

VIAS DE SEÑALIZACION QUE REGULAN LA EXPRESION DE PROTEASAS DURANTE LA PROGRESION TUMORAL

ELISA BAL de KIER JOFFÉ^{1,*}, ESTEBAN MAZZONI¹, JULIO A. AGUIRRE GHISO²

¹Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ² Division of Medical Oncology, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA

Resumen La desregulación de diferentes vías de señalización constituye un evento crítico en la progresión de distintos tipos tumorales, tanto en modelos experimentales transgénicos como en tumores espontáneos. Se conoce relativamente poco acerca del rol de proteasas y moléculas de adhesión durante las etapas tempranas de la transformación maligna inducida por oncogenes, en células de estirpe epitelial y mesenquimática. Esta revisión resume trabajos recientes que demuestran que moléculas efectoras de diferentes vías de señalización (PKC, v-Ras-RalA-PLD1 ó v-Src-RalA-PLD1) inducen cambios en la producción de proteasas (uPA y MMPs) y de moléculas de adhesión (fibronectina, CD44, β 1-integrina) en líneas celulares normales, tanto epiteliales como mesenquimáticas, y que dichos cambios se asocian con la formación de tumores *in vivo*. La sobreexpresión de PKC γ en células mamarias normales o de v-Src y v-Ras en fibroblastos NIH3T3 indujo, en todos los casos, sobreproducción de uPA y MMPs y un fenotipo tumorigénico. Tanto la producción de proteasas como la tumorigenicidad en las células NIH3T3 transformadas fue dependiente de la pequeña GTPasa RalA. En contraste, cualquiera fuera el estímulo tumorigénico, en las células mamarias que sobreexpresaban PKC se observó una elevada expresión de fibronectina, organizada en una matriz fibrilar extracelular, mientras que los fibroblastos transformados por los oncogenes v-Src y v-Ras mostraron una significativa reducción en la producción de fibronectina y una incapacidad total de fibrillogénesis de la misma, efecto también dependiente de la vía RalA-PLD1. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de proteasas constituye un común denominador en la adquisición del fenotipo maligno para células de estirpe epitelial o mesenquimática. En cambio, se observó una muy marcada diferencia en la expresión y funcionalidad de moléculas de adhesión como la fibronectina entre los dos tipos celulares, sugiriendo que esta glicoproteína tendría diferentes roles regulatorios durante la progresión tumoral de células de diferente origen tisular

Abstract. *Signaling pathways regulating the expression of proteases during tumor progression.*

Deregulation of several signaling pathways have been found to be critical for the development of different types of tumors, both in transgenic and spontaneous models. The role of proteases and adhesion molecules during the early stages of tumor progression induced by oncogenes in epithelial and mesenchymal tumors has remained relatively unexplored. This review summarizes recent work showing that different but overlapping signaling effector modules (PKC, v-Ras-RalA-PLD1 or v-Src-RalA-PLD1) induce changes in the production of proteases (uPA and MMPs) and adhesion molecules (fibronectin, CD44, β 1-integrin) in normal epithelial or mesenchymal cell lines, associated with tumor development *in vivo*. Overexpression of PKC γ in normal mammary epithelial cells or of v-Src and v-Ras in NIH3T3 fibroblasts induced in all cases overproduction of uPA and MMPs and a tumorigenic phenotype. Proteases production and tumorigenicity in transformed NIH3T3 cells were dependent on the GTPase RalA. In contrast to the common outcome in protease production by the different tumor promoting stimuli, fibronectin production was high in PKC-overexpressing mammary epithelial cells and it was organized into a rich fibrillar matrix, while oncogene transformed fibroblasts displayed reduced fibronectin production and a total loss of FN fibrillogenesis, an effect also dependent on RalA. These results show that protease overexpression is a common denominator in the acquisition of a malignant phenotype both in mesenchymal and epithelial cells. In contrast there is a dramatic difference in the expression and function of adhesion molecules like fibronectin between these two cell types, suggesting different regulatory roles for this glycoprotein during tumor progression, in cells of different tissular origin.

Key words: PKC, PLD, RalA, fibronectin, oncogenes, proteases, invasion and metastases

El diagnóstico y el tratamiento de los tumores sólidos comienza en general tardíamente, cuando la mayoría de los pacientes presentan metástasis, ocultas o clínicamente detectables. El hecho de que la gran letalidad de los neoplasmas malignos sea atribuible a la capacidad que presentan los mismos de diseminarse demuestra la importancia clínica que representa conocer el origen, pasos, mecanismos y regulación de dicho proceso.

La metástasis es la consecuencia de un proceso selectivo e ineficiente, que ocurre vía una serie secuencial de pasos, en muchos de los cuales la invasión tumoral constituye un fenómeno crítico¹.

Tanto la invasión local en el tumor primario, como la secundaria, a nivel del órgano «blanco», se inicia con la adhesión de la célula metastásica a la matriz extracelular (ME), seguida por la degradación de éstas por proteasas y por la migración a través de las ME alteradas. Este complejo proceso involucra la participación de numerosas moléculas como: componentes de las ME incluyendo ácido hialurónico, laminina y fibronectina (FN), sus receptores CD44 e integrinas, y proteasas^{2,3}.

Entre las proteasas extracelulares, que juegan un rol esencial durante la cascada metastásica, el crecimiento, la migración y la muerte celular, se encuentran las metaloproteasas (MMPs) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA)^{4,5}. Tanto las MMPs como el uPA, su inhibidor PAI-1 y/o su receptor uPAR se han encontrado sobreexpresados en numerosos tumores experimentales y humanos, demostrando correlación con invasividad y metástasis, y valor predictivo de la evolución de los pacientes⁶⁻⁸.

Si bien, a nivel bioquímico, el mecanismo de invasión utilizado por las células tumorales es muy semejante a la invasión fisiológica (embriogénesis, crecimiento axónico, implantación del trofoblasto), se ha demostrado que la célula maligna presenta una inapropiada expresión de las moléculas involucradas en la invasión normal. Esto permite hipotetizar que la diferencia fundamental entre células normales y tumorales reside en cómo se regula diferencialmente la expresión de estas moléculas. La expresión génica está sujeta a la regulación por vías de señalización intracelular, por lo tanto el estudio de estas vías activadas o inactivadas en la célula maligna, permitiría identificar nuevos blancos moleculares para la intervención terapéutica sobre el crecimiento y la diseminación tumoral⁹.

El mayor cambio asociado a la transformación tumoral está relacionado con la regulación de la vía mitogénica, la cual se encuentra hiperactivada. Existen evidencias experimentales relacionando la vía mitogénica clásica con la expresión de uPA y uPAR, así como con la regulación de la expresión de MMPs. A su vez, la mayor capacidad degradativa puede llevar a la liberación de factores de crecimiento incluidos en la ME, induciendo así, a su vez, a una activación constitutiva de la vía mitogénica⁹.

Este artículo enfocará nuestros estudios sobre el rol de distintas vías de señalización intracelular en la regulación de la proteasas mencionadas y su impacto sobre distintas etapas de la progresión tumoral.

Enzimas proteolíticas

Las MMPs, enzimas dependientes de Ca⁺⁺ y Zn⁺⁺ que degradan distintos tipos de colágeno incluidos en la ME, son secretadas en una forma latente y son activadas en el exterior de las células por una cascada proteolítica. Entre ellas se encuentran las colagenasas capaces de degradar colágeno IV o gelatinasas A y B, MMP-2 (72 kDa) y MMP-9 (92 kDa) respectivamente. También existen MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs), las cuales han sido implicadas recientemente en la invasión tumoral^{4,5}.

El uPA es una serino-proteasa de 45-55 kDa, según la especie, que en su forma activa consiste de un dímero, con cadenas A y B unidas por puentes disulfuro. En la cadena A se encuentra el dominio de unión a su receptor uPAR, que se encuentra anclado en el lado exterior de la membrana citoplasmática por una cadena de glicosilfos-fatidilinositol. El uPA activado, además de degradar algunos componentes de la ME, activa al plasminógeno convirtiéndolo en plasmina, una serino-proteasa de amplio espectro. La activación del plasminógeno por el uPA se incrementa hasta 40 veces cuando éste está unido a su receptor, focalizando así el frente de degradación¹⁰.

El complejo uPA/uPAR posee funciones independientes de la actividad proteolítica del uPA. El mismo constituye un receptor para la vitronectina y es capaz de transducir señales al interior de la célula durante la migración^{9,10}. Además, se ha demostrado que el bloqueo de la función señalizante del uPAR puede forzar la entrada de células de un carcinoma humano a un estado de latencia o “dormancy” tumoral. Así, la sobreexpresión de uPA y/o uPAR puede, además de favorecer la proteólisis pericelular, modificar la señalización intracelular, incrementando el potencial migratorio y el crecimiento de las células tumorales¹¹.

Producción de uPA durante la progresión tumoral en un modelo de cáncer de mama murino

Desde hace más de 15 años, en el Área Investigación del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, estudiamos diferentes aspectos de la biología tumoral, empleando un modelo murino en BALB/c de dos adenocarcinomas mamarios emparentados, de moderada (M3) y alta (MM3) capacidad metastásica en pulmón¹². Se han establecido y caracterizado el clon F3II¹³ y las líneas celulares continuas LM3 y LMM3¹⁴,

capaces de crecer formando tumores primarios y metástasis en ratones singeneicos, y pasibles de ser transfectadas en forma estable, ampliándose los estudios y los modelos disponibles para analizar las etapas de la progresión tumoral¹⁵⁻²⁰.

Entre las proteasas implicadas en los procesos de invasión y metástasis, hemos estudiado en forma particular el sistema del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Así hemos demostrado que, si bien ambos tumores son capaces de secretar en forma constitutiva concentraciones elevadas de uPA, el tumor MM3, más metastásico, secreta 3-4 veces más uPA que el adenocarcinoma parental M3²¹. En ambos se observó que la producción de uPA aumenta a lo largo del crecimiento tumoral²². La evidente correlación entre progresión tumoral y uPA nos llevó a estudiar el efecto de su inhibición sobre el crecimiento y la diseminación tumoral. Así, mediante el empleo de inhibidores sintéticos específicos anticatalíticos del uPA, se demostró el rol crítico de esta proteasa en la migración e invasión *in vitro*²³, así como en la invasión local del tumor primario¹⁵, en el modelo en estudio.

Regulación de la producción de uPA en células mamarias. Rol de la proteína quinasa C (PKC).

El crecimiento del tumor primario y/o de las metástasis depende de factores reguladores del crecimiento (GF), incluyendo los TGF β , los IGF y el EGF, producidos por la propia célula maligna y/o por las células del microambiente. Dichos GF interactúan con receptores específicos a nivel celular produciendo respuestas que van desde la inducción de proteínas relacionadas con el control de la proliferación y de la sobrevivencia, hasta la modulación de la expresión de componentes de las ME, controlando su síntesis y/o degradación².

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se determinó que los factores de crecimiento IGF 1 y 2 y EGF, en concentraciones que no estimulan la proliferación celular, son capaces de aumentar la secreción de uPA de los cultivos primarios de M3 y MM3²⁴, así como de las líneas derivadas, sugiriendo la importancia de los microambientes que la célula tumoral atraviesa durante las distintas etapas de la progresión tumoral en su comportamiento final. Muchos de estos factores de crecimiento activan, a través de sus receptores tirosina quinasa (RTK), la vía de la PKC. Si bien existían algunos estudios sobre el rol de la PKC en la regulación de proteasas en células de origen mesenquimático, la participación de esta vía en la regulación de uPA o MMPs en células tumorales epiteliales era escaso. La potencial implicancia de esta vía y la disponibilidad de inhibidores de la misma nos llevó a estudiar su rol regulatorio en la producción de uPA.

PKC constituye una familia de serino-treonina kinasas que fueron caracterizadas *in vitro* por su capacidad de unir calcio y diacilglicerol (DAG), activándose en aquellos procesos de señalización intracelular en donde se libera DAG. La familia PKC está compuesta por al menos 10 isoformas diferentes que se pueden clasificar en tres clases, en base a la estimulación producida por Ca^{2+} y DAG. Las isoformas clásicas son activadas por ambos mensajeros, las nuevas sólo por DAG y las atípicas son independientes de Ca^{2+} y DAG. Las formas clásicas contienen dos dominios principales: el dominio catalítico carboxiterminal y un dominio regulatorio aminoterminal. Al parecer, todas las isoformas también están reguladas por fosforilaciones en su dominio regulatorio, en el *loop* de activación²⁵. La activación de las diferentes isoformas de PKC lleva a la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares, y a su participación en el control de diferentes eventos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis, transformación maligna y metástasis²⁶. Es importante destacar que las isoformas de PKC difieren entre sí en su localización tisular, celular e intracelular, y que pueden tener funciones distintas e inclusive opuestas^{25, 26}.

Se conoce que la activación de receptores tirosina quinasa (RTK) o de tirosina quinasa que no son receptores para factores de crecimiento (N-RTK) como Src, Fyn, Fgr, Yes o Lck, activa, a su vez, la vía mitogénica a través de señales derivadas del metabolismo fosfolipídico. Al iniciarse la señal, la activación de la PKC por DAG es dependiente de la activación previa de la fosfolipasa C gama (PLC- γ), pero en el caso de producirse una señal constitutiva o prolongada, la producción de DAG comienza a depender de la activación, por la propia PKC, de la fosfolipasa D (PLD), enzima que produce ácido fosfatídico a partir de fosfatidilcolina, el que es convertido en DAG por una fosfolipasa específica. Dicho mecanismo se ha denominado *producción bifásica de DAG*, donde la primera fase depende de PLC- γ y la segunda de PLD²⁷. Por otra parte, se ha demostrado que N-RTKs, como el oncogen Src, también son capaces de activar PLD1, a través de otra vía, en la que participan el protooncogen Ras y la proteína RalA, una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras²⁸.

A fin de estudiar las posibles vías de señalización involucradas en la regulación de la sobreexpresión constitutiva e inducida de uPA por las células de un adenocarcinoma de mama (LM3), se empleó un enfoque farmacológico. Así se estableció que la sobreexpresión de uPA en células epiteliales tumorales es regulada por una vía dependiente de PLD, de PKC¹⁶ y de calcio extracelular²⁹. Utilizando fármacos que interfieren específicamente con tirosina quinasas, se estableció que otra vía dependiente de tirosina quinasas, pero independiente de PKC, estaba también participando del proceso de regulación, ya que la genisteína, un inhibidor específico de tirosina quinasas, reducía significativamente y en forma dependiente de la dosis, la secreción de uPA y de otras proteasas como las MMPs¹⁸. Los resultados obtenidos indican que la regulación de la sobreexpresión de uPA y uPAR, así como de otras proteasas como las MMPs, se realizaría a través de la activación de las mismas vías de transducción de señal que controlan la transformación maligna y la mitogénesis.

Además demostramos que la vía PLD/PKC también regula el *spreading* de las células tumorales mamarias a través de un mecanismo dependiente de integrinas $\beta 1$ y del citoesqueleto de F-actina, involucrando así a la PKC no sólo en vías de diferenciación y crecimiento sino también en la señalización de moléculas esenciales para la migración e invasión¹⁷.

Una de las formas de estudiar el rol de las distintas variantes de la enzima PKC es por transfección de líneas celulares con las distintas isoformas. Así, se ha demostrado que, en determinados tipos celulares, las isoformas pueden funcionar como oncogenes. Por ejemplo, la expresión de la PKC- γ en fibroblastos NIH 3T3 le confiere a las células características asociadas a la transformación maligna³⁰. Es importante observar que la mayoría de estos estudios se han realizado en fibroblastos, pero que el 80% de los tumores en humanos son de origen epitelial, siendo el cáncer de mama un ejemplo de ellos. No es muy claro el rol que cumplen las distintas isoformas de PKC en la transformación y progresión de los tumores de mama. Se ha descrito una actividad PKC incrementada en los tumores de mama más agresivos, hecho que se ha correlacionado con la pérdida de los receptores de estrógeno³¹.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar, con un enfoque genético, si la transfección estable de células epiteliales mamarias normales con una PKC de tipo clásico era capaz de inducir alteraciones compatibles con la adquisición de un fenotipo transformado, incluyendo la disregulación de la expresión de proteasas. Para ello transfectamos la línea celular normal de epitelio de mama NMuMG con el gen de PKC γ de rata. Mediante selección con G418 se obtuvieron dos líneas: NMuMG-PKC, que expresa la proteína PKC γ y NMuMG-neo, línea control. A continuación se detallan los resultados obtenidos (Mazzoni et al. 2000; resultados no publicados).

Se analizaron los patrones de crecimiento de las líneas bajo distintas condiciones experimentales. Sobre geles de colágeno la línea NMuMG-PKC no fue capaz de formar estructuras de tipo glandular como las formadas por la línea NMuMG-neo. En monocapa, las células que expresan el gen de la PKC γ presentaron una mayor velocidad de crecimiento, alcanzando una elevada densidad de saturación, respecto de la línea control. Cuando se sembraron sobre una superficie plástica no apta para el cultivo, las células de la línea NMuMG-PKC, que se agruparon formando esferoides, fueron capaces de sobrevivir por periodos mayores a tres semanas, mientras que las células de la línea control murieron a los 7 días de cultivo, sugiriendo una mayor resistencia a la muerte inducida por anoikis en las células expresando PKC γ . Además la expresión de PKC γ les confirió la capacidad de sobrevivir y crecer en forma independiente del anclaje, formando colonias agar blando (5.6 ± 1.2 vs 0.3 ± 0.4 /campo), resultado que apoya la hipótesis previa.

Respecto de otras funciones celulares implicadas en la expresión del fenotipo maligno, la línea NMuMG-PKC mostró una mayor adhesión a FN, acompañada de un aumento de tres veces en la expresión de integrina $\beta 1$ y de dos veces y media en la expresión de FN. Asimismo, la expresión de PKC se asoció a una mayor organización del citoesqueleto de actina, junto con una mayor capacidad de incorporar la FN a la matriz extracelular, en forma de fibrillas. En cuanto a la expresión de marcadores de estirpe tisular *in vitro*, ambas líneas mantuvieron la expresión del marcador epitelial citoqueratina, pero la línea NMuMG-PKC adquirió además, la expresión del marcador mesodérmico vimentina.

La sobreexpresión de proteasas, como el uPA y las MMPs, se ha propuesto como determinante crítico en la promoción y progresión tumoral en la glándula mamaria. Por lo tanto era relevante conocer los cambios en la producción de estas proteasas en las líneas celulares estudiadas. Mientras que la línea control sólo secretaba niveles basales detectables pero no medibles de las mismas, la expresión de PKC γ se asoció a un aumento significativo en la secreción de ambas proteasas, sugiriendo que una señalización aberrante en células normales de mama puede llevar a cambio tempranos en la adquisición de características de

malignidad

Finalmente, con el fin de conocer si la expresión de PKC γ les había conferido un fenotipo tumorigénico completo, ambas líneas celulares fueron inoculadas subcutáneamente en ratones atímicos nude. Todos los ratones (5/5) inoculados con las células NMuMG-PKC desarrollaron carcinomas muy indiferenciados e invasivos que infiltraron extensamente la dermis y la capa de músculo esquelético subcutánea. Dichos tumores presentaron células grandes, que expresaban citoqueratinas, con alteraciones nucleares, numerosas mitosis, escasa muerte celular, y una extensa neoangiogénesis. Por otra parte, sólo en 2/5 ratones nude inyectados con la línea control se detectó la presencia de nódulos subcutáneos palpables, pero no medibles. El análisis histopatológico indicó la presencia de una extensa fibrosis, con abundantes fibroblastos y colágeno, sumado a la presencia de macrófagos. Si bien se detectó la presencia de algunas células de aspecto epitelial, la tinción para citoqueratinas no las marcó.

De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que la expresión de la enzima PKC γ lleva a las células normales de epitelio de mama a mostrar características compatibles con un fenotipo transformado *in vitro* y a la expresión de un fenotipo maligno completo *in vivo*. Finalmente, en este trabajo, nosotros presentamos, por primera vez, evidencia directa que PKC γ , cuando es expresada en células normales de origen epitelial, lleva a la sobreexpresión de proteasas extracelulares, confirmando que una isoforma clásica de PKC puede estar involucrada en las vías de señalización que desregulan la expresión de MMPs y uPA durante las etapas tempranas de la progresión tumoral.

Una señal mediada por la GTPasa monomérica RalA y la PLD1 regula la sobreexpresión de uPA y tumorigénesis inducida por v-Src o v-Ras.

Previamente mencionamos que las células de un adenocarcinoma de mama murino sobreproducen uPA, y que esta sobreproducción es regulada por una vía dependiente principalmente de PLD y PKC. Asimismo, anteriormente Jiang et al²⁸ habían demostrado que la expresión constitutiva de los oncogenes v-Src y v-Ras inducía la transformación *in vitro* de las células NIH3T3, y que dicho efecto era dependiente de una señal mediada por la pequeña GTPasa RalA y PLD1.

Con el objetivo de conocer en mayor detalle las vías de señalización implicadas en la transformación maligna y progresión tumoral, quisimos analizar en profundidad la participación de la PLD y los complejos de señalización que la activan, empleando otro modelo y estrategia experimental³². En esta oportunidad se utilizaron las células de estirpe fibroblástica NIH3T3, transformadas mediante la transfección de los oncogenes v-Src y v-Ras y cotransfectadas o no con la mutante negativa de RalA (S28N-Ral), la que es capaz de bloquear específicamente la activación de PLD1 por v-Src o v-Ras²⁸.

Nuestro propósito fue estudiar si la activación de la vía RalA/PLD1 por los oncogenes mencionados, participa en la regulación de la expresión de moléculas críticas de la progresión tumoral como uPA, MMPs, CD44 y FN, así como en el comportamiento tumorigénico y metastásico de las células transformadas. En este trabajo demostramos que las células NIH3T3 transformadas por v-Src o por v-Ras sobreexpresan uPA y que la expresión de S28N-Ral bloquea dicha sobreexpresión en ambas. Asimismo, la transformación por v-Src o v-Ras también indujo un aumento significativo de la actividad de MMP-2 y MMP-9, detectado por zimografía. Es interesante destacar que la coexpresión de la mutante negativa de RalA fue capaz de bloquear la sobreexpresión de MMPs inducido por v-Src, pero no por v-Ras, sugiriendo una regulación diferencial de la expresión de estas enzimas por los oncogenes estudiados y por RalA.

Relativo a otras moléculas determinantes de la progresión tumoral, se conoce que los oncogenes mencionados regulan negativamente la expresión de FN^{33, 34}, y que su reducción se ha asociado, en algunos casos, a una mayor capacidad metastásica²⁰. Por el contrario, estos mismos oncogenes causan una sobreexpresión del receptor de membrana del ácido hialurónico CD44³⁵, cuya asociación con mayor invasividad y malignidad se ha demostrado en diferentes tumores^{36, 37}. En este trabajo demostramos que la expresión de ambos oncogenes indujo la sobreexpresión de CD44, pero disminuyó significativamente la expresión y fibrillogénesis de FN. Ambos efectos fueron revertidos por la expresión de la mutante negativa de RalA, con bloqueo de la expresión de CD44 y restauración tanto de la expresión de FN, estudiada por *western blot* en lisados celulares, como de la capacidad de formar una matriz fibrilar extracelular (Aguirre Ghiso et al. 2000, resultados no publicados).

Finalmente, los distintos tipos celulares fueron inoculados subcutáneamente o por vía endovenosa, en

ratones singeneicos, a fin de estudiar su capacidad tumorigénica y metastásica experimental, respectivamente. Mientras que aproximadamente el 50% de los ratones inoculados con las células NIH3T3 transformadas por v-Src o v-Ras desarrollaron tumores subcutáneos con una latencia de 5-7 días, ninguno de los inyectados con las células transformadas que coexpresaban la mutante negativa de RalA desarrollaron tumores, por lo menos hasta 13 semanas post-inoculación. Se obtuvo un resultado similar en el ensayo de metástasis experimentales, con una incidencia del 95 % de animales con nódulos pulmonares cuando se inyectaron con células NIH3T3 v-Src o v-Ras, *versus* un 14 % en los ratones inoculados con las células que coexpresaban la mutante negativa.

Los resultados obtenidos implican en forma evidente la participación de la vía RalA/PLD1, tanto en la sobreexpresión constitutiva de uPA y CD44, como en la disminución de la expresión de FN, inducidos por la transformación con los oncogenes v-Src y v-Ras, y su participación parcial en la inducción de la sobreexpresión de las MMPs. Además se demuestra en forma inequívoca la participación de ambas moléculas de señalización en la adquisición del fenotipo maligno y en el proceso de progresión tumoral.

Conclusiones finales

Los resultados del presente trabajo plantean varios factores comunes a la transformación maligna de células tanto de origen mesenquimático como de origen epitelial. Uno de ellos es que la sobreactivación de vías mitogénicas por PKC γ en las células epiteliales NMuMG o por v-Src o v-Ras en células fibroblásticas, es capaz de inducir una sobreproducción de proteasas (uPA y MMPs), las cuales se asocian directamente con una progresión temprana hacia un fenotipo tumorigénico y metastásico. PKC ha sido descrita como una molécula crítica en la transformación maligna por v-Src y v-Ras, por lo que la demostración de su participación en la adquisición de propiedades invasivas en los dos tipos celulares estudiados, avala que dicha vía de señalización representaría un posible blanco terapéutico común. Por otro lado, tanto las células epiteliales transformadas por PKC γ , como los fibroblastos transformados por v-Ras y v-Src, mostraron importantes alteraciones en la expresión y función de moléculas de adhesión, cuya regulación fue inversa en algunos casos, como el de la fibronectina, y en cambio se indujo sobreexpresión de otras, como integrina β 1 o CD44 según el modelo estudiado. Estos resultados sugieren que las mismas vías de señalización pueden regular diferencialmente la expresión de las mismas proteínas. Por lo tanto es fundamental conocer el rol funcional de estas moléculas en diferentes tumores, para poder diseñar selectivamente la intervención de las vías de señalización.

Creemos que un enfoque multidisciplinario sobre el estudio de las etapas de la progresión llevará a un diseño de terapias antitumorales más eficaces, ya que se basarán en el entendimiento profundo de la biología tumoral.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente subsidiado por UBACYT (TM04), CONICET (PIP4199) y ANPCYT (PICT 00712).

Bibliografía

1. Liotta LA, Stettler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054-9.
2. Sherbet G, Lakshmi M. The genetics of cancer. Genes associated with cancer invasion, metastasis and cell proliferation. *New York: Academic Press*, 1997.
3. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32: 175-253.
4. DeClerck YA, Imren S, Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Laug WE. Protease and protease inhibitors in tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 1997; 425: 89-97.
5. Chambers A and Matrisian L. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1260-70.
6. Duffy MJ, McCarthy K. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy. *Int J Oncol* 1998; 12: 1343-8.
7. Fariás E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, et al. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000; (in press).
8. Wollenberg B, Jan NV, Chaubal S, Untch M. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor -1: new functional risk factors in head and neck squamous cell cancer. *Oncol Rep* 1997; 4: 853-5.
9. Aguirre Ghiso J, Alonso D, Fariás E, Gómez D, Bal de Kier Joffé E. Minireview: Deregulation of the signaling pathways

- controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Europ J Biochem* 1999; 263: 295-304.
10. Blasi F. UPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?. *Immunol Today* 1997; 18: 415-7.
 11. Aguirre Ghiso J, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* 1999; 147: 89-103.
 12. Bal de Kier Joffé E, Puricelli L, Vidal MC, Lustig ES. Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J Exp Clin Cancer Res*. 1983; 2:151-69.
 13. Alonso D, Fariás E, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC, Bal de Kier Joffé E. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J. Surgical Oncol* 1996; 62: 288-97.
 14. Urtreger A, Ladedá V, Puricelli L, Rivelli, Vidal MC, Lustig ES, Bal de Kier Joffé E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated to the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int J Oncol* 1997; 11: 489-96.
 15. Alonso D, Fariás E, Ladedá V, Davel L, Puricelli L, Bal de Kier Joffé. Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res & Treat* 1996; 40: 209-23.
 16. Aguirre Ghiso J, Alonso D, Fariás E, Bal de Kier Joffé E. Overproduction of urokinase type plasminogen activator is regulated by phospholipase D and protein kinase C-dependent pathways in murine mammary adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1356: 171-84.
 17. Aguirre Ghiso J, Fariás J, Alonso D, Arregui C, Bal de Kier Joffé E. A phospholipase D and protein kinase C inhibitor blocks the spreading of murine mammary adenocarcinoma cells altering f-actin and beta1-integrin point contact distribution. *Int J Cancer* 1997; 71: 881-90.
 18. Aguirre Ghiso J, Fariás E, Alonso D, Bal de Kier Joffé E. Secretion of urokinase and metalloproteinase-9 induced by staurosporine is dependent on a tyrosine kinase pathway in mammary tumor cells. *Int J Cancer* 1998; 76: 362-7.
 19. Urtreger A, Porro F, Puricelli L, Werbach S, Baralle FE, Bal de Kier Joffé E, Kornblihtt A, Muro A. Expression of RGD minus fibronectin that does not form extracellular matrix fibrils is sufficient to decrease tumor metastasis. *Int J Cancer* 1998; 78: 233-41.
 20. Urtreger A, Aguirre Ghiso J, Werbach S, Puricelli L, Muro A, Bal de Kier Joffé E. Involvement of fibronectin in the regulation of urokinase production and binding in murine mammary tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 82: 748-53.
 21. Pereyra Alfonso S, Haedo A, Bal de Kier Joffé E. Correlation between urokinase type plasminogen activator production and the metastatic ability of two murine mammary adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1988; 42: 59-63.
 22. Pereyra-Alfonso S, Solarz G, Bal de Kier Joffé E. Urokinase-type plasminogen activator activity increases during the growth of two murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing abilities. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10: 395-401.
 23. Alonso D, Tejera A, Fariás E, Bal de Kier Joffé E, Gómez D. Inhibition of mammary tumor cell adhesion, migration and invasion by the selective synthetic urokinase inhibitor B428. *Anticancer Res* 1998; 18: 4499-504.
 24. Guerra F, Eiján AM, Puricelli L, Alonso D, Bal de Kier Joffé E, Kornblihtt A, et al. Varying patterns of expression of insulin-like growth factors I and II and their receptors in murine adenocarcinomas of different metastasizing ability. *Int J Cancer* 1996; 65: 812-20.
 25. Ron D and Kazanietz MG. Protein kinase C regulation and novel phorbol ester receptors. *The FASEB J* 1999; 13:1658-76.
 26. Gómez D, Skilton G, Alonso D, Kazanietz MG. The role of protein kinase C and phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis (Review). *Oncol Rep* 1999; 6: 1363-70.
 27. Blobel G, Obeid L, Hannun Y. Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 411-31.
 28. Jiang H, Luo J, Urano T, Lu Z, Foster DA, Feig L. Involvement of Ral-GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 1995; 378: 409-12.
 29. Fariás E, Aguirre Ghiso J, Ladedá V, Bal de Kier Joffé E. Verapamil inhibits tumor proteases production, local invasion and metastasis development of murine carcinoma cells. *Int J Cancer* 1998; 78:727-34.
 30. Persons DA, Wilkinson WO, Bell RM, Finn O. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C- α cDNA. *Cell* 1988; 52: 447-58.
 31. Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer* 1998; 75: 750-6.
 32. Aguirre Ghiso J, Frankel P, Fariás E, Lu Z, Jiang H, Olsen A et al. RalA requirement for v-Src and v-Ras-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. *Oncogene* 1999; 18: 4718-25.
 33. Gu H, Oliver N. Transcriptional repression of fibronectin gene expression in v-src transformation. *Exp Cell Res* 1995; 217: 428-39.
 34. Chandler LA, Ehretsmann CP, Bourgeois S. A novel mechanism of Ha-ras oncogene action: regulation of fibronectin mRNA levels by a nuclear posttranscriptional event. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3085-93.
 35. Jamal H, Cano-Gauchi D, Buick R, Filmus J. Activated Ras and Src induce CD44 overexpression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 1994; 9:417-23.
 36. Goodison S, Tarin D. Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia. *Front Biosci* 1998; 1: E89-E109.
 37. Ladedá V, Aguirre Ghiso J, Bal de Kier Joffé E. Function and expression of CD44 during spreading, migration and invasion of murine carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1998; 242: 515-27.

SEÑALIZACIÓN Y PROTEASAS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

*Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y

Técnicas).

Dirección postal: *Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Av. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina.*

FAX: (54-11) 4504-7884. e-mail: elisabal@fmed.uba.ar

- - - -

Eighty to 90 per cent of all the scientists who ever lived are alive now. This statement has been true for every year since 1700, perhaps even earlier. Moreover, any scientist, looking back at the end of his career, will find that 80 to 90 per cent of the scientific work in his field has taken place before his very eyes. Every retired scientist is a walking, living, eye-witnessing historian of most of the science that has moulded his or her discipline. ... So we see that, depending on the parameter measured, the entity we call science has, over the past three centuries, doubled in size every 10 to 15 years.

El 80 al 90 por ciento de todos los científicos que hubo están vivos hoy. Esta declaración vale para cada año desde 1700, y tal vez desde antes. Además, cualquier científico, rememorando al final de su carrera, encontrará que el 80 al 90 por ciento del aporte científico en su tema tuvo lugar delante de sus propios ojos. Cada científico retirado es un historiador de cuerpo presente para casi toda la ciencia que se ha desarrollado en su disciplina. Así vemos que, dependiendo del parámetro empleado, la entidad que llamamos ciencia, en los tres siglos pasados, se ha visto duplicada cada 10 a 15 años.

Terence Keale

More is less. Economists and governments lag decades behind Derek Price's thinking.

Nature 2000; 405: 279