ejemplo, la acumulación de MC se ha observado en diferentes tumores como carcinomas de células basales (Deng JS, *et al.*, 1996), sarcomas de tejido blando (Ueda T. *et al.*, 1988), adenocarcinomas gástricos (Caruso RA, *et al.*, 1997), y carcinomas de mama (Aaltomaa S, *et al.*, 1993), entre otros. Pese al gran número de trabajos científicos realizados en los últimos años para aclarar el significado funcional de la presencia de MC peritumorales, el tema sigue siendo objeto de controversia. Por un lado, existen considerables evidencias que los MC presentan una acción citotóxica contra ciertos tumores (Benyon RC, *et al.*, 1991; Richards AL., *et al.*, 1998) y además pueden atraer células inmunológicas al sitio del tumor (Luiten RM, *et al.*, 1996), ejerciendo así, una actividad antitumoral (Farram E., *et al.*, 1980). Pero por otro lado, también hay evidencias convincentes de que la asociación de MC a neoplasias promueven el crecimiento tumoral y la metástasis (Roche W. 1985; Imada A., *et al.*, 2000).

Esta disparidad de opinión respecto del rol de los MC frente al tumor según lo registrado en nuestro laboratorio y en otros trabajos científicos, podría deberse a que las investigaciones se llevaron a cabo en tumores de distinta estirpe y de diferente agresividad. Por lo tanto, decidimos concentrar nuestra investigación en tumores del mismo histotipo (adenocarcinomas) observando la acción de los MC en líneas tumorales de adenocarcinomas de distinta agresividad.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que los MC inhiben la incidencia tumoral *in vivo* y el crecimiento tumoral *in vitro* de un adenocarcinoma mamario murino (M3) siendo su efecto probablemente mediado por la heparina (Bertolesi *et al.*, 1995).

También otros trabajos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio (Bochoeyer D., *et al.*, 2002), han revelado que los MC pueden modificar la capacidad adhesiva, migratoria e invasiva, y aumentar la actividad de MMPs en las líneas LM3 y F3II, derivadas del adenocarcinoma mamario murino M3 (Alonso, 1996; Urtreger, 1997).

En este trabajo de licenciatura se estudió el efecto de los MC sobre distintos parámetros de la progresión tumoral en la línea LP07, derivada del adenocarcinoma de pulmón murino P07.

En primer lugar, investigamos si los tumores generados por células de la línea LP07 tienen la capacidad de reclutar MC *in vivo* del mismo modo que lo hacen los adenocarcinomas mamaros murinos ya estudiados.

Este ítem lo consideramos importante, dado que los estudios histológicos sobre el reclutamiento de MC peritumorales registrados en la bibliografía, han sugerido que éstos podrían tener valor pronóstico con respecto a la evolución de la patología tumoral. Sin embargo, mientras que algunos estudios han mostrado una correlación positiva entre un elevado número de MC y un mejor pronóstico de vida (Ueda T, *et al.*, 1988; Donhuijsen K., *et al.*, 1992; Tomita, *et al.* 2003), otros indican lo contrario (Yano H, *et al.*, 1999; Imada A., *et al.*, 2000). Por lo tanto, el significado de los MC como pronóstico aún no ha sido aclarado. De todas maneras, debe tenerse en cuenta que la asignación del valor pronóstico de los MC se relaciona también con el tipo de tumor desarrollado; así estudios histológicos realizados en adenocarcinoma de pulmón muestran un número mayor de MC que en el carcinoma de células escamosas, y éste ha sido correlacionado con un mejor pronóstico en el primer caso (Popovic L., Cerovic S., Tatic V, Brajuskovic G, Skuletic V. 2001).

Las CT pueden secretar factores quimiotáxicos para los MC (Poole TJ *et al.*, 1983; Lauria de Cidre L. *et al.*, 1990; Gruber BL. *et al.*, 1994). Se ha encontrado que varios tipos de células tumorales expresan SCF y otros factores que actúan como quimioattractantes de MC, lo cual podría proveer una explicación para el elevado número de MC asociados a los tumores (Poole, T.J. and B.R. Zetter, 1983; Turner, A. M., *et al.*, 1992).

Por otro lado, en estudios realizados en nuestro laboratorio, se observó que el número de MC peritumorales se incrementa a lo largo del tiempo de portación del tumor y que estas células se encuentran parcialmente desgranuladas (Lauria de Cidre & Sacerdote de Lustig, 1990; Lauria de Cidre, 1996), siendo muy bajo el número de MC intratumorales.

Los estudios realizados en esta tesis, mostraron que este adenocarcinoma de pulmón también recluta MC al igual que los de mama. Sin embargo, el adenocarcinoma de pulmón LP07, mostró semejanzas y diferencias con respecto a las líneas de adenocarcinoma de mama estudiadas.

En primer lugar, al igual que las líneas de adenocarcinomas mamarios, el número de MC en los tejidos peritumorales fue siempre un 240% mayor que en los animales carentes de tumor, registrándose especialmente al día 12 post trasplante un incremento de MC de 390%.

En segundo lugar, contrariamente a lo observado en las líneas tumorales de mama, los MC peritumorales reclutados por la línea LP07 disminuyeron significativamente en el día 14 de portación del tumor respecto del día 12, permaneciendo su número estable hasta el final del experimento, y siempre significativamente mayor que el control. Dicha disminución coincidió con un aumento significativo de los MC intratumorales en el mismo día 14 de portación, permaneciendo también su número estable hasta el final del experimento. Por otro lado, los MC ubicados intratumoralmente presentaron un mayor grado de desgranulación evidenciado en su menor tamaño y/o en la observación de zonas citoplasmáticas desprovistas de gránulos (Resultados, *Figura 2*, punta de flecha). Probablemente, el aumento de mastocitos se deba a una mayor liberación de factores quimioattractantes en la zona intratumoral, principalmente por parte de las CT. Dado que el SCF puede ser secretado por CT y está involucrado en la quimioatracción de los MC como así también en la inducción de su desgranulación, podría ser este factor el que se haya acumulado intratumoralmente, provocando la migración de MC peritumorales hacia esta zona, con su consecuente desgranulación. Si bien esta migración implicaría una disminución de MC peritumorales a lo largo del tiempo de portación del tumor, los resultados han mostrado que su número permanece constante. Esto podría deberse al arribo de precursores de MC a través de la vasculatura, los cuales luego de la extravasación, finalizan su maduración en el tejido peri e intratumoral. Estudios experimentales basados en la manipulación de niveles de SCF demostraron que los MC están asociados con el aumento de la angiogenesis (Zhang W., *et al.*, 2000), de modo que la gran desgranulación observada intratumoralmente podría ser inducida por las CT para facilitar la liberación de componentes angiogénicos, principalmente la heparina la cual interactúa con el FGF, que es mitógeno para células endoteliales (Bashkin P, Doctrow S., Klagsbrun M., *et al.*, 1989). Este aumento de la vascularización, podría también contribuir a la extravasación de nuevas células madre de MC hacia el tejido intratumoral.

Dado que los MC a través de sus mediadores pueden actuar en pasos críticos de la progresión tumoral como la invasión y la metástasis, en este trabajo decidimos evaluar si la adhesión, migración e invasión –parámetros involucrados en el proceso invasivo- pueden ser alterados por la acción del medio condicionado de MC.

Estudios previos en nuestro laboratorio, mostraron que el McoMC puede alterar en forma diferencial la capacidad adhesiva, migratoria e invasiva de las líneas de adenocarcinoma mamario LM3 y F3II de distinta capacidad invasiva *in situ*, y de distinta desmoplasia (Bochoeyer D., *et al.* 2002).

Los ensayos de adhesión realizados en este trabajo, mostraron que el McoMC aumentó significativamente la capacidad adhesiva de las CT LP07 a FN, mientras que no se observó un aumento significativo en la adhesión de éstas a BSA. La brevedad del tratamiento –30 minutos- indica que dicho aumento no puede ser consecuencia de un incremento en la expresión de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ –receptor para fibronectina-. Una explicación posible de esta observación, podría estar relacionada con la heparina -uno de los mediadores almacenados en los gránulos citoplasmáticos de los MC-. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en la línea del adenocarcinoma mamario murino (LM3), demuestran la participación de la heparina en la adhesión celular. Estos trabajos han probado la presencia de receptores de heparina en dicha línea (Bertolesi *et al.*, 1995), y también el efecto que ésta ejerce en la adhesión celular: la heparina incrementó la adhesión de la línea LM3 de manera dosis dependiente, y su acción fue a su vez, independiente del sustrato (*Comunicación personal; Bertolesi G. y col., enviado a publicar*). La capacidad de la heparina para modular la adhesión celular se relaciona con: a) en primer lugar, es una molécula estrechamente relacionada con el heparán sulfato, el cual es un proteoglicano abundante en la matriz extracelular, que actúa como ligando para receptores de superficie celular que transducen señales vía la ruta de la proteína quinasa C involucrada en la proliferación celular, en la motilidad, como así también en la adhesión celular (LeBaron *et al.*, 1989; Yamagata *et al.*, 1989; Woods and Couchman 1992; Woods *et al.*, 1993); b) en segundo lugar, se sabe que varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, laminina, y colágeno, poseen sitios de unión para heparina (San Antonio, 1993). Los estudios realizados por Savage y col. (2001) muestran que el efecto de la heparina en la adhesión a superficies precubiertas con estas proteínas varía de acuerdo al sustrato, al tipo celular y a las condiciones experimentales. La presencia de sitios de unión a heparina se ha encontrado en varias células normales (Castellot *et al.*, 1985), en células tumorales con diferente habilidad metastásica (Bilozur ME, *et al.*, 1990; Redini F., *et al.*, 1989), y como ya se ha mencionado anteriormente, en las células del adenocarcinoma mamario murino LM3. Por lo tanto, diferentes trabajos científicos han demostrado que receptores para heparina/heparán sulfato podrían modular la adhesión celular. Estos estudios nos permiten suponer que la heparina también podría estar involucrada en la adhesión de las células LP07. Hipotetizamos, por lo

tanto, que dado que la heparina posee un sitio de unión para FN, ésta podría actuar de puente entre las CT LP07 y la FN, incrementando así la adhesión. Para probar la factibilidad de este hecho, deberíamos determinar también si las células LP07 poseen receptores para heparina.

Es sabido que una mayor constante de afinidad entre moléculas de adhesión y sustrato se corresponde con una menor capacidad migratoria de las células (Turner S, Sherratt J., 2002). Dado que la adhesión de las CT aumentó por efecto del McoMC, hipotetizamos que la migración debería verse disminuida. Coincidentemente con lo esperado, el McoMC produjo un efecto inhibitorio de la migración. Una de las explicaciones para esta observación podría relacionarse con alguna acción del medio condicionado en la conformación del citoesqueleto de las CT. Realizamos entonces ensayos para poner de manifiesto el efecto del McoMC en la disposición del citoesqueleto de actina. Observamos que éste indujo en las CT un fenotipo sin fibras de stress, característico de células con poco movimiento, lo cual se condice con la disminución de la motilidad de las CT provocada por la acción del McoMC.

El término invasión indica la penetración de células en el territorio vecino y su ocupación. Las células cancerosas invaden el tejido normal donde se originan más allá de las restricciones de control que éste puede ejercer. La invasión celular involucra el proceso de degradación de la MEC, mediante la liberación de proteasas por las CT y las células del estroma influidas por el tumor. Tanto las MMPs como el uPA se han encontrado muy aumentadas en numerosos tumores experimentales y humanos (Hasui Y, *et al.*, 1992; Foekens JA, *et al.*, 1992; Mulcahy *et al.*, 1994; Nekarda H, *et al.*, 1994; Roomi MW, Ivanov V, Netke SP, Rath M, Niedzwiecki A., 2003).

Para estudiar la acción del McoMC en la invasión de las CT LP07, no sólo determinamos si éste podía alterar la capacidad de dichas células para atravesar el Matrigel, sino que también analizamos la actividad de las MMPs y del uPA en medios condicionados provenientes de cocultivos de CT-MC y CT-McoMC. Estas proteasas tienen una participación esencial en la invasión celular *in vivo* e *in vitro*. Como el clivaje proteolítico de los componentes de la membrana basal requiere de la participación de MMPs y uPA, con el análisis de estos tres aspectos –invasión del Matrigel, y actividad de MMPs y de uPA–, esperamos encontrar una correlación entre los mismos.

La capacidad invasiva de las CT ensayada en Cámaras Transwell de cultivo celular, disminuyó por efecto del McoMC, lo cual es congruente con la acción que éste provocó en la adhesión y en la migración (aumento y disminución, respectivamente).

El estudio producción/actividad de MMPs en CT y MC individualmente, mostró actividad gelatinolítica en ambos tipos celulares (bandas que se corresponden con PM de 116 KDa, 72 KDa, 66 KDa, 54 KDa, 50 KDa, 43 KDa y 39 KDa en CT; y bandas que se corresponden con PM de 116KDa y 15KDa en MC) revelando así la producción/actividad de estas proteasas en MC y CT. Esta última banda de bajo PM, correspondiente a una MMP-15KDa específica del MC, apareció también en el cocultivo de MC con CT.

La presencia de esta MMP resulta llamativa ya que en la bibliografía, las MMPs identificadas presentan PM mayores. Esta observación nos permite inferir la presencia de una metaloproteasa no citada hasta el momento en los MC de ratones Balb/c.

Ante la disminución de la capacidad invasiva como consecuencia de la acción del McoMC discutida más arriba, hipotetizamos que la actividad de MMPs como así también la de uPA se verían disminuidas. Sin embargo, la presencia de CT cocultivadas tanto con MC como con su Mco no produjo diferencias estadísticamente significativas, si bien hubo una tendencia inhibitoria. Esto hace pensar que en relación a las MMPs, las CT no ejercerían un estímulo hacia una desgranulación diferencial de los MC.

Contrariamente a lo esperado, con respecto a la actividad de uPA, las zimografías revelaron que los MC en cocultivo con las CT potenciaron significativamente la actividad de uPA en las CT, mientras que el McoMC no produjo un aumento significativo. Es importante señalar que los MC no presentaron actividad medible de uPA, y por lo tanto, la actividad medida corresponde solamente a la expresada por las CT.

El incremento observado en la actividad del uPA podría deberse al efecto de la heparina, ya que estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que ésta puede favorecer la liberación de uPA en células de adenocarcinoma mamario M3 (Bertolesi, 1997). Para comprobar si las observaciones en nuestro modelo pueden explicarse de igual manera habría que probar, nuevamente, si las CT LP07 tienen receptores de heparina, y en ese caso, establecer la acción de dicho mediador en la actividad del uPA.

Como se señala en la introducción de esta tesis, el uPA es una proteasa relevante en los procesos invasivos, y valores intratumorales elevados de ésta se correlacionan con una gran capacidad metastásica de las líneas tumorales, y por ende con una menor supervivencia de pacientes (Duffy MJ., 2002). Los niveles de uPA se han encontrado muy aumentados en pacientes afectados con cáncer de mama (Foekens JA., *et al.*, 1992), vejiga urinaria (Hasui Y, *et al.*, 1992), colorrectal (Mulcahy *et al.*, 1994), gástrico (Nekarda H, *et al.*, 1994), pulmonar (Pedersen H *et al.*, 1994), y gliomas (Hsu Dw, *et al.*, 1995). Además, se sabe que la invasividad de las células es 40 veces mayor cuando se encuentra el activador del plasminógeno

asociado a la membrana plasmática celular, ya que se concentra en los contactos focales de los sitios de avance del tumor (Andreasen P.A., *et al.*, 1997; Chapman H.A, 1997). Es importante destacar que en esta línea tumoral no se detectó la presencia de uPA adherido a su receptor de membrana (Urtreger, *et al.*, 2001). Por este motivo, puede ser que el uPA secretado por las CT no tenga la ingerencia esperada frente al resto de los parámetros tumorales evaluados.

Por otro parte, la respuesta diferencial observada en la actividad del uPA cuando las CT se encuentran en cocultivo con MC o con su Mco, destaca la importancia de la interacción directa de los MC con las CT. Los MC no liberan uPA a su Mco. Cuando éstos se cocultivan con CT se observa un aumento significativo de uPA en el Mco, pero cuando las CT se cultivan en McoMC no se observan diferencias significativas, si bien hay una tendencia al aumento de uPA.

Basados en nuestra experimentación podemos pensar que el contacto directo de estas dos poblaciones celulares (MC y CT) puede inducir la liberación de algún mediador mastocitario que «gatille» en las CT un aumento en la secreción/actividad de uPA. Queda el interrogante de saber si las CT son capaces de inducir la producción de uPA en los MC.

Nuestros resultados demuestran que por acción de los MC, la invasión disminuyó, las MMPs no fueron modificadas y el uPA se incrementó, lo que aparentemente sería contradictorio con lo esperado.

Dado que la interacción entre distintos tipos celulares, ya sea directa o indirectamente a través de los medios condicionados, puede variar las respuestas celulares, según el tipo de células involucradas en la relación, es probable que en este modelo, la acción de los MC se encuentre preferencialmente dirigida a generar señales celulares que involucren mecanismos de motilidad que resultan preponderantes frente a los de degradación de la matriz, tan relevantes en otros modelos.

En lo referente a la proliferación celular numerosos estudios muestran que los MC pueden afectar la proliferación de células normales y células tumorales a través de algunos de sus mediadores químicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la histamina de los MC es un factor mitógeno para las células endoteliales ya que aumenta su proliferación *in vitro* (Marks RM, Roche WR, Czerniecki M, Penny R, Nelson DS. 1986). Otros estudios realizados en carcinoma de mama mostraron que los MC a través de la histamina pueden aumentar la proliferación de las células tumorales (Bowrey PF, King J, Magarey C, Schwartz P, Marr P, Bolton E, Morris DL. 2000). Según **Yamashita y col. (1992), los MC son capaces de incrementar la proliferación de fibroblastos y de células endoteliales pulmonares mediante la liberación de heparina**. Otros trabajos científicos le confieren a los MC un rol inhibitorio de la proliferación. Por ejemplo, según Benyon (1991) los MC tienen un efecto citotóxico debido a la producción del TNF α , y Bertolesi y col. (1994) demostraron que la heparina es capaz de inhibir la proliferación de células de un adenocarcinoma mamario murino *in vitro*, sin observarse efectos citotóxicos.

Nuestros estudios han mostrado que los MC y su Mco son capaces de inhibir la proliferación *in vitro* de las CT LP07. Este efecto inhibitorio podría deberse a la acción de la heparina si las células LP07 expresaran receptores para heparina y actuaran en forma semejante a las LM3. Numerosos estudios han demostrado que la heparina inhibe la vía dependiente de la proteína kinasa C (PK-C), resultando en la supresión de la fosforilación y la actividad de la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK), mediador clave de las señales mitogénicas. De esta manera, suprime la expresión de los protooncogenes c-fos y c-myc, los cuales son esenciales en la progresión del ciclo celular (Wright TC *et al.*, 1989; Pukac, *et al.*, 1990; Pukac, *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 2000). De todas formas, no debemos olvidar que los MC poseen muchos mediadores químicos preformados y otros activados por la acción de otras células, que podrían afectar el fenómeno de crecimiento celular analizado.

En conclusión el presente trabajo ha demostrado que:

- Los tumores generados por células de la línea LP07 son capaces de reclutar MC *in vivo*, disminuyendo el número de MC peritumorales en el día 14 de portación tumoral, coincidiendo este hecho con un aumento de los MC intratumorales al mismo día. Se observó desde entonces que el número de los MC peri e intratumorales se mantuvo constante hasta el final del experimento, conservando su número superior al control. Cabe destacar que esta mastocitosis intratumoral no es común en otros modelos tumorales.
- El McoMC aumentó la adhesión de las células LP07 y congruentemente, disminuyó su capacidad migratoria e invasiva.
- El McoMC produjo modificaciones en el citoesqueleto de actina de las células LP07, induciendo un fenotipo sin fibras de stress correspondiente a células con poco movimiento.
- Los cocultivos de CT con MC o con el McoMC produjeron una disminución significativa de la proliferación *in vitro* de las células LP07.
- La presencia de MC o de McoMC en cultivo con las CT produjeron una tendencia inhibitoria sobre la expresión/actividad de MMPs.

- Los MC en cocultivo con las CT potenciaron la actividad del uPA, mientras que el McoMC no produjo un aumento significativo.

Podemos concluir que tanto los MC como sus mediadores químicos tienen la capacidad de modificar parámetros importantes de la progresión tumoral en este modelo. La expresión de enzimas involucradas en la invasión varía según se module el sistema con CT en cocultivo con MC, o con McoMC, lo que destaca la importancia de la interacción directa de los MC con las CT.

Referencias bibliográficas

- Aaltomaa S, Lipponene PK, Papinaho S and Kosma VM: Mast cells in breast cancer. *Anticancer Res* 13: 785-788, 1993.
- Adachi S, Ebi Y, Nishikawa S, Hayashi S, Yamazaki M, Kasugai T, Yamamura T, Nomura S, Kitamura Y. Necessity of extracellular domain of W (c-kit) receptors for attachment of murine cultured mast cells to fibroblasts. *Blood*. 1;79(3):650-6, 1992.
- Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.*; 6(1):96-101; 2000.
- Adams, M.L. *Connecticut Behavioral Health Risks: Factors Related to Cancer*. Hartford, CT:Connecticut Department of Public Health; 2000.
- Agrez MV, Bates RC: Colorectal cancer and the integrin family of cell adhesion receptors: current status and future directions. *Eur J Cancer*; 30: 2166-70, 1994.
- Akimoto T, Kawabe S, Grothey A, Milas L. Low E-cadherin and beta-catenin expression correlates with increased spontaneous and artificial lung metastases of murine carcinomas. *Clin Exp Metastasis*; 17; 171-6, 1999.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675, 2001.
- Alonso DF. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *Surg Oncol* 62: 288-297, 1996.
- Andersson A, Henningsson S, Lundell L and Rosengren E: Diamines and polyamines in DMBA induced breast carcinoma containing mast cells resistant to compound 48/80. *Agent Actions* 6/5: 577-583, 1976.
- Andreassen PA et al. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer*, 72:1-22; 1997.
- Arock, M., et al., Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria. *Infect. Immun.*, 66(12): p. 6030-6034, 1998.
- Au, W.W., H.Y. Oh, J. Grady, S.A. Salama, and M.Y. Heo. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37:215-25, 2001.
- Aumailley M., and B. Gayraud. Structural and biological activity of extracellular matrix *J Mol Med.* 76:253-65, 1988.
- Azizkhan RG, Azizkhan JC, Zetter BR, Folkman J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *Exp Med.*; 152(4):931-44; 1980.
- Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, et al: Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry*; 28:1737-1743, 1989.
- Baylin SB and Herman JG, DNA hypermethylation in tumorigenesis epigenetics joins genetics. *Trends Genet*: 16: 168-174, 2000.
- Benyon RC, Bissonette EY and Befus AD: Tumor necrosis factor-alpha-dependent cytotoxicity of human skin mast cells is enhanced by anti-IgE antibodies. *J Immunol* 147: 2253-2258, 1991.
- Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*; 284(5415):808-12; 1999.
- Bernal S, Baylin S, Shaper J, Gazdar A, Chen L. Cytokeleton-associated proteins of human lung cancer cells. *Cancer Res*; 43: 1798-1808, 1983.
- Bernard & Weinberg. A progression puzzle. *Nature*. 418: 823, 2002.
- Bertolesi G. E., Lauria de Cidre L., Eijan A. M. Growth inhibition of murine mammary adenocarcinoma cells by heparin and chemically modified heparins. *Tumor Biol.*, 15: 275-283, 1994.
- Bertolesi G. E., Lauria de Cidre L., Sacerdotee de Lustig E., Eijan A. M., Heparin receptors in two

- murine mammary adenocarcinoma with different metastatic ability. Relationship with growth inhibition. *Cancer Letter*, 90 (2): 123-131, 1995.
- Bertolesi G. E., Sockert J. C. and Lauria de Cidre L: Microfluorometry and image analysis of peritoneal mast cells reveals differences in the morphology and content of sulfated polyanions between normal and tumor-bearing mice. *J Int Oncol*, 11: 1221-1225, 1997.
 - Bilozur ME, Biswas C. Identification and characterization of heparan sulfate-binding proteins from human lung carcinoma cells. *J Biol Chem.*;265(32):19697-703; 1990.
 - Birkedal-Hansen H, Moore WG Matrix metalloproteases; a review. *Crit Rev Oral Biol. Med*; 4: 197-250, 1993.
 - Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem Biophys Acta*; 89: 1032, 1990.
 - Bochoeyer D., Gleiser M., Daroqui C., Lauria de Cidre L. Los MC modulan diferencialmente el comportamiento invasivo de adenocarcinomas mamarias de distinto fenotipo. XVIII Jornadas Multidisciplinarias de Oncología. Instituto de Oncología. «Angel Roffo», 26-28 de agosto 2002.
 - Bohm M, Totzeck B, Birchmeier W, Wieland I. Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis*; 12: 55-62, 1994.
 - Boudreau N, and M.J. Bissell. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol.* 10(5):640-6. Review, 1998.
 - Bowrey PF, King J, Magarey C, Schwartz P, Marr P, Bolton E, Morris DL. **Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect?**. *British Journal of Cancer* 82, 167-170. doi:10.1054/bjoc.1999.0895; 2000.
 - Boyce, J.A. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol* 111:24, 2003.
 - Bradding P, Feather IH, Howard PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JPA, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, Bullock GR, Church MK and Holgate ST: Interleukin-4 is localised to and released by human mast cells. *J Exp Med* 176: 1381-1385, 1992.
 - Bradding P, Okayama Y, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on their cytokine content. *J Immunol*, 1995.
 - Brodt P, Dedhar S, 1996 The integrins: mediators of cell-extracellular matrix and intercellular communication. In: *Pina Brodt. Cell adhesion and invasion in cancer metastasis*. Springer, Heidelberg, 1996.
 - Brooks, PC *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α v β 3. *Cell* 85; 683-693, 1996.
 - Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ. Cellular activation of the 72kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* ; 43: 163-170, 1993.
 - Browner MF, Smith WW, Castelahno AL Matrylisin inhibitor complexes: Common themes among metalloproteases. *Biochemistry*; 34: 6002-6010, 1995.
 - Brownson, R.C., P.L. Remington, and J.R. Davis. *Chronic Disease Epidemiology and Control, 2nd Edition*. Washington, DC: American Public Health Association, 1998.
 - Brummer J, Neumaier M, Gopfert C, Wagener C: Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene*; 11: 1649-55, 1995.
 - Burtin C, Scheinmann P, Salomon JC, Lespinats G and Canu P: The influence of intraperitoneal injections of histamine on tumour growth in fibrosarcoma-bearing mice. *Cancer Lett* 12: 195-201, 1981.
 - Burtin C, Ponvert C and Fray A: Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in W/WV, WV/+ and +/+ mice. *J Nat Cancer Inst* 74:671-674, 1985.
 - Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Völler M, Smit FP, Schalken JA: The genes for the calcium-dependent cell adhesion molecules P- and E- cadherin are tandemly arranged in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun*; 203: 291-1294, 1994.
 - Caldas C. Molecular assessment of cancer. *BMJ.*;316(7141):1360-3; 1998.
 - Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J: Expression and function of beta 1 and alpha y beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*; 58: 216-25, 1995.
 - Carlin B., Jaff R., Bender B., Ching A., 1981 Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 256: 5209-5218, 1981.
 - Carney DN, Hansen HH. Non-small-cell lung cancer—stalemate or progress?. *N Engl J Med.*;343(17):1261-2; 2000.
 - Caruso RA, Fedele F, Rigoli L and Inferrera C: Mast cell interaction with tumor cells in small early gastric cancer: ultrastructural observations. *Ultrastruct Pathol* 21: 173-181, 1997.
 - Castellot JJ Jr, Wong K, Herman B, Hoover RL, Albertini DF, Wright TC, Caleb BL, Karnovsky MJ. Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 124(1):13-20;1985.

- Castells, M.C. Mast Cells: Molecular and Cell Biology. Rev. Esp. *Alergol Inmunol Clín*, Vol.12 Nº6, pp 327-339, 1997.
- Caufield, K.P., Hein A., Moser G., and Sher A. Light and electron microscopic appearance of rat peritoneal mast cells adhering to schistosomula of *Schistosoma mansoni* by means of complement or antibody. *J Parasitol* 63:776, 1981.
- Chapman H A. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 714:724;1997.
- Charpin C, García S, Bonnier P et al: Reduced Ecadherin immunohistochemical expression in node negative breast carcinomas correlates with 10-year survival. *Am J Clin Pathol*; 109: 431-8, 1998.
- Chauhan SS, Goldstein LJ. Expresion of cathepsin L in human tumors *Cancer Res.*; 51: 1478-1481, 1991.
- Choi, K., Claman, H. Mast cells, fibroblast and fibrosis. *Immunol. Res.* 6: 145-152, 1987.
- Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(10):5579-83, 1998.
- Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Gillis S, Zsebo KM, Galli SJ, Lichtenstein LM. The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils *J Immunol.*;149(2):599-608, 1992.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via cAMP-dependent mechanism. *J Chem Biol*; 270: 13453-13459, 1995.
- Coussens, LM., et al., Infammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* 13 (11): p.1382-1397, 1999.
- Csaba G, Acs T, Horvath C and Mold K: Genesis and function of mast cells. Mast cells and plasmacyte reaction to induced homologous and heterologous tumours. *Br J Cancer* 15: 327-335, 1961.
- Dabbous MKh, Walker R, Haney L, Carter LM, Nicolson GL, Wooley DE. Mast cells and matrix degradation at sites of tumor invasion on rat mammary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer.* 54: 459:464, 1986.
- Dabbous MKh, Woolley DE, R, Haney L, Carter LM, Nicolson GL, Host-mediated effectors of tumor invasion: role of mast cells in matrix degradation. *Clin Expl Metastasis* 4:141-152, 1986.
- Dabbous MK, Honey L, Nicolson GL, Eckley D and Wooley DE: Mast cell modulation of tumour cell proliferation in rat mammary adenocarcinoma 13762NF. *Br J Cancer* 63:873-878-, 1991.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA & Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584, 1994.
- Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*; 44:139-266, 1985.
- Darby S. Tobacco: the importance of relevant information on risk. **Journal of the Royal Statistical Society: Series A** (Statistics in Society) (166) 225; 2003.
- Dastych J, Metcalfe DD. Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J Immunol.*;152(1):213-9, 1994.
- Dehner LP, Mills A, Talerma A, Billman GF, Krous HF, Plaiz CE. Germ cell neoplasm of head and neck soft tissues: a pathologic spectrum of teratomatous and endodermal sinus tumor. *Hum Pathol*, 21: 309:318, 1990.
- DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell B. The presence and posible functions of the matriz metalloproteinases activator protein in developing enamel matrix. *Biochem J*; 108:671-682, 1989.
- Deng JS, Brod BA, Saito R, Tharp MD. Immune-associated cells in basal cell carcinoma of skin. *J Cutan Pathol* 23: 140-146, 1996
- Deryugina, Ratnikox, Postnova, Rosanov & Strongin, Processing of integrin α v subunit by MT1-MMP stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of FAK. *J Biol. Chem*; (epub ahead of print), 2001.
- De Vita F, Infusino S, Auriemma A, Orditura M, Catalano G. Circulating levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep*; 5:393-6; 1998.
- Dexter T., Stoddart R., Qazzaz, S. What are mast cell for? *Nature* 291 (5811):110-111, 1981.
- Dimitriadou, V. and M. Koutsilieris, Mast cell-tumor cell interactions: for or against tumour growth and metastasis? *Anticancer Res.*17: p. 1541-1550, 1997.
- Donhuijsen K., Sastry B., Volker B., Leder L. D., Mast cells frequency in soft tissue tumor-relation to type and grade of malignancy. *Pathol Res Prac.*; 188: 61-6, 1992.
- Dowdall, J.F., Winter, D.C., Braid, A. W., Bouchier-Hayes, D. Biological role and clinical implications of mast cells in surgery. *Surgery* 132: 1-4, 2002.

- Duffy MJ Urokinase plasminogen activator and malignancy. *Fibrinolysis*; 7: 295-302; 1993.
- Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochemical Society Transactions* Vol 30, part 2; 2002.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown KF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hypermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*; 237: 97-132, 1999.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev*; 2: 161-174, 2002.
- Ehrlich, P., Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung, Univ of Leipzig, Leipzig, 1878.
- Eliseenko VI, Skobelkin OK, Vhegin VM & Degtiarev MK. Microcirculation and angiogenesis during wound healing by first and second intention. *Bulletin of the Experimental Biology and Medicine* 105: 289-292, 1998.
- Enerbäck, L., Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 66 (3): p. 289-302, 1996.
- Farram E., Nelson D.S. Mouse mast cells and antitumor effectors cells. *Cell. Immunol.* 52: 294-301, 1980.
- Farram E., Nelson D.S. Mouse mast cells and antitumor effectors cells. *Cell. Immunol.* 55: 294-301, 1989.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*; 18: 4-25, 1997.
- Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem*; 259: 9783-9789, 1984.
- Fidler, I. J., Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor cell emboli labelled with ¹²⁵I-5-iododeoxyuridine . *H. Natl. Cancer. Inst.*, 45: 773-782, 1970.
- Fidler, I. J., Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 38: 2651-2660, 1978
- Fidler, I. J, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*; 217: 998-1003, 1982
- Fidler, I. J., Critical factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: twenty-eight. D.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 50: 6130-6138, 1990.
- Fidler, I. J., The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70, 498-505, 2002.
- Fisher ER and Fisher B: Role of mast cells in tumor growth. *Arch Pathol* 79: 185-191, 1965.
- Fisher ER, Sass E, Watkins G *et al.*, Tissue mast cells. *Breast Cancer Res Treat*; 5(3): 285-291, 1985.
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F *et al* Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res*; 52: 6101-6105, 1992.
- Foekens JA, Schmitt M, Van Putten WL, Peters HA, Kramer MD, Jänicke F *et al* Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol*; 12: 1648-1658, 1994.
- Folkman, J., Lung DM & Becker FE. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16: 453-467, 1963.
- Folkman J.: Regulation of angiogenesis: a new function of heparin. *Biochemical Pharmacology* 43: 905-909, 1985
- Folkman, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?. G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 46: 467-473, 1986.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic Factors. *Science* ;235(4787):442-7, 1987.
- Folkman J, Shing Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol.* ; 313:355-64; 1992.
- Folkman J: Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol* 12: 441-443, 1994.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. In *The Molecular Basis of Cancer*, pp 206-232. Eds J Mendelsohn, PM Howley, MA Israel & LA Liotta. Philadelphia: Saunders, 1995.
- Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med.*; 2(2):167-8, 1996.
- Forgacs E., S. Zochbauer-Muller, E. Olah, and J.D. Minna. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathology Oncology Research* 7:6-13, 2001.
- Forsberg, E., G. Pejler, M. Ringvall, C. Lunderius, B. Tomasini-Johansson, M. Kusche-Gullberg, I. Eriksson, J. Ledin, L. Hellman, and L. Kjellen. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400:773, 1999.

- Franks, L.M., Teich NM. Introduction of the cellular and molecular biology of cancer, 3rd ed. New York. Oxford University Press, 1997.
- Frixen C, Bahrens J, Sachs M. E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cell lines. *Cancer Res*; 54: 6282-7, 1994.
- Galli, S.J: Biology of disease. New insights into «the riddle of the mast cells»: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 62: 5-33, 1990.
- Galli, S. J. Mast Cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7:32, 2000
- Gasparini G. The rationale and future potential for angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*; 58: 17-37, 1999.
- Garcia M. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells*; 14-642-650, 1996.
- Ghiara P., Boraschi D., Vill L, Scapigliati G, Taddei C and Taglabue A: *In vitro* generated mast cells express natural cytotoxicity against tumour cells. *Immunol* 55: 317-324, 1985.
- Ginsberg R, Vokes E, Rosenweig, K. Non-small cell lung cancer. In V DeVita, S Hellman, & S Rosenberg (Eds.), *Cancer: Principles and practice of oncology* (6th ed, pp 925-975). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- Goldstein, S. M., C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, and B. U. Wintroub. Human mast cells carboxypeptidase. Purification and characterization. *J Clin Invest* 83: 1630, 1989.
- Goldstein, S. M., J. Leong, L. B. Schwartz, and D. Cooke. Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase. *J Immunol* 148: 2475, 1992.
- Gordon, J. R., and S. J. Galli. Mast cells as a source for both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 326:274-275, 1990.
- Goretzki L. SchmittM. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett*; 297:112-118, 1992.
- Gravidovic J, Murphy G. The role of plasminogen activator in cell-mediated collagen degradation. *Cell Biol. Int* ; 13: 367-375, 1989.
- Greenlee R, Hill-Harmon M, Murray T, Thun M. Cancer Statistics. *CA: A cancer Journal for clinicians*, 51: 15-36, 2001.
- Grothey A, Heistermann P, Philippou S, Voigtmann R. Serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) in patients with non-small-cell lung cancer: correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage. *Br J Cancer*; 77: 801-7, 1998.
- Gruber B.L., Marchese M. J., Kew R.R. Transforming growth factor beta-1 mediated mast cell chemotaxis. *J. Immunol.* 152:5860-5867; 1994.
- Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today*; 5:172-177, 1999.
- Gumbiner BM: Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*; 84:345-357, 1996.
- Hanahan and Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
- Hanahan DA. Flanking attack on cancer. *Nature Medicine*; 5: 1359-1364, 1999.
- Hart, I. R., and Fidler, I. J. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res.*, 40: 2281-2287, 1980.
- Hart IT. Adhesion receptors and cancer. In: Horton MA, *Molecular Biology of cell adhesion molecules*. Chichester: Jhon Wiley and sons: 87-98, 1996.
- Hartveit, F. Mast cell and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequences. *J. Pathol.* 134: 7-11, 1981.
- Hasui Y, Marutsuka K, Suzumiya J, Kitada S, Osada Y, Sumiyoshi A The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*; 50: 871-873, 1992.
- Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*; 107: 2373-2379, 1994.
- He CS, Wilhem SM, Pentland AP. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 2632-2636, 1989.
- Hebbbar M, Revillion F, Louchez MM et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E selectin levels in gastric cancer. *Br J Cancer*; 78: 267-71, 1998.
- Hebbbar M, Revillion F, Louchez MM et al: Prognostic value of circulating soluble E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*; 5: 1427-33, 1999.
- Heim S. and Mitelman F.: *Cancer cytogenetics*. Alan R. Liss Inc. 1987.
- Henderson WR, Chi EY, Jong E.C. and Klebanoff SJ: Mast cell-mediated tumor cell cytotoxicity. Role of the peroxidase system. *J Exp Med* 153: 520-524, 1981.

- Heppner, G. Tumor heterogeneity. *Cancer Res.*, 44: 2259-2265, 1984.
- Hinson J, Perry M. Small cell lung cancer. *CA Cancer J Clin*; 43:216-225; 1993.
- Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech*; 60(1):64-9, 2003.
- Holford, T.R., Zhang Z., Zheng T., and McKay L.A.. A model for the effect of cigarette smoking on lung cancer incidence in Connecticut. *Statistics in Medicine* 15:565-80, 1996.
- Holgate, S.T., The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clin. Exp. Allergy*. 30 Suppl 1: p: 28-32, 2000.
- Hsu Dw, Efirid JT, Hedley-White ET Prognostic role of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res* ; 147: 114-123, 1995.
- Huang C., Sali A., and Stevens R.L.. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation *J Clin Immunol* 148:2475, 1998.
- Humphries D. E., Wong G. W., Friend D.S., Gurish M. F., Qiu W. T., Huang C., Sharpe A. H., and Stevens R. L.. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells *Nature* 400: 769, 1999.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*; 69: 11-25, 1992.
- Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T The activation of prourokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem*; 261: 3486-3489, 1986.
- Imamura A, Tsai M, Ando A, Wershil BK, Galli SJ. The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *Am J Pathol.*; 144(2):321-8, 1994.
- Imada A, Shijubo N, Kojima H, Abe S. Mast cell correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*; 15: 1087-93, 2000.
- Imai Y, Singer MS, Fennie C, Lasky LA, Rosen SD. Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *Cell Biol.* 113, 1213-1221, 1991.
- Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and cell adhesion. *Adv Immunol*; 58: 345-417, 1995.
- Inamura N, Mekori YA, Bhattacharyya SP, Bianchine PJ, Metcalfe DD. Induction and enhancement of Fc(epsilon)RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *J Immunol*;160: 4026-33, 1998.
- Ionov I. Influence of inhibitors mast cell activity on carcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer* 41:777-778; 1987.
- Irani, A.A., *et al.*, Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 83 (12): p. 4464-4468, 1986.
- Irani, A.M., *et al.*, Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J. Histochem Cytochem.* 37 (10): p. 1509-1515, 1989.
- Jänicke F, Graeff H, Schmitt M Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemost*; 17: 303-312, 1991.
- Jemal A, Thomas A, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*; 52:23-47; 2002.
- Johnson MD, Torri JA. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cell. *Cancer Res*; 53: 873-877, 1993.
- Johnston S.L., Freezer N.J., Ritter W., O' Toole S., and Howarth P.H. Prostaglandin D2-induced bronchoconstriction is mediated only in part by the thormboxane prostanoid receptor. *Eur Respir J* 8: 411, 1995.
- Jones PA and Laird PW, Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21: 167-167, 1999.
- Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol*;29:2645-9, 1999.
- Karlson, U. Cutting edge-cleavege specificity and biochemical characterization of mast cell serine proteases. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 870. 55pp. Uppsala. ISBN 91-554-5699-5; 2003.
- Kessler DA, Langer RS, Pless NA, Folkman J. Mast cells and tumor angiogenesis. *Int J Cancer*; 18(5):703-9; 1976.
- Khorravi-Far R, Campbel S, Rossman KL, Der CJ. Increasing complexity of Ras Signal Transduction: Involvement of Rho Family Proteins. *Adv Cancer Res* ; 72: 55-105; 1998.
- Kibbelaar RE, Moolenaar KE, Michalides RJ, Van Bodegom PC, Vanderschueren RG, Wagenaar SS, Dingemans KP, Bitter-Suermann D, Dalesio O, Van Zandwijk N, *et al.* Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma. *Eur J Cancer*; 27(4):431-5; 1991.

- Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res.*;60(19):5410-3; 2000.
- Kirshenbaum, A.S., *et al.*, Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J. Immunol.* 146: p. 1410-1415, 1991.
- Kirshenbaum, A.S., *et al.*, Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34+, c-kit (+), and expresses aminopeptidases N (CD13). *Blood.* 84 (8): p. 2333-42, 1999.
- Kitamura, Y., *et al.*, Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature.* 268 (5619): p. 442-443, 1977.
- Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M *et al* Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA). *J Biol Chem*; 266: 5147-5152, 1991.
- Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type I on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res*; 54: 6539-6548, 1994.
- Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies of prevention and intervention. *Cancer Res.* 51: 1865-1872, 1995.
- Kolset, S. O., and J. T. Gallagher. Proteoglycans in haemopoetic cells. *Biochim Biophys Acta* 1032:191, 1990.
- Kreyberg L, Liebow AA, Uehlinger EA: International Histologic Classification of Tumours: No. 1. Histological Typing of Lung Tumours. Geneva: *World Health Organization*, 2nd ed., 1981.
- Lauria de Cidre, L., Sacerdote de Lustig, E. Mast cell kinetics during tumor growth. *Lab. Invest.* 65: 525-532, 1990.
- Lauria de Cidre L., Eijan A. M., Bertolesi G. E., Isturiz M., Sacerdote de Lustig E. Influence of mast cell on tumor growth of two murine mammary adenocarcinomas. *Tumor Biol.* 17:345-353, 1996.
- LeBaron RG, Esko JD, Woods A, Johansson S and Hook M: Adhesion of glycosaminoglycan-deficient Chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrate. *J Cell Biol* 106: 945-52, 1988
- Ledermann JA, Pasisni F, Olabiran Y, Pelosi G. Detection of neural cell adhesion molecule (NCAM) in serum of patients with small-cell lung cancer (SCLC) with «limited» or «extensive» disease, and bone marrow infiltration. *Int J Cancer*, Supl 8: 49-52, 1994.
- Lehti, K., Lohi, J., Valtanen, H., Keski-Oja, J.. Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem. J.* 334:345-353, 1998.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649, 1998.
- Levi *et al.* Matrix metalloproteinase 2 release active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 7069-7074, 1996.
- Liaudet E, Derocq. Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. *Cell growth Differ*; 6: 1045-1052, 1995.
- Liekens S, de Clerq E & Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*; 61: 253-270, 2001.
- Lin TJ, Isekeutz TB, Marshall JS. Human mast cells transmigrate through human umbilical vein endothelial monolayers and selectively produce IL-8 in response to stromal cell-derived factor-1 alpha. *J. Immunol*, 165(1): p. 211-220, 2000.
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*; 284(5751):67-8, 1980.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R. The effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res*; 41: 4629-4636, 1981.
- Liotta, L.A, Tumor invasion and metastasis- Role of extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Research* 46: 1-7, 1986.
- Luiten RM, Fleuren GJ, Wamaar Son, Litvinov SV: Target-specific activation of mast cells by immunoglobulin E reactive with a renal cell carcinoma-associated antigen. *Lab Invest* 74: 467-475, 1996.
- Lutzelschwab, C., M. R. Huang, M. C- Kulbberg, M. Aveskogh, and L. Hellman. Characterization of mouse mast cell protease-8, the first member of a novel subfamily of mouse mast cell serine proteases, distinct from both the classical chymases and tryptases. *Eur J Immunol* 28:1022, 1998.
- Mangel WF Better reception for urokinase. *Nature*; 344: 488-489, 1990.
- Marks RM, Roche WR, Czerniecki M, Penny R, Nelson DS. Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. *Lab Invest.*;55(3):289-94; 1986.

- Markwardt F and Klocking HP: Heparin-induced release of plasminogen activator. *Haemostasis* 6: 370-374, 1977.
- Marone, G., S.J. Galli, and Y. Kitamura, Probing the roles of mast cells and basophils in natural and acquired immunity, physiology and disease. *Trends Immunol.* 23(9):p.425-7, 2002.
- Maronpot R. The potential of genetically altered mice as animal model for carcinogen identification. *Toxicol. Pathol.* 26; 576-581; 1998
- Mastorides S, Maronpot R, Carcinogenesis. *Handbook of Toxicologic Pathology*, Second Edition, Volume 1, 2002.
- Mc Carthey, J. B., Basara, M. L., Palm, S.L., Sas, D.F., Furcht, F.T. The role of cell adhesion proteins, laminin, and fibronectin in the movement of malignant and metastatic cells. *Cancer Metastasis Review* 4: 125-132, 1985.
- McKerrow J., Bhargava V., Hansell E *et al.* A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol. Medicine*, 6: 450-460, 2000.
- Meininger, C.J., Zetter B.R., Mast cells and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol*, 2(2): p.73-79, 1992.
- Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR. The c-kit receptor ligand functional as a mast cell chemoattractant. *Blood.* 79 (4): p. 958-963, 1992.
- Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, Mast cells in innate immunity. *Immunol. Rev.*, 173: p.131-140, 2000.
- Melis M, Spatafora M, Melodia A, Pace E, Gjomarkaj M, Merendino AM, Bonsignore G. ICAM-1 expression by lung cancer cell lines: effects of upregulation by cytokines on the interaction with LAK cells. *Eur Respir J*; 9: 1831-8, 1996.
- **Melis M, Pace Elisabetta, Siena Liboria, Spatafora Mario, Tipa Annalisa, Profita Mirella, Bonanno Anna, Vignola Antonio M., Bonsignore Giovanni, Mody Christopher H. and Gjomarkaj Mark.** Biologically Active Intercellular Adhesion Molecule-1 Is Shed as Dimers by a Regulated Mechanism in the Inflamed Pleural Space. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 167. pp. 1131-1138, 2003.
- Melloni, B., A. Vergnenegre, P. Lagrange, and F. Bonnaud. Radon and domestic exposure (French with English abstract). *Revue des Maladies Respiratoires* 17:1061-71, 2000.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori Y. Mast cells. *Physiol Rev* ; 77: 1033-79, 1997.
- Miles LA, Plow EF Plasminogen receptors: ubiquitous sites for cellular regulation of fibrinolysis. *Fibrinolysis*; 2: 61-71, 1988.
- Miyasaka M: Cancer metastasis and adhesion molecules. *Clin Orthop*; 312: 10-8,1995.
- Montesano R, Pepper MS, Mohlesteinlein U, Risau W, Wagner PP, Orci T Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T-oncogene. *Cell*; 62: 435-445, 1990.
- Mountain CF. Assessment of the role of surgery for control of lung cancer. *Ann Thorac Surg*; 24:365-71 39:453-63, 1997.
- Mueller, L.M., M.M. Hynes, H. Li, and F. Amadeo. In preparation. *Mortality and Its Risk Factors in Connecticut*,. Hartford, CT: Connecticut Department of Public Health, Division of Policy, Planning, and Analysis (see Appendix C) 1989-1998.
- Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP *et al* Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer. *Lancet*; 344: 583-584, 1994.
- Nakano, T., *et al.*, Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med.*, 162(3). p: 1025-1043, 1985.
- Naslinski C and Kierska D: Histamine in C3H/W mice carrying spontaneous tumors of the mammary gland. *Agents Actions* 33: 192-194, 1991.
- Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, *et al* Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res*; 54: 2900-2907, 1994.
- Nicolson, G.L., Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumor cells. *Cancer Metastasis Rev.*, 3: 25-42, 1984.
- Nicolson, G. L., Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 948: 175-224,1988.
- Nilsson G., Metcalfe D.D. Contemporary issues in mast cell biology. *Allergy Asthma proc.* 17 (2):p:59-63, 1996.
- Nilsson, G., *et al.*, Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur. J. Immunol.*, 27: p: 2295-2301, 1997.

- Nilsson G., J.J. Costa, and D.D. Metcalfe, Mast cells and basophils in inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, K.I. Gallin and R. Snyderman, Editors, Lippincott-Raven publications: Philadelphia, PA. P. 97-117, 1999.
- Nilsson, G., *et al.*, C3a and C5a are chemotaxins for mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J. Immunol*, 105 (5): p.847-59, 2000.
- Nordlund J., Askenase P. The effect of histamine, antihistamine, and a mast cell stabilizer on growth of could-man melanoma cells in DBA/2 mice. *J. Invest. Dermatol.* 16:28-31, 1983.
- Norrby, K. Evidence of mast cell histamine being mitogenic in intact tissue. *Agent Actions.* 16: 287-291, 1985.
- Norrby K, Jakobsson A, Sorbo J. Mast-cell-mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*;52(3):195-206; 1986.
- Norrby, K. Mast cell and angiogenesis. *APMIS* 110: 355-371, 2002.
- Novak ER, Lambrou CD, Woodruff JD, 1975. Ovarian tumors in pregnancy. An ovarian tumor registry review. *Obstet Gynecol.*;46(4):401-6, 1975.
- Ohtsu, H., and T. Watanabe. New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 305:443, 2003.
- Okada A, Bellocq JP, Rouyer N. 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, 1995.
- Olsson, N. Mast cell migration in inflammatory diseases. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine.* 1292. 55 pp. Uppsala. ISBN. 91-554-5762-2; 2003.
- Orme ME, Chaplain MA. mathematical model of the first steps of tumour-related angiogenesis: capillary sprout formation and secondary branching. *IMA J Math Appl Med Biol.*;13(2):73-98, 1996.
- Osaki T, Mitsudomi T, Yoshida Y, Oyama T, Ohgami A, Nakanishi K, Nakanishi R, Sugio K, Yasumoto K. Increased levels of serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol*; 5: 107-13, 1996.
- Pagget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571-573, 1889.
- Parwaresch MR, Horny HP and Lennert K: Tissue mast cells in health and disease. *Path Res Pract* 179: 439-461, 1985.
- Passlick B, Pantel K, Kubuschok B, Angstwurm M, Neher A, Thetter O, Schweiberer L, Izbicki JR. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on non-small cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer*; 32A: 141-5, 1996.
- Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH et al Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res*; 54: 4671-4675, 1994.
- Pegg AE, 1999. DNA repair pathways and cancer prevention. *Adv Exp Med Biol.*;472:253-67; 1999.
- Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler, Thrombosis and Vascular Biology*; 7: 605-619, 1997.
- Peto J., Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* (411) pp 390-395; 2001.
- Pignatelli M, Vessey CJ: Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol*; 25: 849-56, 1994.
- Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Kloppel G, Lemoine NR, 1994 Loss of membranous E-cadherine expression in pancreatic cancer; correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol*; 174 (4): 243-8, 1994.
- Plow EF, Miles LA. Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell Differ Dev*, 32:293-298, 1990.
- Ponder B. A. Cancer genetics. *Nature* vol 411 (336-341); 2001.
- Poole, T.J. and B.R. Zetter Stimulation of rat peritoneal mast cells migration by tumor-derived peptides. *Cancer Res.*, 43 (12Pt 1): p.5857-5861, 1983.
- Popovic L., Cerovic S., Tatic V, Brajkusovic G, Skuletic V. Tumor margin and mast cell presence in fibrohistiocytic tumor. *Archive of Oncology*; 9(Suppl 1): 136-7; 2001.
- Poste, G & Fidler, I.J., The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283. 139-146, 1979.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*;7(3):165-97; 2000.
- Pukac LA, Castlot JJ Jr, Wright TC Jr, Caleb BL, Karnovsky MJ. Heparin inhibits c-fos and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Regul.*;1(5): 435-43; 1990.

- Pukac, LA., Ottlinger, M.E., Karnovsky, M.J. Heparin suppresses specific second messenger pathways for protooncogene expression in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 267: 3707-3711, 1992.
- Redini F, Moczar E, Antoine E, Poupon MF. Binding and internalization of exogenous glycosaminoglycans in weakly and highly metastatic rhabdomyosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 991(2):359-66; 1989.
- Renan MJ, 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*; 7(3):139-46, 1993.
- Retera JM, Leers MP, Sulzer MA, Theunissen PH. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol* ; 51: 891-4, 1998.
- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H et al Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Inter J Oncol*; 13: 893-906, 1998.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F. Review: The rol of Mast Cells in tumour angiogenesis. *British Journal of Haematology*. 115: 514-521, 2001.
- Richards AL, Okumo T, Takagaki Y, Djeu JY: Natural cytotoxic cell-specific factor produced by IL-3 dependent basophilic/mast cells. Relationship to TNF. *J Immunol* 141: 3061-3066, 1998
- Roa Iván E, Miguel Villaseca H, Juan Araya, Juan Roa S, Xabier de Aretxbala U, Marcos Miranda U. Moléculas de adhesión y cáncer. *Rev. Chilena de Cirugía* Vol 53-Nº5 pp 504-510, 2001.
- Robbye-Ryen, M. and M. Brown, The Role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 14 (6): p:728-33, 2002.
- Roche, W. Mast cell and tumor: the specific enhancement of tumor porliferation in vitro. *Am. J. Pathol.*, 119: 57-64, 1985.
- Roche WR: The nature and significance of tumour-associated mast cells, *J Pathol* 148: 175-182, 1986.
- Roche WR: Mast cells and tumour angiogenesis: the tumour-mediated release of an endotelial growth factor from mast cells. *Int J Cancer* 36: 721-728, 1994.
- Rochefort H, Capony F, Garcia M. Cathepsin D in breast cancer: from molecular and cellular biology to clinical applications. *Cancer Cells*;2(12):383-8; 1990.
- Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: A tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer*; 28º: 1780-1783, 1992.
- Rojo, Marta Izquierdo. *Biología molecular del cáncer*. Editorial Síntesis, SA, 1995.
- Roomi MW, Ivanov V, Netke SP, Rath M, Niedzwiecki A. A Novel In Vitro Bioassay for Screening Matrix Metalloproteinase Activity in Human Cancer Cell Lines. Presented at: 94th Annual Meeting of AACR (American Association for Cancer Research), Washington D.C., July 11-14; 2003.
- Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A*;76(3):1218-22; 1979.
- Ruddon, R.W, *Cancer Biology*. Third Edition. Oxford University Press. Chapters 1 and 11, 1995.
- Ruoslahti, E. 1996 Así se propaga el cáncer. *Investigación y Ciencia*, noviembre 1996.
- Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann Rev Cell Dev Biol*; 12: 697-715. Review, 1996.
- Saksela O, Rifkin DB., Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Ann Rev Cell Biol.*, 4: 93-126, 1988.
- San Antonio JD. Slover J, Lawler J, Karnovsky MJ and Lander AD: Specificity in the interactions of extracellular matrix proteins with subpopulations of the glycosaminoglycan heparin. *Biochemistry* 32: 4746-55, 1993
- Satcher, D. Why we need an international agreement on tobacco control. *American Journal of Public health* 91:191-3, 2001.
- Savage JM, Gilotti AC, Granzow CA, Molina F and Lowe-Krents LJ: Antibodies against a putative heparin receptor slow cell proliferation and decrease MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 187: 283-93, 2001.
- Schardt C, Heymanns J, Schardt C, Rotsch M, Havemann K. Differential expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer cell lines of various histological types. *Eur J Cancer* ; 29A: 2250-5,1993.
- Schitteck A., Abon Issa H, Stafford JH, Young D, Zwilling B and James AG: Growth of pulmonary metastases of B16 melanoma in mast cell- free mice. *J Surg Res* 38: 24-28, 1985.
- Schmit A, Hall MN. Signalin to the actin cytoeskeleton. *Anu Rev Cell Dev Biol*; 14:305-35, 1998.
- Schontal A, Herlich P, Rahmsdorf HJ. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collalgenase by other onogenes and phorbol ester. *Cell*; 54: 325:334, 1988.

- Schreiber, Gilbert, Mc Crory, Douglas. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer. *CHEST* vol 123 N° 1 Pag 115 S- 128 S, 2003.
- Segal, D. M., J.D. Taurog, and H. Metzger. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 2993, 1977.
- Senger DR, Van de Water I, Brown LF, *et al.* Vascular permeability factor (VPF/VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*; 12:303-324; 1993.
- Serra E. – Baldrich. El Mastocito. Servicio de Formación e Investigación en inmunología Clínica. Hospital Pasteur. Motevideo, Uruguay. *Medicina Cutánea IberoLatinoamericana*; 22: 159-164, 1994.
- Shibanuma H, Hirano T, Tsuji K, Wu Q, Shrestha B, Konaka C, Ebihara Y, Kato H. Influence of E-cadherin dysfunction upon local invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 22: 85-95, 1998.
- Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M, Shing Y. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*; 2273: 1296-9; 1984.
- Shweiki D., Itin A., Sofer D., *et al.* Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*; 359: 843-5; 1992.
- Sloane BF, Hohn KV. Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: a possible marker for metastatic potential. *Cancer Res* ; 42: 980-986, 1982.
- Small JV, Rother K, Kaverina I. Functional design in the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*; 11: 54-60, 1999.
- Smith, S., Basu, P. Mast cell in corneal immune reaction. *Can. J. Ophthalmol.*, 5: 175-183, 1970.
- Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 264: 11539-42, 1989.
- Spitz, M. R., Wei, Q., Dong, Q., Amos, C. I., Wu, X. Genetic Susceptibility to Lung Cancer: The Role of DNA Damage and Repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 689-698, 2003
- Sprenger A, Schardt C, Rotsch M, Zehrer M, Wolf M, Havemann K, Heymanns J. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in patients with lung cancer and benign lung diseases. *J Cancer Res Clin Oncol*; 123: 632-8, 1997.
- Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J*. 15;340 (Pt 1):77-84; 1999.
- Starkey JR, Crowle PK, Taubenberger S. Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *Int J Cancer*; 42(1):48-52; 1988.
- Stemlich, M D & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.*; 17: 463-516, 2001.
- Stepien HM, Kolomecki K, Pasieka Z, Komorowski J, Stepien T, Kuzdak K. Angiogenesis of endocrine gland tumours—new molecular targets in diagnostics and therapy. *Eur J Endocrinol.*;146(2):143-51, 2002.
- Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Kreuser ED, 1996 Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. Recent Result. *Cancer Res*; 142: 19-50, 1996.
- Streuli, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation *Curr Opin Cell Biol*. 11:634-40, 1999.
- Sugarbaker, E. V. Cancer metastasis: a product of tumour –host interactions. *Curr. Probl. Cancer* 3, 1-59, 1979.
- Sundström, M. Signal transduction in Mast Cell Migration. Acta Universitatis Upsaliensis *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1081. 53pp. Uppsala ISBN 91-554-5130-6, 2001.
- Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167:2250, 2001.
- Taguchi O, Gabazza EC, Kobayashi T, Yoshida M, Yasui H, Kobayashi H. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with lung cancer. *Intern Med*; 36:14-8, 1997.
- Tanaka K, Iwamoto Y. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080 *Cancer Res*; 55: 2927-2935, 1995.
- Tanaka A., Arai K, Kitamura, Y, Matsuda H. Matrix metalloproteinase- production, a newly identified function of mast cell progenitors, is down regulated by c-kit receptor. *Blood*; 94: 2390-5, 1999.
- Tang DG, Honn KV: Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis*; 14(1-6): 109-22. Review 1994- 1995.
- Tanooka H, Kitamura Y, Sado T, Tanaka K, Nagase M and Kondo S. Evidence for involvement of mast cells in tumor suppression in mice. *J Nat Cancer Inst* 69: 1305-1309, 1982.

- Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*; 297(5864):307-12; 1982.
- Taylor KB, Windsor LJ, Caterina NCM. The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1. *J Biol Chem*; 271:23938-23945, 1996.
- Templeton DM, Zhao Y, Fan MY. Heterogeneity in the response of vascular smooth muscle to heparin: altered signaling in heparin-resistant cells. *Cardiovasc Res.*; 45(2): 503-12; 2000.
- Terranova, V.P, Hukanen, E.S, Loeb, D.M., Martín, G.R.,Thronburg, L., Glushko, V. Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cell. *Proceedings of National Academy of Science USA* 83: 465-469, 1986.
- Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T. Distribution of Mast Cells in Mediastinal Lymph Nodes from Lung Cancer Patients. *World J Surg Oncol.* 18; 1(1): 25; 2003.
- Toyoyama H, Nuruki K, Ogawa H, Yanagi M, Matsumoto H, Nishijima H, Shimotakahara T, Aikou T, Ozawa M. The reduced expression of e- cadherin, alpha-catenin and gammacatenin but not beta-catenin in human lung cancer. *Oncol Rep*; 6: 81-5, 1999.
- Tryggvason, K; M. Hoyhtya, and T. Salo. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion *Biochim Biophys Acta* 907:191-217, 1987.
- Tsumatori G, Ozeki Y, Takagi K Ogata T, Tanaka S: Relation between the serum E-selectin level and the survival rate of patients with resected non-small cell lung cancers. *Jpn J Cancer Res*; 90: 301-7, 1999.
- Turner, A. M., et al., Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. *Blood.* 80 (2): p. 374-381, 1992.
- Turner S, Sherratt J. Intercellular Adhesión and Cancer Invasión: A Discrete Simulation Using the Extended Potts Model. *J. theor. Biol.* 216, 85-100, 2002.
- Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Yoshijawa H, Kato T. Ono K et al. Prognostic significance of mast cells in soft tissue sarcoma. *Cancer*; 62: 2416-9, 1988.
- Urtreger A, Ladedá V, Puricelli L, Rivelli A, Vidal M C, de Lustig ES, Bal de Kier Joffé E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary cell lines. *Int. J. Oncol.* 11: 489-496, 1997.
- Urtreger A, Diament M., Ranuncolo S., Vidal María del C., Puricelli L, Klein, Bal de Kier Joffé. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes; *International Journal of Oncology* 18 (3):639-647, 2001.
- Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D et al., Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis, *Circulation*; 97: 381-390; 1998.
- Van Duinen CM, Van den Broek LJ, Vermeer BJ, Fleuren GJ, Bruijn JA: The distribution of cellular adhesion molecules in pigmented skin lesions. *Cancer*; 73: 2131-9, 1994.
- Vaporciyan AA, Swisher SG. Capítulo 7: Tumores torácicos. En: Teh MD Anderson Surgical Oncology Handbook-2nd ed; 109-119, 2000.
- Velasco-Velazquez MA, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patino N, Sullivan Lopez J, Mandoki JJ. Integrins and integrin-associated molecules: targets for the development of antimetastatic therapies. *Rev Invest Clin*; 51: 183-93, 1999.
- Velasco- Velazquez, Molina-Guarneros, Oviedo, Orozco, Mendoza-Patiño, Mandoki: Anormalidades en el sistema adhesivo de neoplasias pulmonares. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. Vol: 46, Núm:3 pp 189-195, 2000.
- Versteeg R., Aberrant methylation in cancer. *Am J. Hum Genet* 60: 751-754, 1997.
- Vlodavsky I, Corner G, Ishai-Michaeli R, et al: Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: Possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*; 9:203-226, 1990.
- Vogelstein & Kinzler, 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* (4):138-41, 1993.
- Wang Z, Juttermann, Soloway, TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo *J. Biol Chem*; 275, 26411-26415, 2000.
- Weidner, N., and K. F. Austen. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, trypsin, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 189: 156, 1993.
- Weinberg, 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*;49(14):3713-21, 1989.
- Weiss, L. Principles of Metastasis. Orlando, FL: *Academic Press*, 1985
- Weiss, L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev.*;19(3-4):I-XI, 193-383, 2000.

- Welle, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 61: 233, 1997.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*; 271: 10 079–10 086, 1996.
- Will H, Atkinson SJ, Butler G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation-regulation by TIMP2 and TIMP-3. *J Biol Chem*; 271: 17119-17123, 1996.
- Williams, C.M. and S.J. Galli, The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.*, 105 (5): p. 847-59, 2000.
- Woods A and Couchman JR: Heparan sulfate proteoglycans and signalling in cell adhesion. *Adv Exp Med Biol* 313:87-96, 1992.
- Woods A, Mc Carthy JB, Furcht LT and Couchman JR: A synthetic peptide from the COOH- terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* 4: 605-13, 1993.
- Wright TC Jr, Pukac LA, Castellot JJ Jr, Karnovsky MJ, Levine RA, Kim-Park HY, Campisi J. Heparin suppresses the induction of c-fos and c-myc mRNA in murine fibroblasts by selective inhibition of a protein kinase C-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 86(9): 3199-203, 1989.
- Xu, J *et al.* Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo *J Cell Biol.*; 154: 1069-1080, 2001.
- Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM and Kimata K: Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J. Biol Chem* 264: 8012-8, 1989.
- **Yamashita Y, Nakagomi K, Takeda T, Hasegawa S Mitsui T.** Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. *Thorax*; 47(8): 634-9; 1992.

- Yano H, Kinuta M, Tateishi H, Nakano Y, Matsui S, Monden T, Okamura J, Sakai M, Okamoto S. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer*. May; 2(1): 26-32; 1999.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*; 14: 163–176, 2000.
- Yu, Q & Stamenkovic, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 in the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.*; 16: 307-323, 2002.
- Yuspa S, Shields P. Etiology of cancer: Chemical factors. In V. DeVita, S. Hellman, S. Rosenberg (Eds.), *Cancer principles of oncology* (6th ed, pp 179-191). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo *Micron*. 32:427-38, 2001.
- Zehnder, J.L., and S. J. Galli. Mast Cells heparin demystified. *Nature* 400:714, 1999.
- Zhang, W., *et al.*, Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor. *Cancer Res*. 60(23): p. 6757-6762, 2000.
- Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD, Tsung YL: Reexpression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* ; 92: 7411-5, 1995.

Abreviaturas

- ACTH (Adrenocorticotropic Hormona): hormona adrenocorticotrópica
- bFGF (basic fibroblast growth factor): factor de crecimiento fibroblástico básico
- CD13+ (CD antigen expressed in monocytic cells): marcador de monocitos que actúa como una metaloproteína dependiente de zinc
- CD14 (CD antigen expressed in macrophages): marcador de macrófagos que actúa como receptor para lipo-polisacáridos bacterianos
- CD17 (CD antigen expressed in neutrophils, monocytes, platelets): marcador de neutrófilos, monocitos y plaquetas que actúa como glicosfingolípido de superficie celular
- CD34+ (CD antigen expressed in hematopoietic precursors): marcador de células hematopoyéticas germinales que actúa como ligando para L-selectina
- C-kit+ (receptor for Stem Cell Factor): receptor del factor de crecimiento de células madre
- CTMC (connective tissue-type mast cells): mastocito de tejido conectivo
- E-cadherin (epithelial): cadherina que se expresa en células epiteliales
- EGF (epidermal growth factor): factor de crecimiento epidérmico
- Fc α RI (high-affinity receptor for immunoglobulin E): receptor de IgE de alta afinidad
- Fc β RII (low-affinity IgE receptor): receptor de IgE de baja afinidad
- Fc γ RI (High-Affinity Receptor for IgG): receptor de IgG de alta afinidad
- FGF (fibroblast growth factor): factor de crecimiento fibroblástico
- FGFR (fibroblast growth factor receptor): receptor del factor de crecimiento fibroblástico
- GM-CSF (granulocyte/monocyte-colony stimulating factor): factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- GPI (glycosylphosphatidyl inositol): glicosil-fosfatidil-inositol
- HETEs: Hidroxieicosatrienoicos
- HGF (hepatocyte growth factor): factor de crecimiento del hepatocito
- HPETEs: Hidroperoxieicosatrienoicos
- IL-8 (interleukin-8): interleukina-8
- I-CAM (intracellular adhesion molecule): molécula de adhesión intracelular
- MB: membrana basal
- MEC: matriz extracelular
- MC: mastocitos
- McoMC: medio condicionado de mastocitos
- MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1): proteína quimioattractante de monocitos
- MCT (tryptase positive mast cells): mastocito triptasa positivo
- MCTC (tryptase positive, chymase positive mast cells): mastocito triptasa/quimasa positivo
- MIP-1 alpha (macrophage inflammatory protein 1 alpha): proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
- MMC (mucosal-type mast cells): MC de mucosa
- MMPs (matrix metalloproteinases): metaloproteasas de matriz

- N-cadherin (neural): cadherina que se expresa en tejido neural
- N-CAM (neural cell adhesion molecule): molécula de adhesión de células neurales
- NGF (nerve growth factor): factor de crecimiento nervioso
- ns: no significativo
- NSCLC (non-small cell lung cancer): cancer de pulmón de células no pequeñas
- PAF (Platelet Activating Factor): factor activador de plaquetas
- PAI-1 (plasminogen activator inhibitors-1): inhibidor del activador de plasminógeno 1
- PAI-2 (plasminogen activator inhibitors-2): inhibidor del activador de plasminógeno 2
- P-cadherin (placental): cadherina que se expresa en células del trofoblasto y en células de la pared uterina.
- PDGF (platelet-derived growth factor): factor de crecimiento derivado de plaquetas
- rMCP-8 (rat mast cells protease-8): proteasa-8 de mastocitos de rata
- SCF (stem cell factor): factor de crecimiento de células progenitoras
- SCLC (small cell lung cancer): cancer de pulmón de células pequeñas
- si-CAM-1 (soluble intracellular adhesion molecule-1): molécula soluble de adhesión intracelular
- TAF (tumor angiogenic factor): factor angiogénico tumoral
- TGF-alfa (transforming growth factor alfa): factor de crecimiento transformante alfa.
- TGF-beta (transforming growth factor beta): factor de crecimiento transformante beta
- TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases): inhibidores tisulares de las metaloproteasas
- TLR (toll-like receptor): receptor que actúa en el reconocimiento de componentes microbianos
- TNF α (tumor necrosis factor alpha): factor de necrosis tumoral alfa
- tPA (tissue plasminogen activator): activador de plasminógeno tipo tisular
- Trka (receptor binds to nerve growth factor): receptor para el factor de crecimiento nervioso (NGF).
- uPA (urokinase-type plasminogen activator): activador de plasminógeno tipo urokinasa
- uPAR (urokinase plasminogen activator receptor): receptor del activador de plasminógeno tipo urokinasa
- VEGF (vascular endothelial growth factor): factor de crecimiento del endotelio vascular

