



Universitat de Girona

EL INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI): UN ANTAGONISTA DEL EGF CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Carmen BLANCO APARICIO

Dipòsit legal: Gi. 1879-2012

<http://hdl.handle.net/10803/96759>



El Inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI): un antagonista del EGF con actividad antitumoral està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

© 1998, Carmen Blanco Aparicio



UNIVERSITAT DE GIRONA

UNITAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

**EL INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI):
UN ANTAGONISTA DEL EGF CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por Carmen Blanco Aparicio.

Trabajo realizado en la Universidad de Girona bajo la dirección de los
Drs. Rafael de Llorens Duran y Miguel Ángel Molina Vila.

Doctoranda

Directores,

Carmen Blanco

Dr. Rafael de Llorens

Dr. Miguel Ángel Molina

GIRONA, JULIO DE 1998



AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que han estado a mi lado en los buenos, los no tan buenos y los malos momentos y han hecho posible de una manera u otra que este trabajo finalmente "vea la luz". Por lo tanto, ha llegado el momento de agradecerle a toda esta gente su ayuda, su esfuerzo compartido, su apoyo o simplemente su presencia cuando lo he necesitado. ¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!.

Durante estos años, muchos han sido los lugares donde he tenido la suerte de ir y mucha la gente con la que he tenido la oportunidad de compartir estos momentos, pero MI FAMILIA ha sido la que en todo momento, estuviera cerca o lejos, me ha apoyado en todo lo que hacía, aunque muchas veces no lo entendieran. Ha hecho que continuamente me diera cuenta de lo importante que son ellos para mí. Por ello, quiero que sepan que todo lo que he conseguido me ha sido mucho más fácil porque siempre he sabido que los tenía detrás y estaban orgullosos de los que hacía.

Mi trayectoria investigadora se inició en el IBF, y fue allí donde tuve mis primeros "maestros" y a la vez amigos. Por ello les quiero agradecer que me iniciaran y posteriormente me ilusionaran a continuar haciendo ciencia, pues ha sido muy positivo tanto en lo profesional como en lo personal. En el resto de años que he pasado en Girona, he tenido la suerte de formar parte de UN GRUPO de gente que me han demostrado que se puede hacer ciencia y ser buenos amigos a la vez, "estando a las duras y a las maduras" por ello les quiero dar un agradecimiento especial.

Estos han sido unos años muy viajeros, y por ello quiero recordar con un cariño especial a toda la gente que he conocido en mis viajes a Houston, a Bilbao y al IBF y que me han ayudado tanto en lo científico como en lo personal.

¡Como no!, también ha habido otras personas que sin saber nada de ciencia han ayudado a que este trabajo "*vea la luz*". Agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado en la parte técnica de este trabajo, gracias por ser tan pacientes. Y por supuesto, muchas gracias a mis AMIGOS, a los que he tenido la suerte de ver más a menudo, y a los que han sabido conservar la amistad a pesar de las distancias. Gracias por escucharme, compartir la vida conmigo y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Este trabajo se ha realizado en el departamento de Biología de la Universitat de Girona gracias a una beca de Formación de Personal Investigador de la Direcció General de Universitats. Se ha complementado con Estancias Cortas en el Extranjero que se han desarrollado en el Departament of Gastrointestinal Diseases del M.D. Anderson Cancer Center (Houston, USA) en colaboración de la Dra. M.L Frazier y con Estancias Cortas en el laboratorio de Biología Celular y Ciencias Morfológicas de la Universidad del País Vasco en colaboración con el Dr. Fernando Vidal Vanaclocha, y en los laboratorios de enzimología y Bioinformática del Institut de Biologia Fonamental “V. Villar i Palasi” de la Universitat Autònoma de Barcelona en colaboración con los Drs. F.X. Avilés y E.Querol.

El trabajo ha estado subvencionado por la CICYT del Plan I+D Salud y farmacia SAF 94-0939 del Ministerio de Educación y Ciencia, y por la Direcció General de Universitats (infraestructura).

Índice

ÍNDICE.....	I
RESUMEN.....	IX
ABREVIATURAS.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.A. LA CELULA NORMAL.....	1
I.A.1. La comunicación celular.....	1
I.A.1.a. Los factores de crecimiento polipeptídicos.....	2
I.A.1.a.1. Los factores de crecimiento de la familia EGF.....	3
I.A.1.b. Receptores.....	6
I.A.1.b.1. Los receptores de los ligandos tipo EGF: ErbBs.....	7
I.A.2. El ciclo celular y su regulación.....	10
I.A.2.a. La muerte celular programada.....	11
I.A.2.b. Regulación molecular del ciclo celular.....	12
I.B. BREVE INTRODUCCIÓN AL CÁNCER.....	14
I.B.1. La Génesis del cáncer: la transformación celular maligna.....	14
I.B.2. Bases moleculares del cáncer.....	16
I.B.3. La invasividad tumoral y metástasis. Papel de las proteasas en el proceso neoplásico.....	19
I.C. CARCINOMAS.....	23
I.C.1. Características generales.....	23
I.C.1.a. El EGF y el EGF-R como dianas terapéuticas en el tratamiento de carcinomas.....	24
I.C.2. El cáncer de páncreas.....	27
I.C.2.a. Patologías neoplásicas del páncreas.....	27
I.C.2.b. Adenocarcinomas del páncreas exocrino.....	28
I.C.2.b.1. Epidemiología y etiología del cáncer de páncreas exocrino.....	28
I.C.2.b.2. Adenocarcinomas pancreáticos: características histológicas.....	30
I.C.2.b.3. Bases moleculares de los adenocarcinomas pancreáticos.....	32
I.C.2.b.4. Sintomatología y diagnóstico de los adenocarcinomas pancreáticos.....	35
I.C.2.b.5. Terapias de los adenocarcinomas pancreáticos.....	37
I.C.2.c. Insulinomas.....	39
I.C.2.c.1. Bases moleculares de los insulinomas.....	40
I.C.2.c.2. Sintomatología, diagnóstico y terapia.....	40
I.C.2.d. Modelos experimentales para el estudio del cáncer de páncreas.....	41
I.C.2.d.1. Modelos "in vitro": líneas celulares.....	42
I.C.2.d.2. Modelos animales "in vivo".....	44
I.C.3. Tumores de plexo coroideo.....	46
I.C.3.a. Epidemiología, etiología y terapia de los tumores de plexo coroideo.....	46
I.C.3.b. Histología de las patologías neoplásicas del plexo coroideo.....	48
I.C.3.c. Modelos experimentales para el estudio de las neoplasias de plexo coroideo.....	49

I.D. <u>LOS INHIBIDORES PROTEICOS DE PROTEASAS</u>	50
I.D.1. Inhibidores de proteasas y cáncer.....	51
I.D.2. El Inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI).....	52
I.D.2.a. Características generales.....	52
I.D.2.b. Interacciones entre el PCI y la Carboxipeptidasa (CPA).....	55
I.D.2.c. Aplicaciones del PCI.....	56
II. OBJETIVOS	61
III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
<u>III.A. OBTENCIÓN DE PCI RECOMBINANTE</u>	65
III.A.1. EQUIPO Y PRODUCTOS QUÍMICOS EN GENERAL.....	65
III.A.1.a. Equipo.....	65
III.A.1.b. Productos químicos.....	65
III.A.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	65
III.A.2.a. Medios de cultivo.....	65
III.A.2.b. Cepa utilizada y mantenimiento de la misma.....	66
III.A.2.c. Condiciones de cultivo de <i>E.coli</i> productora de PCI.....	67
III.A.3. EXPRESIÓN DEL PCI RECOMBINANTE.....	67
III.A.3.a. Preparación de una fermentación.....	67
III.A.3.b. Obtención del inóculo.....	68
III.A.3.c. Fermentación: discontinua alimentada.....	68
III.A.4. PURIFICACIÓN DEL PCI RECOMBINANTE.....	69
III.A.4.a. Obtención del medio extracelular del cultivo por fermentación.....	69
III.A.4.b. Concentración por cromatografía de fase reversa.....	70
III.A.4.c. FPLC de intercambio aniónico.....	70
III.A.4.d. HPLC de fase reversa.....	71
<u>III.B. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</u>	71
III.B.1. Métodos de cuantificación de proteínas.....	71
III.B.1.a. Determinación de la concentración de proteína.....	71
III.B.1.b. Determinación de la concentración de PCI recombinante.....	72
III.B.1.b.1. Absorbencia a 280nm.....	72
III.B.1.b.2. Determinación de la actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A.....	72
III.B.1.b.3. Ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).....	73
<u>III.C. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR</u>	74
III.C.1. Equipos y material básico.....	74
III.C.2. Medios y disoluciones.....	75
III.C.3. Líneas celulares utilizadas.....	76
III.C.3.a. Líneas comerciales (ATCC).....	76
III.C.3.b. Líneas procedentes del M.D. Anderson Cancer Center.....	77
III.C.3.c. Líneas establecidas por el grupo.....	77
III.C.4. Mantenimiento de las líneas celulares.....	77
III.C.4.a. Mantenimiento del cultivo.....	77
III.C.4.b. Tripsinización.....	77
III.C.4.c. Recuento directo.....	77
III.C.4.d. Congelación y descongelación.....	78

III.C.5. Estudio de los efectos producidos por el PCI.....	79
III.C.5.a. Disoluciones de PCI para incorporar a los cultivos.....	79
III.C.5.b. Efectos del PCI sobre el crecimiento celular.....	79
III.C.5.b.1. Recuento directo del número de células mediante hemocitómetro.....	79
III.C.5.b.2. Ensayo de proliferación por determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio.....	80
III.C.5.b.3. Determinación de la curva de crecimiento de la línea celular Capan-1 en presencia y ausencia de PCI.....	81
III.C.5.b.4. Estudios del efecto del tratamiento prolongado con PCI sobre el crecimiento celular.....	81
III.C.5.b.5. Estudio del efecto del PCI sobre la proliferación celular inducida por el EGF y la insulina.....	82
III.C.5.c. Efectos del PCI sobre otros procesos celulares.....	82
III.C.5.c.1. Citotoxicidad.....	82
III.C.5.c.2. Análisis por citometría de flujo de la distribución de las fases del ciclo celular.....	83
III.D. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA.....	84
III.D.1. Marcado del PCI con RITC.....	84
III.D.2. Determinación del PCI marcado.....	85
III.D.3. Incorporación de RITC-PCI a los cultivos celulares.....	85
III.E. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DETECCIÓN DE RNAS MENSAJEROS.....	85
III.E.1. Sondas utilizadas.....	86
III.E.2. Marcado radiactivo de las sondas. Purificación de la sonda marcada.....	86
III.E.3. Purificación de RNA mensajero poli (A+).....	87
III.E.3.a. Almacenamiento de las muestras.....	87
III.E.3.b. Extracción de RNA total.....	87
III.E.3.c. Electroforesis con ácido cítrico.....	87
III.E.3.d. Obtención de RNA poli (A+).....	88
III.E.4. Transferencia tipo Northern.....	89
III.E.4.a. Geles desnaturalizantes de agarosa y formaldehído.....	90
III.E.4.b. Transferencia.....	90
III.E.4.c. Fijación del RNA al filtro.....	91
III.E.4.d. Prehibridación.....	91
III.E.4.e. Hibridación.....	92
III.E.4.f. Lavados.....	92
III.E.4.g. Autorradiografía.....	92
III.E.4.h. Recuento de la emisión beta.....	93
III.E.4.i. Eliminación de la sonda.....	93
III.F. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE RECEPTORES.....	93
III.F.1. Ensayos de unión competitiva del PCI al receptor del factor de crecimiento epidérmico.....	93
III.F.2. Electroforesis discontinua en geles de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE).....	94
III.F.3. Inducción de la dimerización del receptor de EGF.....	95
III.F.3.a. Obtención de extractos celulares.....	98
III.F.3.b. Inducción de la dimerización del EGF-R y entrecruzamiento químico de los dímeros formados.....	98

III.F.3.c. Detección por inmunotransferencia de monómeros y dímeros del EGF-R.....	96
III.F.3.c.1. Transferencia.....	97
III.F.3.c.2. Detección inmunológica por revelado específico con anticuerpos.....	97
III.F.4. Determinación del grado de fosforilación del receptor de EGF.....	98
III.F.4.a. Obtención de los extractos celulares.....	98
III.F.4.b. Inmunoprecipitación.....	99
III.F.4.c. Ensayos de actividad quinasa utilizando complejos inmunes (ICKA).....	99
III.F.4.d. Detección por inmunotransferencia de proteínas fosforiladas en tirosinas.....	100
III.G. <u>MODELOS ANIMALES</u>.....	100
III.G.1. Ensayos de metástasis <i>in vivo</i>	100
III.G.1.a. Preparación de las células para su inoculación y tratamiento de los ratones.....	101
III.G.1.b. Determinación del número de metástasis formadas.....	101
III.G.2. Ensayos con ratones atímicos.....	101
III.G.2.a. Caracterización histológica de los tumores.....	102
III.G.3. Ensayos con ratones transgénicos.....	102
III.G.3.a. Descripción de la línea transgénica.....	103
III.G.3.b. Tratamiento de los ratones.....	103
III.G.3.c. Procesamiento de los ratones.....	104
III.H. <u>TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS</u>.....	104
III.H.1. Caracterización inmunohistoquímica mediante la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta.....	105
III.I. <u>TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS</u>.....	107
III.I.1. Comparación topológica entre el PCI y otras moléculas por análisis computacional.....	107
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
IV.A. <u>OBTENCIÓN DEL rePCI POR FERMENTACIÓN</u>.....	111
IV.B. <u>EFFECTO DEL PCI SOBRE DIFERENTES LÍNEAS CELULARES</u>.....	114
IV.B.1. Efectos del PCI sobre la proliferación celular.....	114
IV.B.1.a. Crecimiento relativo en presencia de PCI.....	114
IV.B.1.b. Curvas de crecimiento.....	120
IV.B.1.c. Pretratamiento con PCI: efectos sobre el crecimiento.....	122
IV.B.1.d. Citotoxicidad del PCI.....	126
IV.C. <u>EL EFECTO DEL PCI EN MODELOS ANIMALES</u>.....	129
IV.C.1. Inhibición por el PCI de la aparición de metástasis en el modelo del melanoma B16F10.....	129
IV.C.2. Inhibición por el PCI de tumores implantados en ratones atímicos.....	130
IV.C.3. Ensayos con ratones transgénicos.....	134

IV.C.3.a. Caracterización histopatológica de la línea transgénica.....	134
IV.C.3.b. Estudio del efecto del PCI en la supervivencia de la línea transgénica.....	141
IV.D. MECANISMO CELULAR DE ACCIÓN DEL PCI.....	144
IV.D.1. Incorporación del PCI por las líneas celulares.....	144
IV.D.1.a. Determinación de la desaparición del PCI añadido al medio de cultivo de la línea Capan-1.....	144
IV.D.1.b. Estudios de internalización mediante fluorescencia.....	146
IV.D.1.b.1. Marcado del PCI con RITC.....	147
IV.D.1.b.2 Internalización de RITC-PCI por parte de las líneas celulares.....	147
IV.D.2. Alteración de la distribución de las fases del ciclo celular en la línea Capan-1 inducida por el PCI.....	149
IV.D.3. Análisis de la alteración de la expresión génica de la p53 y la tripsina provocada por el PCI.....	150
IV.E. COMPARACIÓN POR MÉTODOS COMPUTACIONALES DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DEL PCI Y DIVERSAS NOTINAS.....	154
IV.F. MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DEL PCI.....	155
IV.F.1. Estudios de la unión del PCI al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R).....	156
IV.F.1.a. Competición del PCI con el EGF por la unión al EGF-R.....	156
IV.F.1.b. Inhibición por el PCI de la dimerización del EGF-R inducida por el EGF.....	162
IV.F.1.c. Efecto inhibitorio del PCI sobre la inducción por EGF de la actividad quinasa del EGF-R.....	164
IV.F.1.d. Inhibición debida al PCI de la transfosforilación del EGF-R inducida por el EGF.....	168
IV.G. DISCUSIÓN GENERAL.....	171
V. CONCLUSIONES.....	183
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	187
VII. APÉNDICE.....	215

Resumen

Resumen

En la última década se ha demostrado que una gran variedad de inhibidores de proteasas de diferentes orígenes tienen una fuerte actividad anticarcinogénica tanto *in vitro* como *in vivo*. Si bien se conocen los posibles procesos de la génesis y desarrollo tumoral en los que pueden interferir, se desconoce con exactitud el mecanismo por el cual muchos de estos inhibidores contribuyen a la prevención del cáncer. El presente trabajo constituye una aportación significativa en dicho contexto. En primer lugar, se ha demostrado que el inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) tiene un efecto inhibitorio no ya sobre la carcinogénesis sino sobre el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. En segundo lugar, se ha estudiado su mecanismo de acción, lo que ha llevado a descubrir que el PCI es un antagonista del EGF, el primero que se describe. Con dicho fin se han utilizado técnicas de cultivo celular en conjunción con técnicas bioquímicas, de biología molecular, de análisis computacional y ensayos con modelos animales.

Se ha determinado que el PCI inhibe el crecimiento de líneas celulares tumorales de diferentes orígenes. Dicho efecto inhibitorio aparece a largo plazo y se mantiene incluso en ausencia del inhibidor. Mediante diferentes modelos animales se ha podido comprobar que el PCI inhibe el crecimiento de tumores inducidos en ratones atímicos y, así como, la aparición de metástasis de ratones inoculados con células singénicas. Además, se ha caracterizado una línea de ratones transgénicos que desarrolla tumores de plexo coroideo e insulinomas, lo que ha permitido ensayar posteriormente el efecto del PCI observándose que dicho inhibidor alarga la supervivencia de los ratones.

Estos estudios se han completado con diferentes ensayos que han permitido establecer el mecanismo celular y molecular de acción del PCI. Se han realizado análisis de citometría de flujo en los que se ha detectado que el PCI provoca un aumento de células apoptóticas y cierta parada en G_0/G_1 , que se ha relacionado con aumento en la expresión del mRNA de p53. Se ha determinado, así mismo, que el PCI es internalizado por las células sobre las que tiene efecto sin que sea modificado.

Mediante análisis computacional se ha establecido que el plegamiento especial de puentes disulfuro que posee el PCI, denominado T-Knot, está también presente en diferentes factores de crecimiento, como el EGF o el TGF- α . Las similitudes estructurales entre el PCI y dichos factores de crecimiento han llevado a estudiar la interacción del inhibidor con el receptor del EGF (EGF-R). El EGF, el TGF- α y su receptor están implicados en muchos aspectos del desarrollo de los carcinomas, entre los que se incluye el crecimiento tumoral, la vascularización, la invasividad y metástasis. El EGF-R se sobreexpresa en muchos tumores de origen epitelial y es una posible diana para la terapia antitumoral. En el presente trabajo se ha demostrado que el PCI es un antagonista del EGF humano, que compite con dicho factor de crecimiento por la unión a su receptor y inhibe la dimerización, actividad quinasa y transfosforilación del EGF-R inducida por el EGF, así como la proliferación celular inducida por dicho factor de crecimiento. Por todo ello, el PCI tiene un gran interés tanto teórico como aplicado, y constituye un posible nuevo fármaco antitumoral.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

- A:** absorbencia
aa: aminoácido(s)
Ab: anticuerpo
Ac: acetato
AcOH: ácido acético
Ag: antígeno
Ap: ampicilina
ATCC: colección tipo de cultivos celulares de los EE.UU.
B: cantidad de unión específica en presencia de una concentración determinada de competidor
BBi: inhibidor de Bowman-Birk
BCECF-AM: 2',7'-bis-(2-carboxi-etilo)-5-(6)carboxifluoresceína, aminóxido- metilo ester
BKV: virus BK
B₀: cantidad de unión específica en ausencia de competidor
BPB: azul de bromofenol
BRCA: gen de susceptibilidad al cáncer de mama
BrCN: bromuro de cianógeno
BrEt: bromuro de etidio
BSA: albúmina sérica bovina
CAII: anhidrasa carbónica II
CASaa: hidrolizado ácido de caseína
cc: concentración
CdK: quinasas dependientes de ciclinas
cél: células
Conc.: concentración
CPA: carboxipeptidasa A
CPB: carboxipeptidasa B
cpm: cuentas por minuto
Crec.: crecimiento
CSF: líquido cefaloraquídeo
CT: tomografía computerizada
d: día(s)
Da: daltons
DAB: diaminobenzidina
dATP: tiotriofosfato de 2'-desoxiadenosina
dCTP: tiotriofosfato de 2'-desoxicitidina
(α -³²P) dCTP: 5'-(α ³²P)-tiotriofosfato de 2'-desoxicitidina
DEAE: dietilaminoetil
DEP: dietilpirocarbonato
dGTP: tiotriofosfato de 2'-desoxiguanosina
dH₂O: agua destilada
DMAB: ácido 3-dietilaminobenzoico
DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DO: densidad óptica
dT: desoxitimidina
DTM: desoxirribonucleótidos en tampón de marcado
dTTP: tiotriofosfato de 2'-desoxitimidina
E_{0,1%}: coeficiente de extinción de una solución al 0,1%
EBSS: solución salina tamponada de Eagle
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGF-R: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA: ensayo de inmunosorbente ligado a enzima
ERCP: colangiopancreatografía endoscópica retrógrada
FBS: suero fetal bovino
Fc: región constante de las inmunoglobulinas
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
FPLC: cromatografía rápida de alta resolución
GAR-Po: anticuerpo de cabra contra la región constante de las inmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa
GGF: factor de crecimiento glial
h: hora(s)
HAMA: anticuerpos humanos contra anticuerpos de ratón
HB-EGF: factor de crecimiento de unión a heparina tipo EGF
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
IC₅₀: concentración de competidor que inhibe el 50% de la unión específica.
ICKA: ensayo de actividad quinasa utilizando complejos inmunes

- ¹²⁵I-EGF:** EGF marcado radiactivamente con ¹²⁵I
- I.F.:** intensidad de fluorescencia
- Inh.:** inhibición
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IGF:** factor de crecimiento insulínico
- IL-:** interleucina
- IPTG:** isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
- Kb:** kilobases
- KDa:** kilo daltons
- K_i:** constante de inhibición
- lac I:** gen para el represor lac
- lacZ_{po}:** promotor-operador lac
- lpp:** promotor de lipoproteína
- LS:** solución de ligación
- MAb:** anticuerpo monoclonal
- MBTH:** 3-metil-2-benzotiazonilona hidrazona hidrocloreto monohidrato
- M9CAS:** medio mínimo M9 con casaminoácidos
- min:** minuto(s)
- MMP:** metaloproteasa de la matriz
- MOPS:** 3-(N-morfolin) propanosulfónico
- mRNA:** ácido ribonucleico mensajero
- MT-MMP:** metaloproteasa de la matriz de membrana
- NET:** tampón Tris/ EDTA cloruro sódico
- OL:** oligodesoxirribonucleótidos
- OmpA:** proteína de membrana interna de *E.coli*
- ompA:** gen para el péptido señal de la proteína OmpA
- o/n:** toda la noche
- P:** porcentaje de unión específica
- p:** plásmido
- PAGE:** electroforesis en gel de policacrilamida
- ³²P-ATP:** (α-³²P)-tiotriofosfato de 2'-desoxiadenosina
- pb:** par(es) de bases
- PBS:** tampón fosfato salino
- PCI:** inhibidor de carboxipeptidasa de patata
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PDB:** banco de datos de proteínas
- PI:** yoduro de yodopropidio
- PMP:** partículas paramagnéticas
- PMSF:** fenilmetilsulfonilfluoruro
- pO₂:** presión de oxígeno
- poli (A+):** poliadenosina
- PVDF:** difluoruro de polivinilideno
- RB:** retinoblastoma
- rePCI:** inhibidor de carboxipeptidasa de patata recombinante
- RIPA:** ensayo de inmunoprecipitación de receptor
- RITC:** rodamina B isotiocianato
- RITC-PCI:** PCI unido a RITC
- RMN:** resonancia magnética nuclear
- r.m.s.:** raíz cuadrática media
- RMSD:** desviación de la raíz cuadrática media
- RNA:** ácido ribonucleico
- RNAsa A:** ribonucleasa A bovina
- rpm:** revoluciones por minutos
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- sem:** error estándar medio
- SFM:** medio libre de suero
- SSC:** tampón citrato sódico salino
- SSPE:** tampón EDTA fosfato sódico salino
- SV40:** cepa 40 del virus de simios
- t_d:** tiempo de duplicación
- TE:** Tampón Tris /EDTA
- TEMED:** N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminoetano
- temp.:** temperatura
- TFA:** ácido trifluoroacético
- TGF-α:** factor de crecimiento transformante alfa
- TGF-β:** factor de crecimiento transformante beta
- TIMP:** inhibidor de metaloproteasa tisular
- TM:** tampón de marcado
- TNF:** factor de necrosis tumoral
- Tris:** hidroximetilaminometano
- tRNA:** ácido ribonucleico de transferencia
- UA:** unidades de absorbencia
- US:** ultrasonografía abdominal
- UV:** ultravioleta
- V:** volumen
- VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular
- v:v:** relación volumen/volumen
- xg:** fuerza centrífuga relativa

Introducción

I.A. LA CÉLULA NORMAL

I.A.1. LA COMUNICACIÓN CELULAR

Las células de los organismos multicelulares necesitan recibir estímulos, responder a su entorno y coordinar su comportamiento, lo que hacen de diversas maneras. Durante el desarrollo, las células del embrión intercambian señales para determinar cómo se diferenciará cada una, que posición ocupará y si morirá, vivirá o se dividirá. Posteriormente, una considerable variedad de señales coordina el crecimiento, fisiología y comportamiento del organismo.

Las señales que se transmiten entre células consisten, generalmente, en una determinada molécula producida por una célula -la célula emisora- y detectada por otra -la célula receptora- a través de una proteína receptora, que reconoce y responde específicamente a la molécula señal. Esta proteína receptora realiza el primer paso en una serie de procesos de transducción de la señal, que convierten la señal extracelular en una señal intracelular que modifica la actividad de la célula.

Las células de los organismos multicelulares utilizan cientos de moléculas extracelulares para enviar señales a otras células: proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, derivados de ácidos grasos e incluso gases. Existen 5 vías de transmisión de estas señales extracelulares entre células (Figura I.1):

- Endocrina: la molécula señal -hormona- se vierte al torrente circulatorio.
- Paracrina: la molécula señal -mediador local- se dispersa localmente a través del medio extracelular, manteniéndose en la vecindad de la célula que la ha secretado. Muchos de los factores de crecimiento polipeptídicos y muchas de las moléculas que regulan la inflamación en el lugar de infección o la proliferación celular en una herida actúan de este modo.
- Autocrina: la molécula señal actúa sobre la misma célula que la ha secretado. Muchos factores de crecimiento pueden actuar por esta vía.
- Comunicación neuronal: cuando una señal externa activa a una neurona, se generan impulsos eléctricos que estimulan la secreción de un neurotransmisor que viaja por el espacio intersináptico y actúa sobre la célula diana.
- Señal dependiente de contacto (o yuxtacrina): en este caso no se requiere la liberación de una molécula secretada, sino que las células contactan directamente con las moléculas señal que se encuentran en sus membranas plasmáticas. El mensaje se transmite gracias a la unión de una molécula anclada en la membrana de la célula emisora a la molécula receptora de la membrana de la célula adyacente en íntimo contacto.

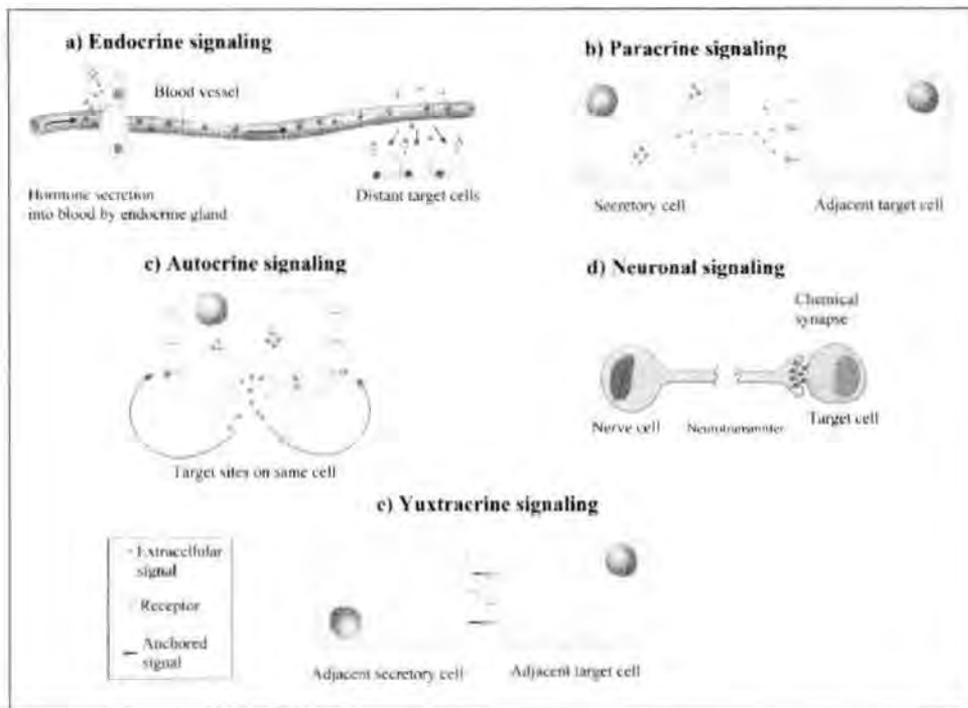


Figura I.1.: Mecanismos de transmisión de señales célula-célula mediante productos extracelulares. a) endocrino, b) paracrino, c) autocrino, d) neuronal, e) yuxtacrino. (Tomado de Darnell et al, 1990)

I.A.1.a. Los factores de crecimiento polipeptídicos

Toda célula animal debe recibir señales químicas estimuladoras para dividirse, o bien señales negativas para no hacerlo. Estas señales son las que le permiten superar o no los puntos de control del ciclo celular y son, principalmente, factores de crecimiento proteicos.

Los factores de crecimiento son moléculas solubles que se unen a un receptor de membrana, y activan vías de transducción de señal intracelulares, que en la mayoría de los casos estimulan o bloquean el crecimiento, la división o la diferenciación celular. Muchos de estos factores se han identificado y caracterizado por sus efectos en el crecimiento de células en cultivo (Tabla I.1.). La mayoría de células animales requieren una combinación específica de distintos factores de crecimiento para dividirse en cultivo, de lo contrario permanecen en fase G_0 o entran en apoptosis. Lo mismo ocurre, probablemente, en los tejidos del organismo vivo.

Los factores de crecimiento están pues implicados en la supervivencia celular *in vivo* y tienen un papel crucial en los mecanismos de control del desarrollo de tejidos y órganos. Además de su actividad promotora del crecimiento e inductora de la diferenciación, los factores de crecimiento son capaces de producir una gran variedad de efectos en las células dianas, incluidos diversos efectos metabólicos, la inducción de la expresión de más receptores para ellos mismos o para otros factores de crecimiento, la apoptosis. Por todo ello, los

factores de crecimiento están implicados en importantes procesos fisiológicos como son la inflamación, las reacciones inmunes y la reparación de tejidos (Canalis y col., 1988; Wahl y col., 1989).

Tabla I.1: Algunos ejemplos de factores de crecimiento.

Factor	Acción representativa *
Factor derivado de plaquetas (PDGF)	Estimula la proliferación de células de tejidos conectivos
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Estimula la proliferación de células de la piel
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Estimula la proliferación de fibroblastos
Factor de crecimiento hepático (HGF)	Estimula la proliferación de hepatocitos
Eritropoyetina	Estimula la proliferación y diferenciación de los glóbulos rojos

* Excepto la eritropoyetina, todos los factores de crecimiento citados estimulan la proliferación de diversos tipos celulares.

Los factores de crecimiento tienen, en general, una actuación paracrina y autocrina. La producción y alcance de estos factores está modulada con extrema precisión; lo que se consigue regulando muy finamente la expresión de sus receptores, o estimulando en el momento y lugar adecuados la secreción de la cantidad precisa de factores de crecimiento. Se sintetizan en forma de precursores inactivos y/o unidos a membrana, a proteoglicanos de la matriz extracelular, o a proteínas específicas (Pimentel, 1994).

1.A.1.a.1. Los factores de crecimiento de la familia EGF

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido de 6-kda (53 aa) que presenta una potente actividad mitogénica en una gran diversidad de tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (Carpenter y Cohen, 1979; Laurence y Gusterson, 1990). El EGF se aisló originariamente de las glándulas submaxilares de ratón, donde está presente en cantidades elevadas (Cohen, 1962). El equivalente humano del EGF de ratón (también conocido como urogastrona) se aisló y caracterizó por primera vez de orina en 1975 (Gregory, 1975).

Diferentes tipos celulares sintetizan y secretan EGF, que se halla presente en la sangre y varios fluidos corporales como la orina, la leche, el calostro, la saliva, el fluido seminal, el jugo pancreático, el fluido cerebrospinal y el líquido amniótico (Carpenter y Zendegui, 1986).

El papel fisiológico preciso del EGF aún no se ha determinado. Se ha comprobado que puede estimular o inhibir la proliferación y/o diferenciación de una gran variedad de células. Los efectos del EGF dependen del tipo celular y del estado de diferenciación. Así, estimula la

proliferación y maduración de la epidermis, el epitelio pulmonar y el epitelio de la córnea. Además, está implicado en la regulación de importantes actividades metabólicas y fisiológicas, como el transporte de iones, la estimulación de la fosforilación de proteínas endógenas, alteraciones en la morfología celular, y estimulación de la síntesis de DNA (Pimentel, 1994).

El EGF se biosintetiza en mamíferos en forma de un largo precursor (Scott y col., 1983; Gray y col., 1983). El mRNA del pre-precursor contiene alrededor de 4750 nucleótidos y codifica un precursor de EGF de 1217 aminoácidos (130.000 Da). La secuencia amino-terminal del precursor de EGF contiene 7 péptidos con secuencias similares pero no idénticas a la del EGF. Este precursor es procesado en EGF 1-53, que tiene una masa molecular de 6215 Da e incluye 6 residuos de cisteína que forman 3 puentes disulfuro. La estructura tridimensional del EGF presenta 3 bucles que permiten exponer los residuos necesarios para la interacción con el receptor, y a su vez podría proporcionar resistencia a la degradación proteolítica (Campbell y col., 1990).

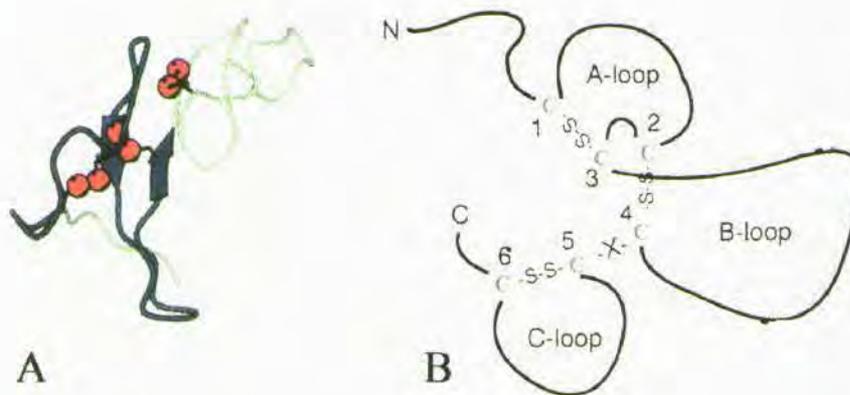


Figura I.2.: El factor de crecimiento epidérmico (EGF). A, Estructura tridimensional; B, Sus bucles. (Tomado de Lin y Nussivov, 1995).

Este modelo de 6 cisteínas (denominado motivo-EGF) se encuentra en un gran número de otras proteínas. Además del EGF se han descrito otros ligandos del receptor de EGF (receptor de la familia de los erbBs), todos ellos con el motivo de 6 cisteínas citado. Así, se puede hablar de factores de crecimiento de la familia EGF que recientemente se han clasificado en 4 grupos funcionales (Riese y Stern, 1998) (Figura I.3.):

- Grupo 1: formado por moléculas tipo EGF que sólo se unen al receptor de EGF (EGF-R o erbB-1), que incluye al propio EGF, al factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y a la anfiregulina
- Grupo 2: formado por moléculas tipo EGF que se unen al erbB-3 y erbB-4 (apartado I.A.1.b.1.), pero que sólo producen la activación del erbB-4; como las heregulinas o neuregulinas (HR/NDF). Además se incluyen el inductor de la actividad

del receptor aviar de acetilcolina (ARIA), el factor derivado de neuronas sensoras y motoras (SMDF) y el factor de crecimiento glial (GGF).

- Grupo 3: formado por moléculas tipo EGF que se unen tanto al erbB-1 como al erbB-4, que incluye a la betacelulina (BTC), la epiregulina (EPI) y el factor de crecimiento de unión a heparina tipo EGF (HB-EGF).

- Grupo 4: formado por Cripto-1 y Criptico, proteínas que contienen las 6 cisteínas características de la familia de factores de crecimiento tipo EGF, aunque les falta alguno de los bucles entre estas cisteínas y hasta el momento no se ha descrito que activen a ninguno de los miembros de la familia erbB, sino posiblemente a otro receptor.

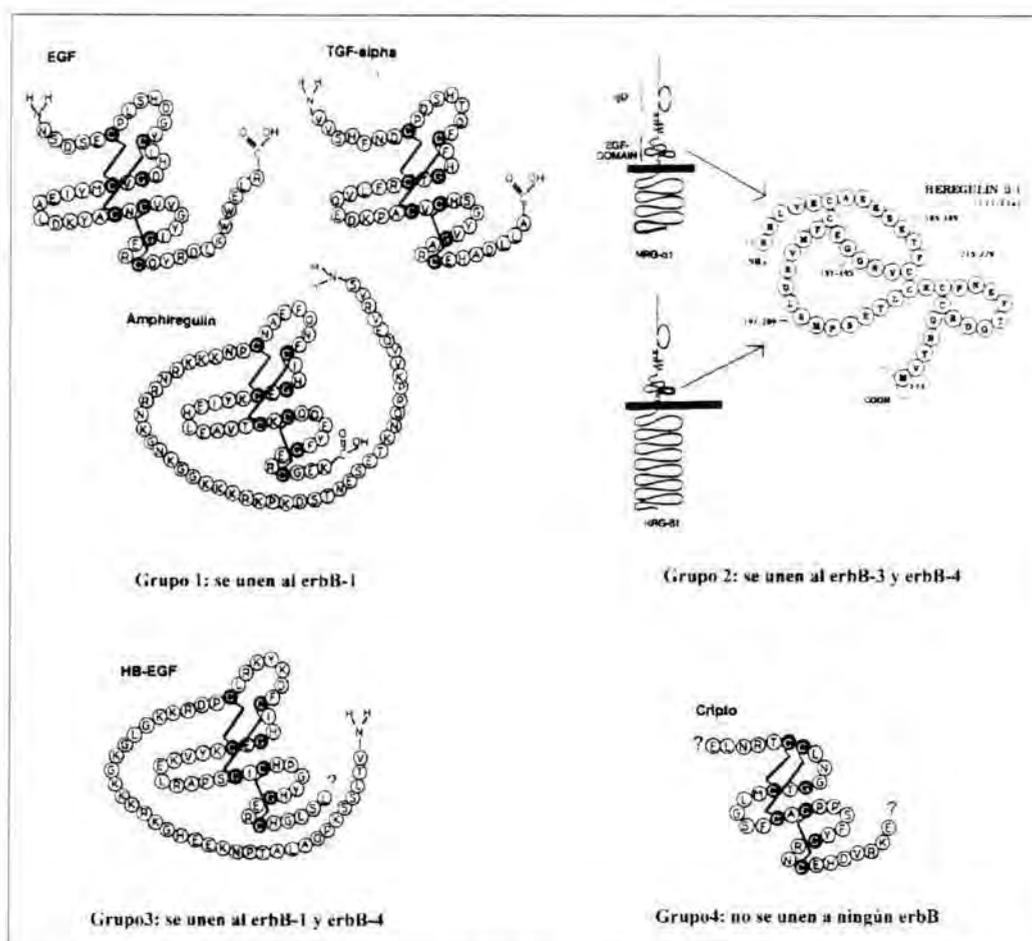


Figura 1.3.: Grupos funcionales de los factores de crecimiento de la familia EGF.

Uno de los factores de crecimiento más estudiados de la familia EGF es el TGF- α , detectado en 1976 como uno de los componentes activos secretados por fibroblastos de ratón transformados con retrovirus (Todaro y De Larco, 1976). Su nombre proviene de que provocaba de manera reversible la aparición de un fenotipo transformado en dichas células. Posteriormente, se describió que se une al receptor de EGF (EGF-R) y media respuestas tipo EGF, siendo aislado y secuenciado unos años más tarde (Anzano y col., 1983; Marquart y col., 1983). El TGF- α es entre 10 y 100 veces más mitogénico que el EGF, mientras que el

EGF produce una regulación negativa ("down regulation") del EGF-R superior. Una vez internalizados, el EGF normalmente se recicla mientras que el TGF- α se degrada rápidamente (Korc y Finman, 1989).

Al igual que el EGF, el TGF- α se ha localizado en diversos tejidos y fluidos celulares. Así, se encuentra en el suero, el calostro y la leche, en tejidos del embrión y el feto (como la propia placenta) y en algunos tejidos adultos como el cerebro, el pulmón y riñón (Roberts y col., 1981). Se expresa como un precursor anclado a membrana, de 160 residuos, que madura para dar una proteína de 50 aa y 7400 Da de peso molecular, que contiene tres puentes disulfuro en posiciones homólogas a los del EGF (Marquart y Todaro, 1982). El TGF- α puede funcionar como factor de estimulación yuxtacrina en procesos del desarrollo a través de la unión del proTGF- α de membrana de una célula al EGF-R de células adyacentes (Massagué, 1990).

El TGF- α tiene importantes efectos fisiológicos en el feto y los animales recién nacidos, aunque se cree que es sustituible por otros miembros de la familia EGF. Los ratones con el gen inactivado por recombinación homóloga ("Knock-out") son viables, aunque con ciertas anomalías (Mann et al, 1993; Luetke y col., 1993). En procesos tumorales, la activación de un bucle autocrino que involucra al TGF- α parece tener un papel muy importante, descrito por primera vez en el cáncer de páncreas (Smith y col., 1987) y posteriormente en casi todos los carcinomas (Derynck y col., 1987). La existencia de este bucle autocrino ha quedado firmemente demostrada cuando se ha transfectado el gen del TGF- α en ratones transgénicos, pues en estos modelos se ha observado que la sobreexpresión de dicho factor de crecimiento produce neoplasia de hígado, neoplasia, metaplasia e hiperplasia pancreática y carcinomas de la glándula mamaria (Sandgren y col., 1990; Jhappan y col., 1990; Sandgren y col., 1993). Por otro lado, el TGF- α derivado de tumores también se ha descrito como un potente factor angiogénico, más potente incluso que el EGF (Okamura y col., 1992).

I.A.1.b. Receptores

Una célula dentro de un organismo multicelular debe responder selectivamente a una gran variedad de señales, descartando algunas y respondiendo a otras. Para que una célula pueda responder a una señal en primer lugar debe poseer un receptor para la misma. Así, el tipo de receptores que posee una célula limita el rango de señales por las que se puede ver afectada.

Los receptores se pueden clasificar fundamentalmente en 2 grandes grupos según las moléculas de señal extracelular que reconocen:

1. Receptores intracelulares: reconocen moléculas suficientemente pequeñas y/o hidrofóbicas como para difundir a través de las membranas celulares (en este grupo se encuentran las hormonas esteroideas), y consecuentemente este tipo de receptores se localiza intracelularmente.
2. Receptores extracelulares: reconocen moléculas que debido a su tamaño o a sus características hidrofílicas no pueden atravesar la membrana plasmática de la célula diana. Estos receptores se encuentran en la membrana plasmática y transmiten la señal a través de la misma. En este grupo se incluyen la gran mayoría de los receptores.

A su vez, la mayoría de los receptores de membrana se pueden clasificar en las tres familias siguientes, que difieren en la naturaleza de la señal intracelular que generan en respuesta a una molécula señal:

- Receptores de canal iónico: generan un flujo de iones que produce un efecto eléctrico.
- Receptores unidos a proteínas G: al activarse el receptor se libera una forma activada de una proteína unida a membrana (subunidad de una proteína G) que difunde a través de la membrana e inicia una cascada de otros efectos. Estos receptores tienen todos una estructura similar, consisten en una única cadena polipeptídica que atraviesa la bicapa lipídica 7 veces (7 Tm).
- Receptores con (o unidos a) actividad enzimática: cuando la molécula señal se une al receptor, se estimula una actividad enzimática en su región citoplasmática o bien un lugar de reconocimiento específico para un enzima que se activa y genera una cascada de señales, incluida la liberación de moléculas en el citosol. Los receptores implicados en la respuesta a factores de crecimiento que regulan el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia en tejidos animales son de este tipo, y se caracterizan por poseer actividad tirosina quinasa en su región citoplasmática.

1.A.1.b.1. Los receptores de los ligandos tipo EGF: ErbBs

Los factores de crecimiento de la familia del EGF interaccionan con receptores que presentan actividad tirosina quinasa en su dominio intracelular. Estos receptores tirosina quinasa constituyen una familia de proteínas relacionadas que se han clasificado en subgrupos de acuerdo con su homología estructural. La subfamilia I comprende los receptores de factores de la familia del EGF (Weiss y col., 1997), que consta de cuatro miembros conocidos, denominados ErbB-1 o receptor de EGF (EGF-R), ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4. Todos ellos comparten una arquitectura estructural común, con una gran parte extracelular

con dos dominios ricos en cisteínas de unión al ligando, un dominio transmembrana y una región citoplasmática con actividad tirosina quinasa (Graus-Porta et al, 1997).

La interacción del ligando con la región extracelular del receptor provoca su activación en un proceso con varias etapas. En primer lugar, se produce la homo o heterodimerización del receptor (Canals, 1992; Earp y col., 1995), de manera que se forma un complejo ligando/receptor 2/2 (Figura I.4.) (Lemmon y col., 1997). Una vez dimerizado, el receptor experimenta un cambio conformacional que se transmite a través de la membrana e induce la actividad quinasa citoplasmática, que fosforila tirosinas específicas de la molécula de receptor inmediatamente adyacente (transfosforilación) y posteriormente, de otras moléculas sustrato. Estas tirosinas fosforiladas son reconocidas por toda una serie de proteínas adaptadoras, con dominios SH₂, que son las encargadas de transducir la señal. Una vez activados, varios complejos receptor/ligando se internalizan por endocitosis (Emlet y col., 1997), formándose endosomas que acaban por unirse a lisosomas primarios, cuyos enzimas proteolíticos degradan los complejos. Una pequeña parte de receptores endocitados vuelve a la membrana por transcitosis (Baass et. al., 1995). Este proceso de endocitosis provoca una disminución del número de moléculas de receptor en membrana tras una estimulación por el factor de crecimiento correspondiente, fenómeno denominado "down-regulation", que hace momentáneamente parcialmente insensible a la célula, protegiéndola de una sobreexcitación. Posteriormente se sintetizarán nuevas moléculas de receptor y la célula volverá a recuperar su estado inicial.

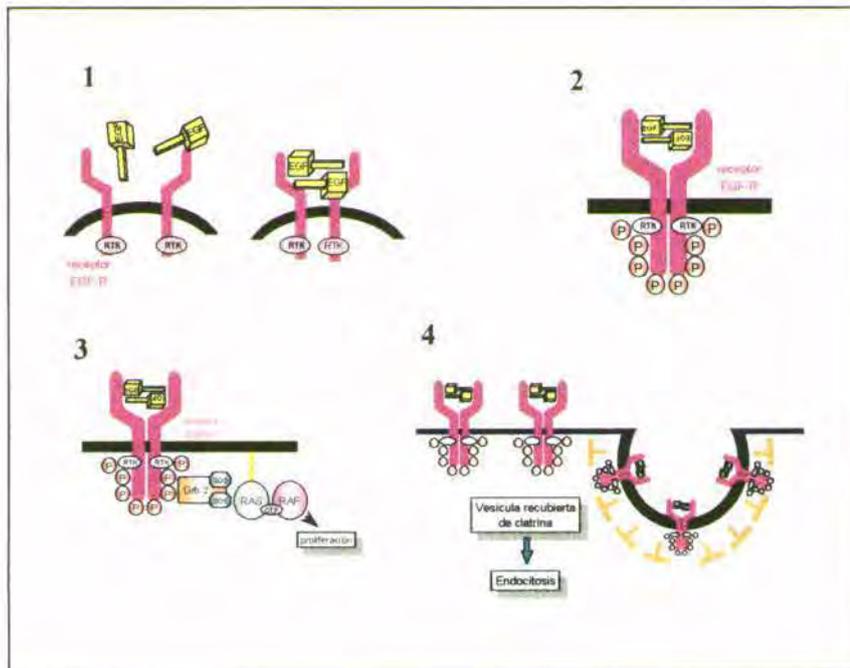


Figura I.4.: Activación del EGF-R. 1: unión del ligando y dimerización del receptor; 2: transfosforilación de los residuos de tirosinas; 3: transducción de la señal; 4: endocitosis del complejo ligando-receptor.

Si una célula expresa varios de los receptores de la familia ErbB, los factores de crecimiento de la familia EGF pueden inducir la fosforilación y transmisión de señal a través de receptores ErbBs a los que no se unen, mediante el fenómeno de la transmodulación (Hynes y Stern, 1994; Earp y col. 1995). Esta transmodulación se consigue mediante la transfosforilación posterior a la formación de heterodímeros no covalentes entre un receptor ocupado por ligando y el otro ErbB. Por ejemplo, el EGF estimula la fosforilación del ErbB-2 cuando este se coexpresa con el EGF-R, pero no cuando se expresa sólo. La transmodulación es un fenómeno muy importante, pues las distintas combinaciones de receptores para formar dímeros presentan diferentes propiedades de transducción de la señal; así se ha establecido una gradación basada en su actividad relativa: $erbB-2/3 > erbB-1/2 = erbB-4/2 > erbB-1/1 = erbB-3/3 = erbB-4/4 > erbB-1/3 = erbB-1/4 = erbB-3/4$ (Pinkas-Kramarski y col., 1996; Tzahar y col., 1996). En ratones bitransgénicos para el TGF- α y el erbB-2 se observa que ambos cooperan de manera sinérgica en la tumorigénesis mamaria a través de un mecanismo que implica la transmodulación erbB-1/erbB-2 (Muller y col., 1996).

El EGF-R se sintetiza como una proteína de 70 kDa que experimenta diferentes modificaciones postranscripcionales, entre las que cabe destacar las glucosilaciones. El receptor se glucosila dando una molécula de 138 kDa, a la que se añaden 7 o más cadenas de oligosacáridos ricas en manosas unidas a través de enlaces N-glucosídicos para dar un intermediario de 160 KDa. A las cadenas de oligosacáridos se les añaden posteriormente azúcares terminales, tipo fucosa y ácido siálico, para dar la forma madura del receptor de 175 kDa (Carlin y Knowles, 1984).

El receptor de EGF se expresa en diferentes tipos celulares. Esta expresión se correlaciona más con el linaje celular y con estados específicos de diferenciación que con la proliferación celular (Real y col., 1986). En situación normal, los receptores de EGF se expresan en tejidos de origen epitelial tanto adultos como fetales, pero no en células hematopoyéticas maduras. La activación del EGF-R tiene como consecuencia la proliferación celular, la morfogénesis y la quimiotaxis. Estos procesos tienen papeles fisiológicos en la remodelación de los tejidos durante la embriogénesis o, en el organismo adulto, durante la reparación de heridas. Threadgill et al (1995) y Sibilía y Wagner (1995) han demostrado, mediante experimentos con ratones a los que se les ha eliminado el gen del EGF-R ("Knock out"), que dicho receptor tiene un papel esencial en la proliferación y diferenciación del compartimento epitelial de órganos como la piel, el folículo piloso, células hematopoyéticas, placenta, áreas de la corteza cerebral y la córnea. También se ha observado que en situación tumoral varios tipos de células neoplásicas presentan una amplificación de las secuencias del gen del EGF-R y, frecuentemente, se encuentran cambios en los niveles de expresión de los ErbBs en células tumorales. A su vez, mientras las células que expresan niveles de EGF-R normales no sufren transformación dependiente de ligando, la exposición continuada de

células con niveles elevados de EGF-R al ligando puede permitir la hiperproliferación. Así, las células premalignas (células transformadas) utilizan la síntesis autocrina de ligandos como mecanismo de hiperproliferación.

I.A.2. EL CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN

Una célula se reproduce realizando una serie ordenada de procesos que le llevan a duplicar su contenido y dividirse en dos. Este ciclo de duplicación y división se conoce como ciclo celular. El ciclo celular eucariota se divide en 4 fases: una fase de replicación del DNA (fase S), seguida por un intervalo (fase G₂) que conecta la fase anterior con la fase de mitosis y citoquinesis (fase M) y otro intervalo entre esta fase de mitosis y la duplicación de nuevo del DNA (fase G₁) (Figura I.5.).

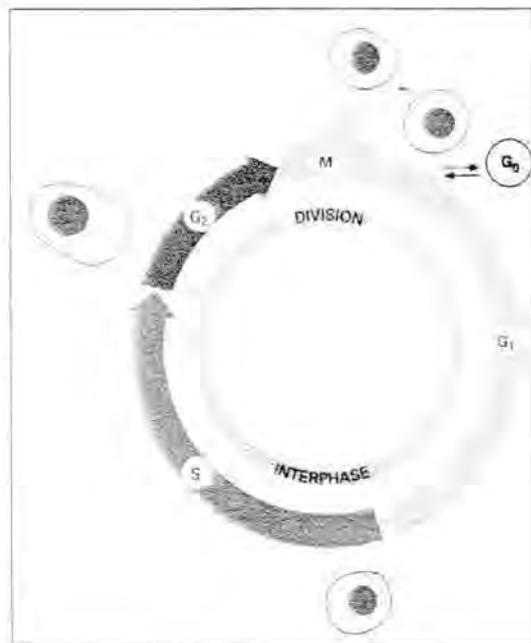


Figura I.5.: Las cuatro etapas sucesivas del ciclo celular eucariota (Tomado de Alberts y col., 1994).

El sistema de control del ciclo celular tiene que activar enzimas y otras proteínas responsables de llevar a cabo cada proceso en el momento adecuado y desactivarlas una vez se ha completado. Se debe asegurar que cada etapa del ciclo se completa antes de que la siguiente empiece. Pero, además, se deben tener en cuenta las condiciones de fuera de la célula. En un organismo multicelular una célula debe responder a las señales provenientes del resto del organismo que estimulan o inhiben la división en función de las necesidades. Así, el sistema de control del ciclo celular tiene un papel primordial en la regulación del número de células en los tejidos del organismo y cuando este sistema no funciona bien en alguna célula puede resultar en cáncer.

I.A.2.a. La muerte celular programada

Las células necesitan señales de otras células y de su entorno (matriz extracelular) no tan sólo para proliferar, sino incluso para sobrevivir. Si se las priva de los factores de supervivencia, activan un programa de suicidio intracelular y mueren mediante un proceso denominado muerte celular programada o apoptosis.

El mecanismo de muerte celular programada es muy importante, tanto durante el desarrollo, como en la renovación de las poblaciones celulares del organismo adulto (cicatrización de heridas, pelo, hematopoyesis). El número de células presente en un organismo multicelular adulto es el resultado de un equilibrio entre proliferación y muerte celular. Un nivel de muerte celular por debajo de los niveles normales puede ser tan peligroso como un exceso de proliferación.

A diferencia de la muerte por necrosis, donde el contenido celular se vierte al exterior provocando respuestas inflamatorias e inmunológicas, la apoptosis es "limpia", sin perjuicio para las células vecinas (Figura I.6.). La célula se contrae, el núcleo se condensa y se activa una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} que corta específicamente el DNA en las regiones internucleosomales (Zelenik y col., 1989). La célula contraída es rápidamente fagocitada por los macrófagos (u otras células vecinas). Para activar este mecanismo las células apoptóticas cambian sus moléculas de superficie para que los macrófagos las puedan reconocer.

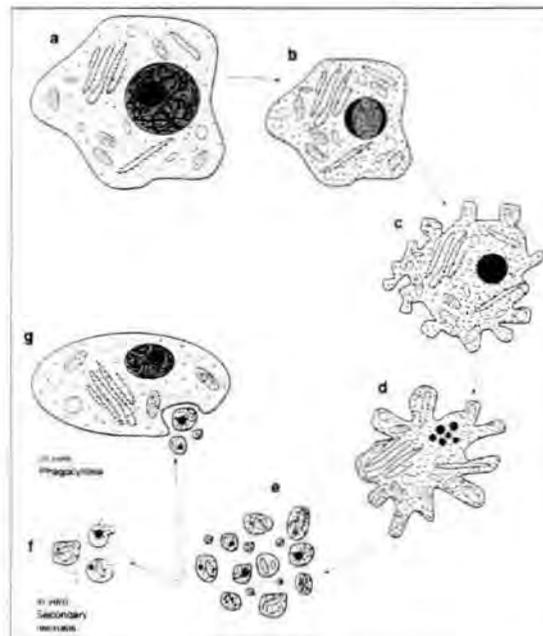


Figura I.6.: Cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis. Primero, la célula normal (a) se contrae y la cromatina se condensa formando medias lunas crecientes alrededor de la membrana nuclear (b). Después, se producen cambios en la membrana (c), finalmente el núcleo se disgrega (d). La célula se rompe en cuerpos apoptóticos (e), que *in vitro* se lisan (f) e *in vivo* se fagocitan(g). (Tomado de Mastrangelo y Betenbaugh, 1998).

I.A.2.b. Regulación molecular del ciclo celular

El sistema de control del ciclo celular regula todo el proceso mediante frenos moleculares que pueden parar el ciclo en varios puntos de control. En G_1 existe un punto de control de tamaño celular, que también permite comprobar que el ambiente es favorable para la proliferación celular antes de entrar en la fase S. En G_2 existe otro punto de control que también controla el tamaño celular antes de entrar en mitosis y permite a la célula comprobar que la replicación del DNA ha sido completa y sin demasiados "errores".

Los puntos de control también son importantes porque son puntos en el ciclo celular donde el sistema de control puede ser regulado por señales de otras células, como los factores de crecimiento u otras moléculas de señal extracelular, que pueden estimular o inhibir la proliferación celular, como ya se ha descrito anteriormente.

El sistema de control del ciclo celular gobierna la maquinaria del ciclo a través de la fosforilación de unas proteínas clave que inician o regulan la replicación del DNA, la mitosis o la citocinesis. Las proteínas quinasas del sistema de control encargadas de estas fosforilaciones están presentes en las células proliferativas a lo largo del ciclo celular, pero sólo se activan en el momento apropiado, después del cual se desactivan rápidamente. Las ciclinas (reciben este nombre debido a que su concentración varía de forma cíclica durante el ciclo) son las proteínas encargadas de activar a dichas quinasas, que por ello se conocen como quinasas dependientes de ciclinas o Cdk.

Hay una gran variedad de ciclinas y de Cdk implicadas en el control del ciclo celular (Figura I.7.). Por ejemplo, la entrada de las células en mitosis depende de la unión de la ciclina MPF (factor promotor de fase-M) a una Cdk. Un tipo distinto de ciclinas, denominadas ciclinas de fase S, se unen a moléculas de Cdk al final de G_1 y permiten el avance hacia la fase S. Hay otras ciclinas, denominadas ciclinas G_1 , que actúan al principio de G_1 uniéndose a moléculas Cdk que ayudan a iniciar la formación y activación de los complejos Cdk-ciclina de fase S y dirigen a la célula hacia la fase S. La formación de algunos complejos Cdk-ciclina dependen de factores de crecimiento extracelulares que, por tanto, estimulan a la célula a progresar en el ciclo celular.

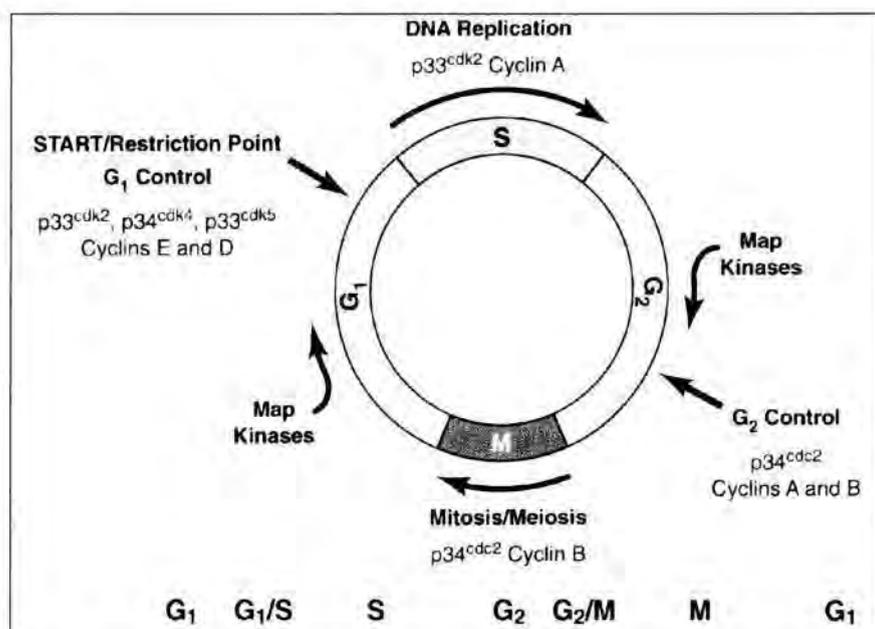


Figura I.7.: Regulación del ciclo celular mediante los complejos ciclina-Cdk. Esquema general del ciclo celular y sus puntos de control. (Tomado de Murakami y col., 1995).

La decisión más drástica que puede tomar el sistema de control del ciclo celular es que la célula deje de dividirse por completo, y entre en un estado modificado de G₁, denominado G₀ o de quiescencia, en el que el sistema de control del ciclo es parcialmente desmantelado y desaparecen la mayoría de Cdks y ciclinas.

Parece ser una regla general que las células de mamíferos sólo se multiplican si reciben señales específicas y positivas de su entorno. Si se las priva de estas señales, el ciclo celular se para en el punto de control de G₁ y entra en la fase G₀, pudiendo permanecer en ésta durante mucho tiempo hasta volver a dividirse. Una vez superado este punto de control de G₁, la célula continúa rápidamente con el ciclo.

Una de las principales funciones de los factores de crecimiento es, pues, inducir a la célula en estado de reposo (G₀) a entrar en el ciclo y proceder a la división celular. Son, pues, mitogénicos. Esta inducción tiene lugar en 2 etapas (Aaronson, 1991, Figura I.8.):

1. El paso de la fase G₀ a G₁ es inducido por factores de crecimiento denominados de competencia como son el EGF, el PDGF y el FGF.
2. El paso de la fase G₁ a S (replicación del DNA) depende de la presencia de factores de crecimiento denominados de progresión, como la insulina y la IGF-1, y puede ser bloqueado por factores inhibidores como el TGF-β, el interferón y el TNF.

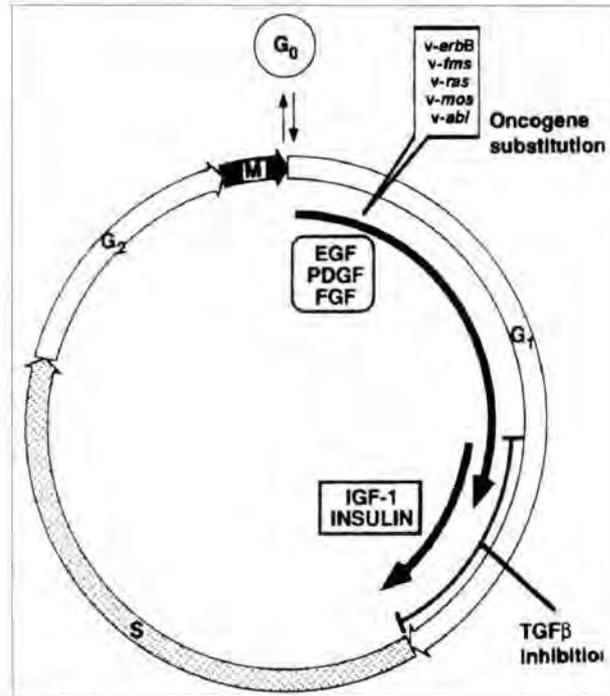


Figura 1.8.: Factores de crecimiento necesarios durante el ciclo celular (Tomado de Aaronson, 1991).

I.B. BREVE INTRODUCCIÓN AL CÁNCER

I.B.1. LA GÉNESIS DEL CÁNCER: LA TRANSFORMACIÓN CELULAR MALIGNA.

El proceso de desarrollo y mantenimiento de un tejido es, esencialmente, de tipo jerárquico. Buenos ejemplos son la renovación de la piel, intestino, el sistema hematopoyético, y cicatrización de heridas (incluida la angiogénesis). En estos casos, un número limitado de células "madre pluripotenciales" (stem cells) se activan y dan lugar a una gran población de nuevas células progenitoras con un programa proliferativo más restringido (Figura 1.9.). Estas nuevas células progenitoras pueden proliferar nuevamente dando lugar a las células funcionalmente maduras, necesarias para reemplazar las pérdidas durante los procesos naturales antes descritos. Las células madre pluripotenciales son capaces de autorrenovarse para sustituir a las que han quedado "comprometidas" en una posterior diferenciación. Durante este proceso de desarrollo, desde un estado poco diferenciado a uno más diferenciado, resulta esencial mantener en todo momento un estricto control y equilibrio entre los distintos tipos celulares producidos y la cantidad de células de cada tipo. Si la célula madre pluripotencial se decanta más por un proceso diferenciativo que por su autorrenovación, la reserva o fuente de células madre disminuiría, con el consiguiente peligro que ello significa. Por contra, si demasiadas células madre se ven más empujadas a su autorrenovación que a diferenciarse, no

se podrá renovar o mantener la integridad del tejido y este iniciará un rápido proceso de regresión.

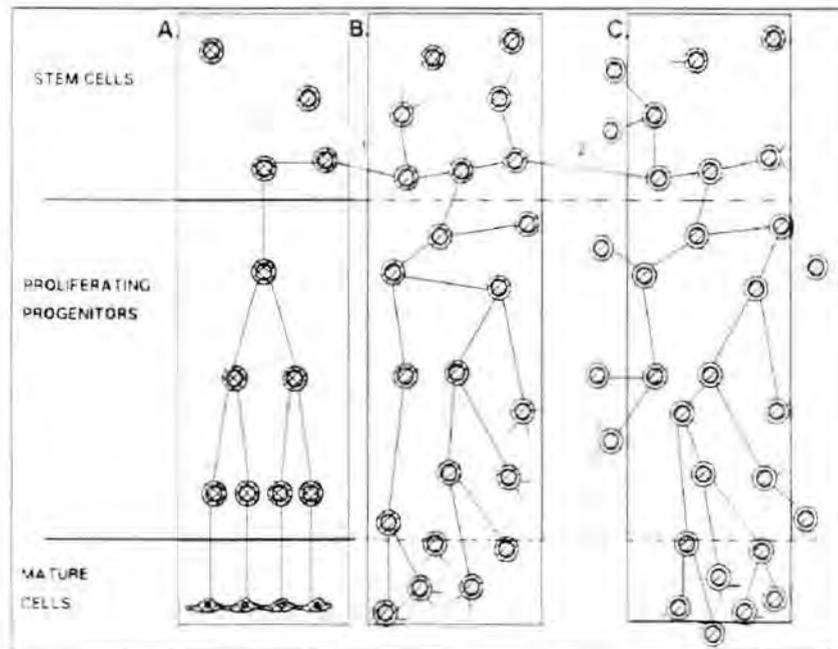


Figura 1.9.: Esquema de los tres estados celulares proliferativos del estado adulto: regeneración, transformación (tumores benignos), y tumores malignos. (Tomado de Cross y Dexter, 1991).

La estricta coordinación entre los procesos de proliferación y diferenciación celular resulta pues esencial para el desarrollo y recuperación de los tejidos. Ambos procesos están influidos por variables como parámetros físicos (espacio y tiempo), componentes de la matriz extracelular, moléculas de adhesión celular, complejos de unión intercelulares y factores solubles como los anteriormente descritos factores de crecimiento polipeptídicos. Los factores de crecimiento, y en especial combinaciones de los mismos, pueden influir en la duración del proceso de diferenciación y determinar el tamaño de la población celular madura que se derive de una célula madre precursora. El inicio del proceso de diferenciación parece producirse como consecuencia de una disminución de la proliferación previa, que puede ser un reflejo del agotamiento de factores de crecimiento disponibles localmente. Este sería un posible mecanismo para evitar que las células ya maduras siguieran proliferando. Otro posible mecanismo es la producción, por parte de células ya diferenciadas, de factores que inhiban posteriores proliferaciones.

Si la coordinación entre diferenciación y proliferación falla, y se produce un desacoplamiento, aparece una célula con fenotipo transformado, paso previo a la aparición de una célula tumoral.

La estrecha interrelación entre proliferación, diferenciación y los factores de crecimiento también se aprecia en el hecho de que si se elimina un factor de crecimiento a una célula

dependiente de él, no siempre se produce una interrupción de su crecimiento, sino que en determinados casos se activa la apoptosis. La apoptosis representa un mecanismo esencial para el control del desarrollo embrionario y proliferativo, al eliminar células con capacidad proliferativa sobrantes o incontroladas, o con capacidad de generar respuestas autoinmunes (en la hematopoyesis).

Factores de crecimiento y cáncer

Una de las pruebas más evidentes del papel que realizan los factores de crecimiento en los procesos de proliferación y diferenciación ha venido del estudio de los productos de los oncogenes. Varios de estos productos son receptores de factores de crecimiento, como ya se ha comentado. En una célula normal su expresión está controlada, así como la activación que provocan tras su interacción con su ligando, pues normalmente son internalizados y destruidos. Si el oncogén codifica un receptor anormal, que esté constitutivamente activado, independientemente de su unión al ligando, se produce una sobreestimulación de los procesos celulares, que suele conducir a una poderosa señal de transformación maligna.

La transformación neoplásica se inicia, como ya se ha mencionado, por la descoordinación entre los procesos de división y diferenciación; de forma que la célula transformada conserva su capacidad proliferativa de forma permanente, lo que permite su crecimiento ilimitado. A partir de este momento, los factores de crecimiento pueden contribuir de distintas maneras al mantenimiento de esta nueva característica, y a etapas subsiguientes del fenómeno tumoral. Algunos factores de crecimiento son capaces de inducir la prolongación de vasos sanguíneos cercanos (la denominada angiogénesis) hacia la fuente de dicho factor, facilitando la vascularización del tumor. Sin dicha vascularización el tumor primario, con forma esférica, sólo puede alcanzar un diámetro de unos pocos milímetros, a partir del cual comienzan a resultar limitantes la difusión de oxígeno y nutrientes o productos de desecho. La proliferación de la capa externa de la masa tumoral compensa la creciente muerte celular (la denominada necrosis) de las células del centro. Una vez la masa tumoral empieza a secretar (o induce la secreción en células cercanas) factores angiogénicos, la vascularización resultante elimina las limitaciones de la difusión, permite un rápido crecimiento de la masa tumoral y proporciona una ruta para la invasión y colonización de otros órganos, la denominada metástasis (Figura I.10.) (Liotta y col., 1991; Stracke y Liotta, 1992).

I.B.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

Hoy en día se acepta plenamente que la acumulación de alteraciones genéticas provocan la transformación celular maligna (tumorigénesis). A este componente genético habría que añadir un cierto componente epigenético, entendiéndolo como la interacción dinámica entre células y tejidos y su entorno fisiológico.

En los años 70 A.G. Knudson propuso la teoría de los "dos golpes" para explicar la aparición de los tumores. Ésta dice que es necesaria la acumulación de dos defectos o mutaciones independientes, una después de otra para la aparición de un tumor. Actualmente, se ha determinado que, normalmente, son necesarios entre 3 y 7 anomalías independientes, cada una de las cuales tiene una baja probabilidad. El número menor se ha detectado en leucemias y el mayor en carcinomas.

Las mutaciones citadas pueden aparecer de forma espontánea o debido a agentes externos, que aumentan la frecuencia de mutación, y que son básicamente tres: virus, carcinógenos químicos y radiaciones.

En general el cáncer aparece a partir de una célula que adquiere una primera mutación que la convierte en ligeramente anormal. Esta célula "ligeramente" aberrante evoluciona hacia un fenotipo más transformado, o incluso "maligno" a través de una serie de ciclos sucesivos de mutación y selección que finalmente llevan a la aparición de células que se replican sin control. La proliferación aumentada aún favorece mucho más la posibilidad de que se den nuevas mutaciones.

Los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores

Además de las ciclinas y las Cdks, hay una serie de genes celulares que también se encargan de regular el ciclo celular. Se pueden clasificar en 2 grupos: genes de proliferación, que codifican proteínas que normalmente ayudan a estimular la división celular, y genes de antiproliferación, que codifican proteínas que normalmente ayudan a aplicar los frenos moleculares que paran el ciclo en los puntos de control discutidos anteriormente.

Una mutación en un gen de proliferación que provoque que la proteína correspondiente se sobreexpresa, o sea hiperactiva, resulta en una multiplicación celular excesiva. El gen mutado es entonces clasificado como un oncogén, mientras que el gen normal se conoce como proto-oncogén. Asimismo, una mutación que inactive un gen antiproliferativo puede liberar a la célula de las restricciones normales en la multiplicación celular y resultar también en una excesiva proliferación. Los genes antiproliferativos presentes en la célula normal se conocen como genes supresores de tumores (anteriormente conocidos como anti-oncogenes).

En una célula diploide normal hay 2 copias de cada gen supresor de tumor. Sólo si ambas copias del gen se pierden, o inactivan, aparece la pérdida del control de la proliferación, pues una sola copia es normalmente suficiente para la regulación normal del ciclo celular. Por contra, sólo una copia de un proto-oncogén necesita ser mutada a oncogén para producir el mismo efecto, los oncogenes son pues dominantes.

Los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores codifican proteínas muy diversas. Los proto-oncogenes codifican, por ejemplo, proteínas implicadas en la respuesta celular a los factores de crecimiento, como los propios factores de crecimiento polipeptídicos, receptores de estos factores, transductores de las respuestas provocada por ellos o factores de transcripción que actúan de mediadores en la expresión génica inducida por factores de crecimiento. Los oncogenes aparecen cuando una mutación en un proto-oncogén provoca que la proteína correspondiente tenga una actividad anormal. La proteína puede ser anormalmente activa por diferentes motivos:

1. Que sea producida por células que normalmente no la producen.
2. Que se fabrique en cantidades excesivas.
3. Que dé lugar a una proteína con actividad incontrolada.

Los oncogenes, pueden favorecer la aparición de un tumor al estimular a las células a dividirse incluso en ausencia de las señales extracelulares apropiadas o al permitir a las células sobrevivir en ausencia de señales de supervivencia adecuadas.

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que se expresan en la célula normal y que regulan la proliferación celular, la reparación del DNA o la angiogénesis y evitan que se convierta en una célula invasiva y metastásica. Los genes supresores de tumores se agrupan en dos grandes clases (Zhang y col., 1998). Los genes de clase-I están mutados o delecionados en los tumores. Los de clase -II no están mutados ni delecionados, sino que están alterados sus niveles de expresión.

Uno de los genes supresores de tumores de clase-I más conocido es el gen del retinoblastoma (RB-1). Su producto actúa como uno de los principales bloqueadores en la progresión del ciclo celular. Esta acción bloqueadora está regulada por fosforilación de la proteína del retinoblastoma. La proteína no fosforilada se une fuertemente a ciertas proteínas reguladoras de genes, que promueven la replicación del DNA, y de esta manera evita que actúen en el núcleo. Por ello, la pérdida de este gen deja a la célula libre para replicar su DNA, y proliferar sin control (Weinberg, 1990 y 1991; Hollingsworth y col., 1993).

Otro de los genes supresores de tumores de clase-I más conocido es el gen de la TP53, que codifica para una proteína, la p53, que es un factor de transcripción. Esta proteína realiza su efecto, bien induciendo la transcripción de otro gen regulador, cuyo producto es una proteína de 21 kda que se une a los complejos de ciclina G₁-Cdk4, bien por una vía independiente de la p21 cuando el huso mitótico está dañado o los centrómeros no se han duplicado correctamente. La proteína p21, al bloquear la actividad quinasa de los complejos ciclina-Cdk4, impide que la célula pase a la fase S y replique su DNA. Esta acción de la p53, dependiente de p21, se ha comprobado que sólo se dispara en ciertas circunstancias. Así, se

ha visto que las células normales aumentan la concentración de la proteína p53 cuando se las expone a radiaciones ionizantes o drogas quimioterapéuticas, o se las priva de nucleótidos. En estas situaciones, las células a las que se les ha anulado la p53 entran en división, precipitándose a replicar el DNA sin previamente reparar las lesiones que ya ha podido sufrir. Así pues, la función normal de la p53 parece ser permitir a las células duplicarse sólo cuando no existen daños en el DNA, por lo que es un elemento clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La p53 no sólo produce parada celular, también induce apoptosis. Estas dos respuestas se pueden dar en un mismo tipo celular en respuesta al mismo estímulo, sin conocerse todavía el mecanismo de esta respuesta tan divergente (Deng y col., 1995; Bates y Vousden, 1996; Agarwal y col., 1998).

I.B.3. LA INVASIVIDAD TUMORAL Y METÁSTASIS. PAPEL DE LAS PROTEASAS EN EL PROCESO NEOPLÁSICO.

A pesar de presentar muchas características diferenciales, todos los tumores malignos tienen en común su capacidad de diseminación, y formación de tumores secundarios o metástasis, que constituye una de las características más perniciosas del proceso tumoral. Los avances en la comprensión de estos fenómenos se han visto entorpecidos por la tremenda complejidad de los procesos involucrados y hasta hace pocos años no se han empezado a abordar de una manera sistemática. Así, se ha podido establecer que la invasión y la metástasis tienen lugar a través de una serie secuencial de etapas bien coordinadas y definidas, que incluyen múltiples interacciones entre las células tumorales y las normales (Figura I.10.). Células con capacidad invasiva del tumor primario invaden el tejido circundante y, gracias normalmente a la angiogénesis, alcanzan el sistema circulatorio, que las transporta. Las células que sobrevivan a las múltiples posibles agresiones, tanto específicas como inespecíficas, podrán adherirse a un vaso distante, penetrar en el nuevo tejido por extravasación, adherirse al nuevo órgano y proliferar de nuevo formando tumores secundarios. Todo el proceso podrá, a partir de este punto, reiniciarse de nuevo. En cada etapa las células tumorales deben intentar escapar a la vigilancia del sistema inmunitario. Aún así, muchas más de las que se pensaba en un principio consiguen sobrevivir en el torrente circulatorio (Tada y col., 1993). Los hechos expuestos permiten ver a ambos procesos (invasividad y metástasis) como altamente selectivos, y sólo una determinada subpoblación celular de la heterogénea masa tumoral inicial podrá llevarlos a cabo. (Liotta y col., 1991).

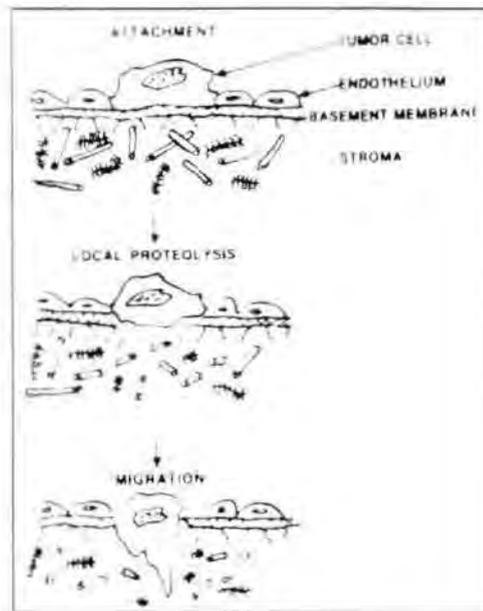


Figura 1.10.: Etapas de la invasión (Tomado de Strake y Liotta, 1992)

El término invasividad describe, según Mignatti & Rifkin (1993), la capacidad de las células para atravesar barreras anatómicas, como la matriz extracelular que separa los distintos tejidos. Este proceso de invasión tiene lugar en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos durante la cicatrización de heridas y procesos inflamatorios. También tiene lugar en condiciones patológicas tales como la artritis reumatoide y el desarrollo tumoral. Este último caso de hecho define una característica propia del comportamiento neoplásico. La célula metastásica, desobedeciendo el orden social preestablecido entre distintos tejidos, atraviesa las barreras que los separan, mezclándose con otros tipos celulares, lo que no ocurre en los demás tipos de invasión (cicatrización, etc).

El proceso invasivo requiere de la expresión de proteínas que permitan, por un lado, la adhesión de la célula invasora a las células y la matriz extracelular del órgano a invadir, y por otro, la proteólisis de dicha matriz para avanzar y formar nuevas colonias en el tejido invadido (nueva adhesión). Así pues, los procesos de invasión y metástasis requieren de la pérdida del control de la proliferación y una regulación "anormal" de los procesos de motilidad y proteólisis.

La emigración de una célula tumoral está regulada por factores autocrinos (tipo citoquinas, secretadas por la propia célula tumoral), por el denominado "scatter factor" (o factor de dispersión, que es idéntico al HGF), producido por las células del tejido invadido, y por factores de crecimiento (como el PDGF, FGF, EGF, IGF-1, IL-6 y TGF- β) y componentes de la matriz extracelular.

Para poder abrirse paso a través de la matriz extracelular la célula tumoral secreta enzimas degradativos (proteolíticos y glucolíticos) y/o induce a las células del tejido invadido a secretarlos. Diferentes estudios han establecido una relación positiva entre la expresión de proteasas y la agresividad o malignidad de los tumores. Una elevada invasividad va asociada a una mayor secreción de proteasas (Kleiner y col., 1993). De hecho, se ha descrito una interrelación entre la adhesión de la célula tumoral a un nuevo tejido y la producción concomitante de proteasas. Las proteasas también permiten la liberación de factores de crecimiento almacenados en la matriz extracelular (como el FGF- β i el TGF- β), e incluso su activación por proteólisis específica. Los factores de crecimiento liberados y/o activados funcionarían de manera paracrina sobre la célula tumoral, induciendo la proliferación (estimulación mitogénica), la invasión, la adherencia, etc. Esta localización específica de ciertos factores de crecimiento y su acción paracrina sobre determinadas células tumorales podría ser el elemento específico y crítico que permitiera el establecimiento de colonias secundarias metastásicas. Además, se ha visto que factores de crecimiento como el EGF, TGF α y PDGF activan la expresión de ciertas proteasas en células tumorales.

Las proteasas y el proceso invasivo

Las proteasas están involucradas en prácticamente todos los aspectos de la vida y, por esta razón, se encuentran presentes en todos los tejidos animales y vegetales y en microorganismos. Se clasifican en cuatro grandes familias de acuerdo con el residuo, o átomo metálico, del centro activo involucrado en la catálisis. Estas cuatro familias son serina, cisteína, metalo y aspartil proteasas. En el procesamiento de la matriz extracelular parecen intervenir proteasas de las cuatro clases.

Tabla L2. Principales proteasas de la superficie celular.

Metaloproteasas de la Matriz (Matricinas)	
- Colagenasas: Intersticial (tipo I o MMP-1)	
	Colagenasa -3 (MMP-13)
	de neutrófilos (PMN o MMP-8)
- Colagenasas de tipo IV: 72Kd (gelatinasa A o MMP-2)	
	92Kd (gelatinasa B o MMP-9)
- Stromelisin (MMP-3)	
- Stromelisin-2 (MMP-10)	
- Stromelisin-3 (MMP-11)	
- Metaloelastasa (MMP-12)	
- PUMP-1 (MMP-7) o metaloproteasa de útero, o Matrilicina	
- Metaloproteasas de membranas: MT-MMP-1 o MMP-14	
	MT-MMP-2
	MT-MMP-3
	MT-MMP-4

Serin proteasas

- activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)
- activador del plasminógeno tipo tisular
- plasminógeno
- elastasa
- trombina

Cistein proteasas

- Catepsinas: B, H, L, C, J, K.

Proteasas integrales de membrana

- CD10 o CALLA (acute lymphoblastic leukemia antigen)
- Meprinas

Datos basados en el trabajo de Chen (1992), Basbaum y Werb (1996), Evans y col. (1997) y ampliada por el grupo.

Por lo que se refiere a los inhibidores de proteasas (Tabla I.3.) estos también se encuentran presentes de manera ubicua. Así, por ejemplo, la sangre de vertebrados superiores contiene unos 200 mg de inhibidores de proteasas por cada 100 mL de suero. Las semillas y los tubérculos contienen del 1 al 10% de inhibidores respecto al contenido proteico total, llegando a alcanzar el 50% en algunos frutos.

Tabla I.3: Principales inhibidores de proteasas.

1- Naturales proteicos
a. de serina-proteasas o serpinas (serpins)
b. de cisteina-proteasas: cistatinas y estefinas (cystatins, stefins)
c. de metaloproteasas: - específicos TIMP's (tissue inhibitor of metaloprote tipos 1, 2, 3 y 4. - menos específicos: α -2 macroglobulina - de bajo peso molecular
d. de aspartil-proteasas
2- No-proteicos y de bajo peso molecular (en microorganismos)
3- Sintéticos

Hoy en día se acepta que los inhibidores de proteasas, presentes en el organismo humano, forman parte de sus mecanismos intrínsecos de defensa contra la transformación celular y el cáncer y, por tanto, participan en los mecanismos que evitan o corrigen la descoordinación entre proliferación y diferenciación. Parecen ejercer sus efectos a diferentes niveles:

- bloqueando la transformación de células normales a tumorales.
- inhibiendo la invasividad y metástasis, al inhibir las proteasas implicadas en estos procesos (Umezawa, 1996).
- inhibiendo la angiogénesis (Jonhson y col., 1994).
- participando en el procesamiento de factores de crecimiento que se pueden encontrar, unidos a membrana, en forma soluble, o ligados a la matriz extracelular donde se almacenan.

Los inhibidores de proteasas son más que simples inhibidores de la invasión y metástasis, y tienen un gran efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral y la angiogénesis, parece ser gracias a un efecto citostático en el tumor primario y en el establecimiento de metástasis (DeClerck y Imren, 1994).

Ya se han iniciado pruebas clínicas con inhibidores de proteasas (Greenwald, 1994; Macualay y col., 1995; Anderson et al, 1996; Evans y col., 1996; Parsons y col., 1996; Bramhall, 1997). Pero, como la terapia anticáncer con agentes citostáticos requiere la administración crónica para alcanzar un efecto antitumoral significativo, se plantea el problema de su posible toxicidad en los tejidos normales, dado el papel que tienen las proteasas en muchos procesos fisiológicos. Son necesarios, pues, avances en la administración específica de estos inhibidores y manipulación genética de la expresión de los mismos para conseguir un suministro más selectivo en los tejidos tumorales y evitar así efectos a largo

plazo, no deseados, para la posible utilización futura de los inhibidores de proteasas en terapia contra el cáncer.

I.C. CARCINOMAS

Los cánceres con más incidencia social son los carcinomas, tumores de origen epitelial, responsables de la mayor parte de la mortalidad por cáncer en las sociedades occidentales. Además, son los que presentan un peor pronóstico pues originan focos metastásicos con facilidad. Los carcinomas con más incidencia son los de pulmón, mama, próstata y colorrectal, respectivamente (Tabla I.4). El de páncreas destaca por presentar, seguramente, el peor pronóstico (Parker et al, 1996), y será objeto de un apartado especial.

Tabla I.4. Mortalidad debida a cáncer. Distribución en tanto por ciento respecto al total.

	Cataluña *	España *	Estados Unidos*
Pulmón	26 % (H)	28 % (H)	32 % (H)
Mama	19 % (M)	22 % (M)	17 % (M)
Próstata	8,5 % (H)	12 % (H)	14 % (H)
Colorrectal	10 % (H)	9% (H)	10 % (T)
Páncreas	4 % (T)	4 % (T)	5 % (T)

* Los valores indicados corresponden a estadísticas efectuadas el año 1992 en Cataluña, 1993 en España y 1996 en Estados Unidos de Norteamérica (H: hombres; M: mujeres; T: ambos sexos).

I.C.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Como se ha dicho anteriormente, los carcinomas son tumores de origen epitelial, por lo que todos los tejidos que derivan del mesodermo, ectodermo o endodermo pueden dar lugar a carcinomas. Para identificar un carcinoma, en primer lugar hay que precisar el tipo de epitelio de origen. Por ejemplo, un carcinoma epidermoide deriva de células escamosas de cualquiera de los epitelios escamosos estratificados, y un adenocarcinoma es un tumor en el cual las células epiteliales neoplásicas se desarrollan en un cuadro glandular. Después debe identificarse el tejido u órgano de origen (por ejemplo: adenocarcinoma pancreático) y por último se suele especificar si el crecimiento es similar al embrionario o indiferenciado o, por contra, si está más o menos diferenciado, como el tejido del que procede.

En las neoplasias epiteliales son comunes las alteraciones en vías de transducción de la señal de los factores de crecimiento. Dichas alteraciones pueden ser muy importantes en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo neoplásico (Zumkeller y Schofield, 1995). El EGF, el TGF- α y su receptor, el EGF-R, parecen realizar un papel particularmente importante en los carcinomas (Lee y col. 1992). Así, parecen estar implicados en procesos como el crecimiento

tumoral, la vascularización, la invasividad y la metástasis. Muchos carcinomas sobreexpresan el EGF-R, como los cánceres de pulmón, mama, cerebro, páncreas, esófago, cabeza y cuello y los de la vejiga (Rusch y col., 1996). La sobreexpresión de ligandos para el EGF-R, particularmente el TGF- α , también se detecta frecuentemente. Las mutaciones en el EGF-R son raras, mientras que la amplificación del DNA del loci del EGF-R es más común, y la sobreexpresión normalmente resulta de la sobreexpresión de su mRNA. Esta sobreexpresión se ha utilizado como un indicador de mal pronóstico, pues se asocia con la reaparición del tumor, presencia de metástasis y supervivencia reducida (Davies y Chamberlin, 1996).

A su vez, otro miembro de la familia de los erbBs, el erbB-2, está alterado por amplificación del gen y/o sobreexpresión en una amplia gama de carcinomas humanos, aunque no se han detectado mutaciones en la región estructural del mismo en dichos tumores. El erbB-2 se ha implicado en la progresión sobre todo de los carcinomas de mama, y se ha intentado utilizar como factor pronóstico con resultados muy divergentes (Hynes y Stern, 1994), aunque resultados recientes parecen decantarse por su utilidad (Tan y col., 1997).

El erbB-3, otro miembro de la familia de los erbBs, también se sobreexpresa en tumores de tipo epitelial, entre los que se incluyen los tumores pancreáticos, gástricos, de colon, de cérvix, de próstata, de ovario, de cuello y cabeza, de vejiga, de pulmón y de endometrio (Gullick, 1996).

La gran mayoría de carcinomas cursan, además, con mutaciones en genes supresores de tumores (Knudson, 1993). Por ejemplo la presencia de una p53 mutada se ha descrito en la mayoría de carcinomas, así como mutaciones en el loci del gen RB1. En la mayoría de carcinomas se detectan mutaciones en múltiples locus. Así, otros dos genes supresores de tumores que se encuentran frecuentemente mutados en carcinomas son el APC (poliposis adenomatosa colónica) y BRCA.

I.C.1.a. El EGF y el EGF-R como dianas terapéuticas en el tratamiento de carcinomas

La frecuente sobreexpresión de los miembros de la familia de los erbBs en tumores humanos y su aparente papel en la tumorigénesis los convierte en posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de los carcinomas. Las células tumorales parecen haber perdido la redundancia normal en las vías de transducción de la señal y por esta razón son preferentemente vulnerables a interceptores de la señal.

En el caso del EGF-R, se han desarrollado dos estrategias principales para su posible uso como diana terapéutica:

- La utilización de agentes citotóxicos dirigidos contra los EGF-R presentes en las células tumorales.
- La modulación de las respuestas producidas por el EGF-R.

Aunque ambas tienen sus ventajas y desventajas, las dos comparten el inconveniente de que el EGF-R expresado por la mayoría de células tumorales es la forma normal no mutada. Además, la capacidad de los EGF-Rs del hígado de eliminar elevadas cantidades de EGF de la circulación representa un problema potencial para cualquier terapia antiEGF-R. Este problema implica la necesidad de moléculas terapéuticas de bajo peso molecular, que puedan escapar rápidamente de la sangre, para minimizar la eliminación por parte del hígado. Además, las moléculas pequeñas penetran mejor en los tumores sólidos, un problema importante en la mayoría de terapias anticancerosas (Davies y Chamberlin, 1996).

Las terapias basadas en la utilización de agentes citotóxicos dirigidos contra los EGF-R presentes en las células tumorales se pueden dividir en:

- Utilización de factores de crecimiento conjugados con toxinas:

El EGF y el TGF- α se han unido a toxinas de plantas o bacterias para dirigir dichas moléculas contra tipos celulares determinados (Vollmar y col., 1987; Ozawa y col., 1989; Kirk et al, 1994). Se ha observado que inhiben el crecimiento de células que expresan elevados niveles de EGF-R, pero no el de células carentes de dicho receptor. En animales experimentales, que desarrollan tumores, estas toxinas también han dado resultados prometedores, aunque los primeros estudios muestran evidencias claras de toxicidad en el hígado (Pai y col., 1991).

- Utilización de anticuerpos contra el EGF-R:

Varios anticuerpos monoclonales de ratón contra dicho receptor se han ensayado *in vitro* y en tumores injertados en ratones atímicos (Modjtahedi y col., 1993). Se ha observado una inhibición parcial del crecimiento tumoral y un aumento de la supervivencia de los animales. Algunos de estos anticuerpos se han administrado satisfactoriamente en grandes dosis en ensayos clínicos en humanos (Divgi et al, 1991; Perez Soler y col., 1994; Schmiegel y col., 1997), pero ha aparecido el problema de la producción de anticuerpos contra los anticuerpos de ratón, lo que se conoce como respuesta HAMA, que limita su posible uso terapéutico. Para evitar este problema se han producido anticuerpos quiméricos humanizados. En todos los casos se ha observado que dichos anticuerpos deben suministrarse conjuntamente con otras terapias para conseguir una respuesta clínicamente significativa.

La administración combinada de anticuerpos anti-EGF-R y quimioterapia ha resultado efectiva tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (Fan y col.,

1993; Baselga y col., 1994). La efectividad de esta terapia combinada podría estar ligada a la posible relación del EGF-R con la resistencia a drogas, debido a que parece que dicho receptor estimula la expresión de la glucoproteína-P (que forma canales de membrana responsables de la salida de drogas citotóxicas de la célula). Al bloquear el EGF-R con anticuerpos se evita que el tumor se vuelva resistente a los agentes quimioterapéuticos, ya que las células no los pueden expulsar. Finalmente, en los últimos años, se han desarrollado anticuerpos biespecíficos que reconocen al EGF-R y la droga citotóxica doxorubicina y, consecuentemente (Morelli y col., 1994).

Las terapias basadas en la modulación de la función del EGF-R se pueden dividir en dos grandes tipos:

- Las que bloquean la activación del receptor: mediante antagonistas del ligando o inhibidores de la dimerización. Estas moléculas acostumbran a tener un efecto citostático más que citotóxico, lo que ayuda a estabilizar el tumor, dado que su crecimiento se enlentece y se limitan las posibilidades de diseminación. Su uso, en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales, retrasa la reaparición del tumor. Por otro lado, al bloquear la activación del EGF-R, se inhibe su efecto estimulador de la resistencia a drogas, lo que podría mejorar la probabilidad de supervivencia en pacientes que se ven sometidos a repetidos ciclos de quimioterapia.

Antagonistas de los ligandos:

Estas moléculas ofrecían una alternativa atractiva para inhibir la activación del EGF-R porque bloquearían la señal en su origen, limitando también la transmodulación de la misma. Además, el hecho de que no necesitasen atravesar la membrana y entrar en la célula para ejercer su efecto haría que no fuesen susceptibles a los mecanismos de resistencia a drogas. Pero, hasta la fecha, no se han obtenido antagonistas de ninguno de los ligandos del EGF-R, pese a que se han modificado por mutagénesis dirigida casi todos los residuos del EGF. La pérdida de actividad biológica siempre ha ido acompañada de la pérdida de capacidad de unión al receptor. Por otro lado, se han intentado obtener fragmentos del EGF o del TGF- α que retuvieran su capacidad de unión al receptor, pero los resultados no han sido satisfactorios (Nelson y col., 1991; Groenen y col., 1994; Campion y Niyogi, 1994; Chamberlin y col., 1995).

- Las que evitan la transducción de la señal: como inhibidores de tirosina quinasas, de los dominios SH₂ y de la proteína quinasa C.

Los inhibidores de tirosina quinasas:

Estos inhibidores bloquean la transducción de la señal en el punto intracelular inicial. La gran mayoría de inhibidores de tirosina quinasas compiten por el lugar de unión a ATP del enzima (que es común a varios receptores), pero aún así se han desarrollado inhibidores específicos para el EGF-R. Los más destacados son la 4,5-dianilinoptalmida (DHAPI) y la quinazolina PD 153035, que presentan una potente actividad antitumoral *in vivo* (Fry y col., 1994; Levitzki, 1996). Se ha observado que inhiben los efectos mediados por el EGF, la expresión de genes como c-jun, la transformación celular y la mitogénesis. Sin embargo, también tienen importantes efectos tóxicos.

I.C.2. EL CÁNCER DE PÁNCREAS

Dado que en el presente trabajo los tipos de cáncer estudiados fueron el cáncer de páncreas y el de plexo coroideo, a continuación se procede a describir más detalladamente estos dos tipos de tumores.

I.C.2.a. Patologías neoplásicas del páncreas.

El páncreas consta de dos componentes funcionalmente independientes, el endocrino y el exocrino. Las células de los islotes de Langerhans responsables de la secreción endocrina, se hallan distribuidas por todo el tejido exocrino, y vierten sus productos directamente al torrente sanguíneo. El sistema acinar-ductal es la parte exocrina. Los acinos producen y secretan la mayoría de enzimas digestivos y los ductos drenan las secreciones al duodeno y producen un fluido rico en bicarbonato (Figura I.11.).

En humanos, los tumores de las células endocrinas son raros y generalmente presentan un crecimiento muy lento y un buen pronóstico. La mayoría de las neoplasias pancreáticas son de origen exocrino, y de ellas, el 90% se han considerado tradicionalmente de origen ductal. Paradójicamente, el componente ductal representa solamente un 11% del total de células del páncreas exocrino (Klöppel, 1993). Esta clasificación se ha basado en análisis histológicos y en la expresión de proteínas marcadoras de linaje celular. En cambio, algunos estudios han demostrado la expresión de proteínas típicamente acinares en tumores pancreáticos y líneas celulares de cáncer de páncreas (Kim y col., 1990; Koivunen y col., 1991; Miszczuk-Jamska, y col., 1991; Fernández 1994, Fernández y col., 1994; Frazier y Fernández, 1994). Este hecho, unido al fenómeno de la metaplasia (la transformación de células ductales en acinares o viceversa que se da durante la organogénesis pancreática y en una gran variedad de circunstancias patológicas, en cultivo de células acinares, o en ciertos modelos animales de cáncer de páncreas (Githens, 1988; Sandgren y col., 1990; Jhappan y col., 1990; Scarpelli y

col., 1991; Hall y Lemoine, 1992) ponen en duda un único origen ductal para los adenocarcinomas pancreáticos.

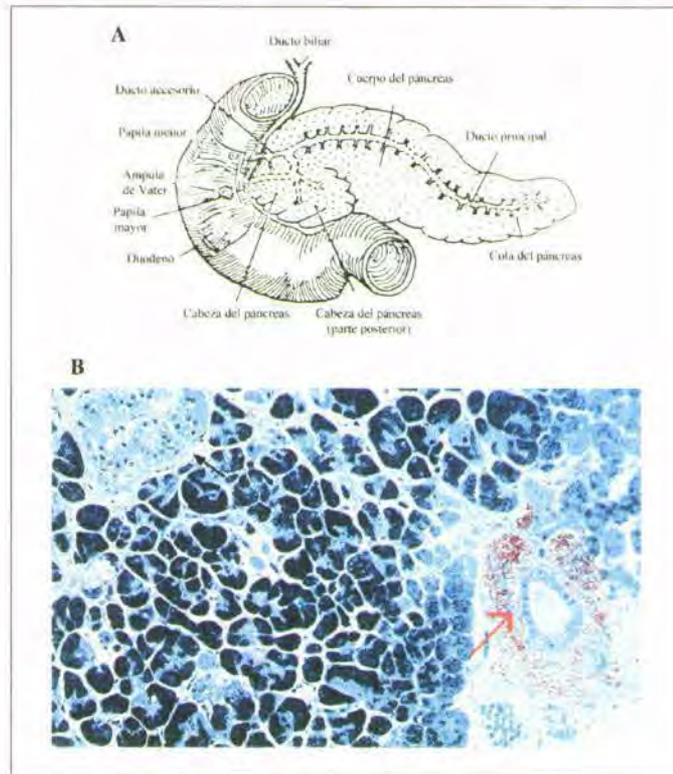


Figura 1.11.: El páncreas. A) Estructura macroscópica B) Estructura microscópica: los lóbulos y acinos pancreáticos, los islotes de Langerhans (flecha negra), y los ductos (flecha roja); tinción de azul de metileno y fusina básica, x 220.

Dada la predominancia de los adenocarcinomas se identifica genéricamente al cáncer de páncreas como adenocarcinoma pancreático, y a él nos referiremos en el capítulo siguiente.

I.C.2.b. Adenocarcinomas del páncreas exocrino

I.C.2.b.1. Epidemiología y etiología del cáncer de páncreas exocrino

El cáncer de páncreas exocrino es uno de los tumores que presenta peor pronóstico y mayores dificultades diagnósticas. La mortalidad por cáncer de páncreas ha aumentado en los últimos treinta años en los países industrializados. Actualmente ocupa entre el cuarto y quinto lugar entre las causas de mortalidad debidas a procesos cancerosos, y es la segunda entre las neoplasias gastrointestinales detrás del cáncer de colon. En general, su incidencia es mayor en los países desarrollados. Así, en los Estados Unidos entre 9 y 10 de cada 100.000 personas mueren al año debido al cáncer de páncreas (Parker y col., 1997), y su incidencia ha aumentado un 24% en los últimos 35 años (Cancer Facts & Figures, 1990).

En Europa se observa una mayor mortalidad por cáncer de páncreas en los países nórdicos y centroeuropeos, con tasas de más de 8 por cada 100.000 habitantes, mientras que los países mediterráneos presentan tasas menores, de 6 por cada 100.000 habitantes (Czernichow y col., 1985). La incidencia es menor en mujeres que en hombres en todos los países europeos.

En España, la mortalidad por cáncer de páncreas también ha aumentado en los últimos años. En 1979 las tasas se situaban en 4,2 por 100.000 habitantes para los hombres y 2,2 para las mujeres (Czernichow y col., 1985). Un estudio realizado por Cortés y col. (1992) muestra un aumento de las tasas de mortalidad estandarizadas desde el 0,5 en 1950 hasta el 3,3 en 1980 (hombres y mujeres en un solo grupo). Estudios recientes sitúan a España como último país europeo respecto al nivel de mortalidad por cáncer de páncreas.

A pesar de los considerables avances realizados en oncología, el cáncer de páncreas exocrino sigue teniendo un pronóstico muy malo. El tiempo medio de supervivencia es de 3-6 meses tras el diagnóstico. El nivel de supervivencia al año es del 8%, siendo un 1% o inferior el correspondiente a 5 años (el peor nivel de supervivencia a los 5 años de entre todos los tipos de cáncer). Las tasas de morbilidad y mortalidad son prácticamente coincidentes debido principalmente al inicio asintomático de la enfermedad y al diagnóstico tardío en la mayoría de los casos. Los pacientes acostumbra a presentar metástasis en el momento del diagnóstico. Un 90% tiene metástasis en los nódulos linfáticos y un 80% metástasis hepáticas (Gordis & Gold, 1993). Las principales esperanzas de mejorar este mal pronóstico se centran en el diagnóstico precoz, y en el desarrollo de nuevas terapias y medidas de prevención efectivas.

Para poder prevenir el cáncer de páncreas es necesario identificar los factores causantes de la enfermedad y los que impliquen un riesgo elevado. Por ello, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos para determinar dichos factores (Gold, 1995). Entre los factores ambientales asociados al tipo de vida de los individuos, hay que destacar el consumo de tabaco. Varios estudios han asociado el hábito de fumar cigarrillos con un aumento en un factor de 2 del riesgo de contraer cáncer de páncreas (Gordis y Gold, 1993). Los datos de estudios en modelos animales sugieren que las nitrosaminas presentes en el humo del tabaco son carcinógenas para el páncreas (Hoffman et al, 1976). De todos modos, la asociación es mucho menor que la encontrada para cáncer de pulmón y otros cánceres relacionados con el tabaco (Gold, 1995).

En cuanto a los hábitos alimenticios, aunque los datos respecto al consumo de alcohol y café parecen confusos, la mayoría de estudios desestiman una asociación entre el consumo de alcohol o café y el cáncer de páncreas (Gold, 1995). El cáncer de páncreas se ha relacionado con una dieta rica en carne y grasas, es decir, altamente calórica. En cambio, el consumo de

té, frutas y verduras frescas parece mostrar un efecto protector frente a la enfermedad (Gold, 1995).

Muchos de los estudios epidemiológicos se han orientado a la búsqueda de una relación entre la exposición ocupacional a mutágenos y el desarrollo del cáncer de páncreas. Por ejemplo, Pietri y Clavel (1991) utilizando tanto estudios de cohorte como caso-control, concluyeron que existe una relación entre trabajadores de industrias químicas, petroleras y metalúrgicas (especialmente del aluminio) o de profesiones que implican contacto directo con tintes, colorantes o disolventes y el desarrollo del cáncer de páncreas. Sin embargo, el efecto no se ha podido asignar a un factor químico o físico concreto.

Finalmente, respecto al posible papel de diferentes patologías pancreáticas o factores genéticos en la etiología del cáncer de páncreas, algunos estudios han detectado la existencia de familias con alto riesgo de contraer cáncer de páncreas, pero la escasa aparición de dicha asociación dificulta su estudio (Gordis y Gold, 1993). La diabetes también parece estar asociada con el cáncer de páncreas, aunque los resultados obtenidos son inconsistentes (Gold, 1995). La relación entre pancreatitis y cáncer de páncreas es también poco clara. Algunos estudios sugieren una relación entre ambas patologías (Lowenfels y col., 1993), mientras que otros indican que algunas formas de pancreatitis predisponen o son síntomas tempranos del cáncer de páncreas (Wynder y col., 1973; Ekblom y col., 1994).

I.C.2.b.2. Adenocarcinomas pancreáticos: características histológicas

La mayoría de los adenocarcinomas pancreáticos ductales se presentan en la cabeza del páncreas (70%), mientras que el resto se localiza en el cuerpo y la cola (Figura I.11.). La mayoría se parecen mucho en su apariencia histológica y citológica a los ductos pancreáticos normales y a las estructuras ductales biliares. Las glándulas neoplásicas están formadas por células cilíndricas o cuboidales que producen mucinas en cantidades variables. Todos los componentes epiteliales están envueltos en un denso estroma de tejido conectivo (fenómeno conocido como desmoplasia) que da gran consistencia a los tumores. En los casos de carcinomas ductales menos diferenciados el patrón histológico es más extraño, la anaplasia prominente, y la producción de mucus y la respuesta desmoplásica son algo menores (Klöppel, 1993). Los tumores de páncreas tienen en común la presencia frecuente de pancreatitis crónica obstructiva severa causada por oclusión ductal carcinomatosa (Klöppel y Fitzgerald, 1986) y desmoplasia.

Clasificación según el grado de diferenciación

Los adenocarcinomas pancreáticos se pueden clasificar según el grado de diferenciación que presentan sus células. En general, todos los adenocarcinomas pancreáticos tienen una

elevada reacción desmoplásica, como se ha comentado, independientemente de su grado de diferenciación, aunque la reacción es algo menor en los menos diferenciados. La Tabla I.5. presenta la clasificación de los diferentes grados de diferenciación de los tumores (Kern y Elsässer, 1993):

Tabla I.5.: Clasificación de los adenocarcinomas ductales según la gradación histológica.

GRADO	DIFERENCIACIÓN	PRODUCCIÓN MUCINA	ANAPLASIA NUCLEAR
I	glándulas de tipo ductal bien diferenciadas	intensiva	poco polimorfismo, disposición polar
II	glándulas de tipo ductal y tubular moderadamente diferenciadas	irregular	algún polimorfismo
III	glándulas poco diferenciadas, estructuras pleomórficas	abortada	marcado polimorfismo y aumento del tamaño nuclear

En general, las células de los adenocarcinomas pancreáticos secretan mucus y, además, grandes cantidades de material de membrana como vesículas o evaginaciones del citoplasma (Kern y col., 1984).

En la actualidad se desconoce cual podría ser el papel de la desmoplasia en el desarrollo de los tumores pancreáticos. Löhr y Traurmann (1993) proponen que los componentes de la matriz extracelular ejercen efectos estimuladores sobre las células tumorales. Además, los mismos autores indican que células tumorales pancreáticas en cultivo son capaces de expresar proteínas de la matriz extracelular (Löhr y col., 1994). La formación de tejido conectivo alrededor del tumor sucede también en el caso de las metástasis hepáticas. Gress et al (1995) y Bramhall (1997) han propuesto que en la fuerte reacción desmoplásica observada en los tumores humanos de cáncer de páncreas pueden estar implicadas las metaloproteasas, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11 y MT-MMP1, y los inhibidores de proteasas, TIMP-1 y TIMP-2, siendo el origen de los mismos tanto las células tumorales como las células del estroma.

El cáncer de páncreas es un tumor especialmente agresivo. La invasión intrapancreática aparece en la mayoría de los pacientes. En cuanto a la expansión extrapancreática es también muy frecuente. El duodeno es el órgano invadido más a menudo en los tumores de cabeza de páncreas, y los nódulos linfáticos más comúnmente afectados son el retroduodenal y el superior pancreático. En situaciones avanzadas el tumor también invade el estómago, el peritoneo y la vejiga urinaria (Cubilla & Fitzgerald, 1978). Las metástasis más comunes son, por este orden, en hígado, pulmones, adrenales, riñones, huesos, cerebro y piel.

El pronóstico de los adenocarcinomas pancreáticos depende de diversos factores: localización del tumor, tamaño, fase y grado de diferenciación (Klöppel, 1993). El pronóstico es mejor en los adenocarcinomas localizados en la cabeza del páncreas que en los del cuerpo y

cola. Recientemente, se ha asociado una localización del tumor restringida al páncreas, la presencia de nódulos linfáticos benignos, tamaños del tumor inferiores a 2,5 cm, ausencia de invasión microvascular, histología bien diferenciada y un requerimiento de transfusión sanguínea perioperatoria baja con una supervivencia mayor. Los tumores aún localizados en el páncreas, pero de tamaño mayor, y que han invadido nódulos linfáticos presentan mucho peor pronóstico (Nitecki y col., 1995).

I.C.2.b.3. Bases moleculares de los adenocarcinomas pancreáticos

Muchos estudios recientes se han encaminado a definir la naturaleza y la secuencia temporal de los cambios moleculares observados en el cáncer de páncreas exocrino humano para poder conocer su relevancia biológica, de forma que éste es actualmente uno de los tumores mejor caracterizados (Hall y Lemoine, 1993; Friess y col., 1997a; Korc, 1998).

Las neoplasias pancreáticas presentan anomalías importantes en la expresión de factores de crecimiento y sus receptores (Korc y col., 1992; Lemoine y Pignatelli, 1995). Así, se han observado niveles elevados de EGF-R y varios de sus ligandos en casi todos los adenocarcinomas pancreáticos, lo que sugiere la existencia de un bucle autocrino (Smith y col., 1987). Dicho bucle explicaría la inhibición del crecimiento de líneas celulares derivadas de carcinomas pancreáticos mediante oligonucleótidos anti-sentido que bloquean la expresión del TGF- α o el EGF-R (Hall y Lemoine, 1993). La presencia de EGF y TGF- α se ha detectado también en líneas celulares tumorales pancreáticas, así como la de otros miembros de la familia EGF: la anfíregulina (Ebert y col., 1994), la proteína de unión a heparina tipo EGF (Kobrin y col., 1994) y el cripto (Friess y col., 1994 y Tsutsumi y col., 1994). Todos estos datos parecen indicar pues que la estimulación (paracrina o autocrina) del EGF-R por sus ligandos tiene un papel relevante en la patogénesis del cáncer de páncreas (Korc y col., 1992; Yamanaka y col., 1993a). Por otro lado, se ha observado que entre el 20 y 50 % de las neoplasias pancreáticas también sobreexpresan el erbB-2 (Lei y col., 1995). Finalmente entre el 28 y el 47 % de los tumores pancreáticos sobreexpresan el erbB-3, lo que se ha asociado con un estado avanzado del tumor y una supervivencia postoperatoria significativamente reducida (Lemoine y col., 1992a; Friess et al, 1995).

Otra importante familia de factores de crecimiento es la del TGF- β y sus análogos. Friess y col. (1993a) han demostrado que muchas células de carcinomas pancreáticos *in vivo* sobreexpresan las tres isoformas del TGF β de mamíferos, y este hecho está asociado con un crecimiento del tumor más agresivo y periodos de supervivencia postoperatoria significativamente reducidos. Se ha sugerido que los TGF β s contribuyen al proceso neoplásico aumentando la proliferación de las células tumorales en los carcinomas pancreáticos humanos mediante una activación autocrina y/o paracrina del receptor de TGF β II (Fries et al, 1993a y b; Yamanaka y col., 1993b; Friess y col., 1996).

Algunos miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) también están implicados en la tumorigénesis del cáncer de páncreas. Un número importante de tumores pancreáticos sobreexpresan el FGF ácido y el FGF (Yamanaka y col., 1993c).

Las hormonas producidas por los islotes de Langerhans tienen un efecto anabólico potente en el páncreas exocrino y pueden realizar un papel importante en la tumorigénesis pancreática (Williams y Goldfine, 1986). Entre ellos se encuentran la insulina y los IGFs (factores de crecimiento tipo insulina) (Korc, 1998), así como, otros factores de crecimiento peptídicos, el inhibidor de tripsina pancreático y diversas citoquinas (Hall y Lemoine, 1993). Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado evidencias directas de su papel.

Los esteroides también son de particular interés, tanto desde el punto de vista biológico como clínico (Liebow y col., 1986). Los datos epidemiológicos sugieren un papel para las hormonas sexuales, ya que el cáncer de páncreas es más frecuente en el hombre que en la mujer (Gold, 1995).

En los adenocarcinomas pancreáticos, los miembros de la familia del oncogén *ras* se encuentran alterados con mucha frecuencia. Así, presentan una frecuencia de mutaciones de *Ki-ras* superior al 80%, que se localizan casi exclusivamente en el codón 12, e implican un pequeño número de bases (Almoguera y col., 1988; Shibata y col., 1990 a y b; Scarpa y col., 1994). Lemoine y col. (1992b) demostraron, empleando carcinomas pancreáticos primarios (*in situ*), que estas mutaciones tienen lugar en las primeras fases de la enfermedad. La especificidad de la mutación en el codón 12 podría reflejar una agresión carcinogénica común o alguna sensibilidad especial del tejido pancreático (Vogelstein y Kinzler, 1992). Estas mutaciones no se correlacionan con el estado del tumor o la supervivencia, pero pueden ser útiles en la diferenciación entre tumores pancreáticos exocrinos y endocrinos y la pancreatitis crónica (Howe y Conlon, 1997).

Por otro lado, se han descrito alteraciones de genes supresores de tumores en el carcinoma pancreático y en líneas celulares establecidas a partir de los mismos (Barton y col., 1991; Ruggeri y col., 1992; Rozemblum y col., 1997). Por ejemplo, la proteína p53 está mutada en el 60% de los adenocarcinomas pancreáticos ductales primarios y, aún en mayor proporción, en líneas celulares tumorales las mutaciones puntuales se localizan en las secuencias correspondientes a los exones 5, 6, 7, o 8 (Berrozpe y col., 1994). Las alteraciones en la proteína p53 podrían tener una cierta relevancia clínica para el diagnóstico diferencial entre el cáncer de páncreas y lesiones pancreáticas inflamatorias como la pancreatitis (Hall y col., 1991; Casey y col., 1993). En los últimos años, se ha descrito también una elevada frecuencia de alteraciones en el gen supresor tumoral p16/CDKN2 en carcinomas de páncreas avanzados (Caldas y col., 1994; Liu y col., 1995; Huang y col., 1996). También se han

detectado mutaciones en el gen supresor de tumores SMAD4 en tumores pancreáticos (Lemoine, 1997). La importancia de mutaciones en otros genes supresores de tumores como son APC, DCC (delecionado en cáncer de colon) y RB-1, genes de reparación del DNA; MCC o c-erbB-2, en la génesis del cáncer de páncreas es menos clara (Howe y Conlon, 1997).

Finalmente, por lo que se refiere a reordenaciones genómicas en el cáncer de páncreas, estas son aún poco conocidas, como en la mayoría de tumores sólidos. Se han descrito pérdidas del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 6, juntamente con anomalías en el cromosoma 17 (Johansson y col., 1989). Otros estudios genéticos han evidenciado la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 1p en un 25% de los casos de cáncer de páncreas (Ding y col., 1992).

Recientemente, se ha propuesto un modelo de neoplasia pancreática que integra toda la información disponible sobre las bases moleculares del cáncer de páncreas (Lemoine, 1997) (Figura I.12.). Merece la pena destacar que la sobreexpresión de receptores con actividad tirosina-quinasa como el del EGF, erbB-2 y erbB-3, y de sus ligandos, juntamente con las mutaciones en el oncogén *K-ras* y/o en el gen supresor tumoral p53, proporciona a las células tumorales pancreáticas una combinación de factores potenciadores de la proliferación celular que podría explicar la extrema agresividad del cáncer de páncreas humano.

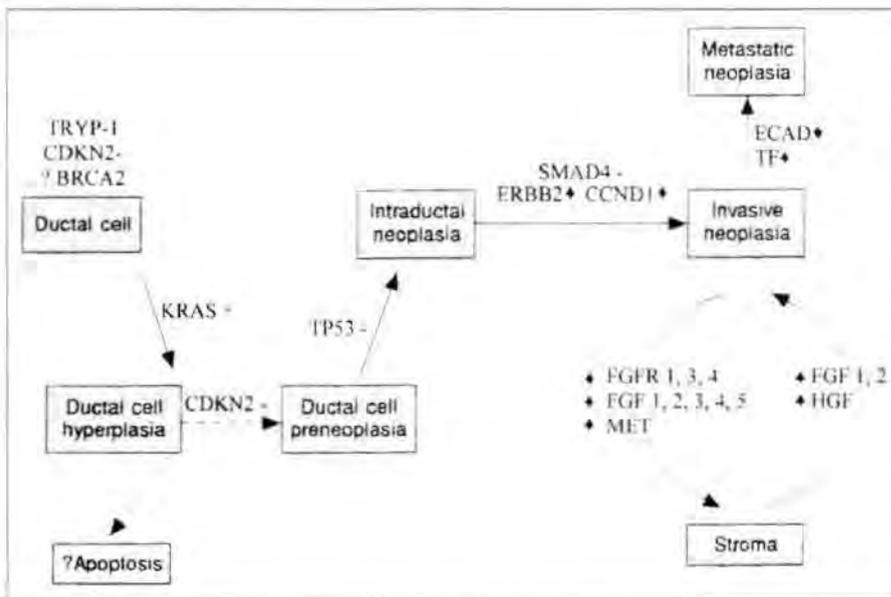


Figura I.12.: Modelo propuesto para las bases genéticas de la tumorigénesis pancreática. TRYP-1 = tripsinógeno-1; CDKN2 = gen supresor de tumores p16; BRCA2 = gen de susceptibilidad al cáncer de mama; TP53 = gen de la p53; CCND1 = ciclina D1; ECAD = E-caderina; TF = factor tisular; FGF = factor de crecimiento de fibroblastos; FGFR = receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; HGF = factor de crecimiento de hepatocitos; MET = receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. (Tomado de Lemoine, 1997).

I.C.2.b.4. Sintomatología y diagnóstico de los adenocarcinomas pancreáticos

Las manifestaciones iniciales de los adenocarcinomas pancreáticos son inespecíficas y poco determinantes. Debido a su proximidad con el árbol biliar, los adenocarcinomas de cabeza de páncreas provocan ictericia y prurito. Los pacientes presentan, además, dolor epigástrico y pérdida de peso. Pueden aparecer también intolerancia a la comida y náuseas y vómitos en el caso de metástasis hepáticas. Este tipo de sintomatología es común a otras enfermedades y no es posible discriminar el cáncer de páncreas de otros estados patológicos (Raijman & Levin, 1993). Los reconocimientos médicos no pueden distinguir el tumor debido a la localización del páncreas, que lo hace difícilmente palpable.

Actualmente, el mejor método para tratar el tumor es la resección quirúrgica operatoria, pero sólo es posible si el tumor está circunscrito únicamente al páncreas, y aún en estos casos la tasa de supervivencia es muy baja. Por ello, es necesario un diagnóstico precoz de la enfermedad que permita la detección del tumor mientras esté focalizado y no haya dado lugar a diseminación, unido a un mejor conocimiento de la biología del tumor que permita avances en su terapia.

Un buen método diagnóstico debería ser capaz de:

- i) diagnosticar pequeños tumores que puedan ser resectables.
- ii) diferenciar el carcinoma pancreático de otras enfermedades pancreáticas benignas, especialmente de la pancreatitis crónica.
- iii) proporcionar una gran especificidad, distinguiendo entre cáncer de páncreas y otros tipos de tumores.
- iv) facilitar información aplicable a la elección de la estrategia terapéutica.

En una reciente revisión sobre estrategias para el tratamiento del adenocarcinoma pancreático, Ettinghausen y col. (1995) ponen de manifiesto la utilidad de técnicas de imagen para la evaluación de la resectabilidad de un tumor o no. Audiso y col. (1996) hacen una revisión de la utilidad de los marcadores serológicos no sólo en el diagnóstico precoz, sino también en la diferenciación entre el cáncer de páncreas y otras patologías pancreáticas, así como en el seguimiento de los pacientes sometidos a tratamiento. Friess y col. (1997a) han revisado los marcadores séricos y moleculares del cáncer de páncreas.

Técnicas de imagen:

Las modernas técnicas de imagen han permitido visualizar órganos gastrointestinales, entre ellos el páncreas, que inicialmente habían sido invisibles en términos de diagnóstico clínico. Así, la ultrasonografía abdominal (US), la tomografía computerizada (CT), y la colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (ERCP) han hecho posible visualizar tumores incipientes, imposibles de detectar hasta hace unos años. La ERCP también permite la

determinación preoperatoria de resectabilidad del tumor. En los últimos años, la laparoscopia se ha utilizado para identificar metástasis en el hígado y en superficies peritoneales en pacientes que se creía que sólo tenían tumores resectables. La ultrasonografía endoscópica (EUS) se ha utilizado para detectar tumores inferiores a 2 cm y para diferenciar adenocarcinomas pancreáticos de insulinomas y, más importante aún, de "pseudotumores" de pancreatitis. La reciente experiencia con el ultrasonido laparoscópico muestra una mejora en la capacidad de detección de linfadenopatías regionales malignas y metástasis ocultas en el hígado. Además, la aspiración de biopsias con aguja fina bajo la guía de US, CT o laparoscopia permiten un diagnóstico preoperatorio de la enfermedad.

La mayoría de estas técnicas son invasivas y por ello aún no se pueden utilizar de manera rápida y eficaz en la rutina clínica.

Marcadores tumorales en el cáncer de páncreas:

Históricamente, los marcadores tumorales se definieron como sustancias liberadas selectivamente por las células tumorales al torrente circulatorio, de manera que su detección en el suero, u otros fluidos biológicos, debería permitir el seguimiento de los procesos malignos. Actualmente, el término *marcador tumoral* se ha extendido a todas aquellas moléculas expresadas de manera selectiva en células y tejidos tumorales. Marcadores citogenéticos, productos de oncogenes y otras proteínas que se expresan anormalmente en células transformadas pueden contribuir eficazmente, no solamente al diagnóstico, sino también a la caracterización del tipo de tumor y, eventualmente, constituir dianas biológicas específicas en nuevas terapias (Magdelénat, 1992).

El análisis sérico de marcadores tumorales presenta la ventaja, respecto a algunas de las técnicas de imagen anteriores, de no ser invasivo y de permitir no sólo el diagnóstico, sino también el pronóstico y la monitorización de los procesos tumorales. La mayoría de marcadores tumorales utilizados se muestran eficaces en el seguimiento de pacientes ya diagnosticados, pero ninguno de ellos presenta una especificidad y sensibilidad suficientemente elevadas como para proporcionar un diagnóstico definitivo. Por ello, normalmente se combina su detección con alguna técnica de análisis de imágenes.

Los marcadores tumorales asociados al cáncer de páncreas se incluyen en tres grandes categorías: enzimas pancreáticos, antígenos asociados a tumores y antígenos oncofetales (Tabla I.6.).

Tabla 1.6. Clasificación de los marcadores tumorales asociados al cáncer de páncreas.

Enzimas pancreáticos	Antígenos asociados a tumores	Antígenos oncofetales
Amilasa	CA 19.9	CEA
Elastasa-1	CA 494	FAP
Fosfatasa alcalina	CA 242	POA
Galactosil transferasa II	CA 50	
Ribonucleasa	CAM 17	

Abreviaturas: CA 19.9: Antígeno Carbohidrato 19-9; CA 494: Antígeno Carbohidrato 494; CA 242: Antígeno Carbohidrato 242; CAM 17: Antígeno de glucoproteína mucosa; CEA: Antígeno Carcinoembrionario; FAP: Proteína Fetoacinar Pancreática; POA: Antígeno Oncofetal Pancreático.

I.C.2.b.5. Terapias de los adenocarcinomas pancreáticos

Como se ha comentado anteriormente, los datos clínicos y los marcadores séricos de los que se dispone actualmente son útiles sólo en estados avanzados de la enfermedad, y un diagnóstico precoz es aún una meta por conseguir. Tan solo un 15% de los pacientes presenta, en el momento del diagnóstico, un tumor resectable, y de estos sólo un 5 % viven más de 5 años. Los tratamientos aplicados sólo son, en cierta manera, efectivos en estados iniciales de la enfermedad.

Los tratamientos que se han venido aplicando han sido la quimioterapia, la cirugía curativa o paliativa, la radiación curativa o paliativa postoperatoria, la terapia preoperatoria con neoadyuvantes y la terapia con adyuvantes, pero en general ninguno de ellos ha resultado efectivo (Raijman & Levin, 1993; Andrén-Sandberg y col., 1997; Link y col., 1997; Waters y col., 1997). La cirugía y la radiación han sido las opciones más usadas. Pero la radiación, aunque puede paliar los síntomas locales de la enfermedad en estados avanzados, juntamente con la utilización de analgésicos, no permite la curación del tumor y presenta complicaciones en algunos casos.

Los tumores pancreáticos han resultado ser muy resistentes a la quimioterapia, pues en los últimos 20 años se han evaluado un gran número de agentes quimioterapéuticos en ensayos clínicos de fase II sin obtenerse importantes mejoras en los tiempos de supervivencia. Uno de estos agentes ha sido el 5-fluorouracil (5-FU), que se ha administrado sólo o en combinación con otros agentes, obteniéndose respuesta entre el 15 y el 26% de los casos, pero sin observarse mejoras considerables en el tiempo de supervivencia. La mitomicina-C ha sido otro de los agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizado en el cáncer de páncreas, con un 27% de respuesta. También se han utilizado diferentes antraciclina, ifosfamidias y nitrosoureas, y muchos otros agentes, sin conseguir mejoras significativas. A su vez, se han probado combinaciones de varios de estos agentes y, aunque en muchos casos se ha observado una respuesta más elevada, ello no ha implicado una ostensible mejora en el tiempo de supervivencia (Schnall y MacDonald, 1996; Waters y col., 1997).

También se han hecho pruebas con tratamientos hormonales, dado que hay varias evidencias que apuntan a las hormonas sexuales como factores en el desarrollo del cáncer de páncreas. Los agentes que se han probado han sido el tamoxifén, el inhibidor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante y un análogo de la somatostatina (el 'octreotide'), observándose en todos los casos mejorías ligeras y poco significativas (Schnall y MacDonald, 1996; Waters y col., 1997).

Otros nuevos agentes que se están probando son los taxanos (derivados del taxol). Su efecto citotóxico es debido a que bloquean las dinámicas normales de microtúbulos requeridas para la división celular y otros procesos que se dan durante la interfase. Se ha obtenido repuesta a estos tratamientos entre el 17 y 60 % de los casos, y se han observado ligeras mejorías en los tiempos de supervivencia.

La gencitabina es un nuevo análogo de nucleótidos sustituido con flúor. Se trata de una prodroga que necesita ser anabolizada mediante fosforilación para ser activa. La gencitabina tiene interés, no sólo porque produce una repuesta antitumoral parcial, sino también porque parece mejorar la calidad de vida al reducir los requerimientos de medicación para paliar el dolor y mejorar el estado nutricional del paciente (Moore, 1996).

En los últimos años se están intentando desarrollar otros tipos de terapia como son:

- la inmunoterapia combinada con modificadores de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se han utilizado los anticuerpos MAb 17-1A (que reconocen a un antígeno glucídico de 37-kDa, citoplasmático y de membrana, que expresan las células pancreáticas tumorales, e inician una repuesta citotóxica celular dependiente de anticuerpos) combinados con la IL-2 o el factor estimulador de colonias (Friess y col., 1997b)
- la combinación de la estimulación de la expresión del EGF-R con citoquinas (tipo TNF- α)
- el tratamiento con anticuerpos anti EGF-R (Schmiegel y col., 1997)
- la utilización de inhibidores de metaloproteasas de la matriz, que se administran por vía oral como el Marimastat© (Evans y col., 1997; Waters y col., 1997)
- la modificación, por terapia génica, de las características genéticas de las células tumorales mediante la introducción de nuevos genes que reemplacen a los defectivos, o la supresión de la expresión de los genes anormales que contribuyen al fenotipo maligno, siendo el gen de la p53 y de k-ras los máximos candidatos (Waters y col., 1997; Lemoine, 1997)
- la terapia de la activación génica de prodrogas que utiliza las diferencias en la transcripción entre las células normales y neoplásicas para dirigir la expresión selectiva

de un gen suicida metabólico que proporciona sensibilidad a la prodroga (Lemoine, 1997)

La validez de estas nuevas terapias aún no ha podido evaluarse, dado que son estudios muy recientes.

I.C.2.c. Insulinomas

Las neoplasias endocrinas pancreáticas son tumores raros que se han clasificado, según los péptidos que secretan y los síndromes clínicos resultantes, en 5 tipos: insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, VIPoma y somatostatina. Hay tumores originados en el páncreas que secretan polipéptidos pancreáticos pero no se les ha asociado ningún síndrome. Por otro lado, hay tumores no funcionales (que no producen péptidos endocrinos) que aparecen con la misma frecuencia que los activos hormonalmente (Bieligk y Jaffe, 1995). Las neoplasias endocrinas pancreáticas se identifican, desde el punto de vista inmunocitoquímico, por la expresión de marcadores neuroendocrinos (tipo la enolasa neuro-específica (NSE), cromograninas, etc) y de marcadores de péptidos y aminas biogénicas específicas para cada tipo celular (Klöppel y col., 1995).

La mayoría de tumores endocrinos son malignos, excepto los insulinomas que casi siempre son benignos, y la muerte del paciente puede ser debida a la expansión del tumor o a complicaciones de las endocrinopatías que conllevan.

Los insulinomas son las neoplasias endocrinas del páncreas más comunes, con una incidencia de un caso por cada millón de habitantes y por año (Norton, 1994). Dada la rareza de estos tumores no se han podido realizar estudios epidemiológicos precisos. Normalmente se trata de tumores aislados, pequeños (<2 cm), casi siempre benignos (>90%) que se localizan con igual frecuencia en la cabeza, cuerpo y cola del páncreas. Raramente son ectópicos, pero pueden ser múltiples, especialmente cuando se dan en el síndrome de neoplasia múltiple endocrina de tipo I (MEN-I).

Los insulinomas malignos muestran evidencias de invasión local en el tejido conectivo que los rodea o metástasis en el hígado o nódulos linfáticos. Citológicamente no presentan características diferenciales de los insulinomas benignos. Estos tumores usualmente son alargados, como un diámetro medio de 6 cm. La media de supervivencia sin reaparición de la enfermedad después de la resección es de 5 años, pero la reaparición del tumor se da en el 63 % de los casos con un intervalo medio de tiempo de reaparición de 2.8 años, seguido de una supervivencia media después de la reaparición de sólo 19 meses.

Histológicamente los insulinomas se clasifican dentro de 2 grandes grupos: nidos sólidos con pocos elementos tubuloacinares o bien patrones trabeculares o tipo cintas. Estos tumores normalmente están conectados a elementos ductales hiperplásicos y tienen un contenido variable de tejido conectivo en su interior. Los depósitos de proteínas son comunes. Ni el número de mitosis observadas ni la relación núcleo-citoplasma ayudan a predecir un comportamiento maligno del insulinoma (Comi y col., 1993). En todos los insulinomas se detecta, inmunocitoquímicamente, la presencia de insulina.

I.C.2.c.1. Bases moleculares de los insulinomas

Pavelic y col. (1996), en su estudio sobre las bases moleculares de los insulinomas, han estudiado algunas de las alteraciones ya descritas en el caso de las neoplasias del páncreas exocrino. Han observado que la sobreexpresión de *c-myc* y TGF- α y las mutaciones puntuales en el codón 12 de *k-ras*, aparecen relativamente pronto en la tumorigénesis de los insulinomas malignos, y estas alteraciones también se han detectado, aunque en menor grado, en los insulinomas benignos. Además, los insulinomas malignos también presentan una sobreexpresión de la proteína p53 mutada.

I.C.2.c.2. Sintomatología, diagnóstico y terapia

Los principales síntomas en el diagnóstico del insulinoma son los derivados de la hipoglucemia que conlleva. Éstos se dividen en 2 grandes grupos: neuroglucopenia y respuesta catecolaminica. Los síntomas más prominentes y fidedignos son los debidos a la disfunción del sistema nervioso central (CNS) que incluyen la diplopia, la visión borrosa, confusión, comportamiento anormal y amnesia. Estos pueden progresar produciéndose ataques, situación de coma o daño permanente del cerebro. Los síntomas de la respuesta catecolaminica incluyen sudoración, debilidad, más apetito, temblor, náuseas, sensación de calor, ansiedad y palpitaciones. Dado que todos estos síntomas no son específicos para la hipoglucemia, se debe determinar una baja concentración de glucosa durante los mismos. Estos síntomas se hacen aparentes antes del desayuno, o varias horas después de comer, y se pueden precipitar debido a un elevado ejercicio físico. Es posible evitarlos comiendo frecuentemente.

El diagnóstico retardado de los insulinomas continúa siendo un problema, ya que a pesar de los síntomas como promedio pasan entre 15 meses y 3 años desde la aparición de los primeros síntomas hasta el diagnóstico.

Una vez realizado un diagnóstico bioquímico que determine la existencia del insulinoma es necesaria su localización. Las técnicas de localización no invasivas, como son la ultrasonografía, la tomografía computerizada y la obtención de imágenes por resonancia magnética, han resultado desalentadoras en la localización de los insulinomas, con

sensibilidades entre el 0 y el 33% (Grant, 1996). Por ello se hace necesario la utilización de técnicas radiológicas invasivas. De éstas, la angiografía ha dado resultados satisfactorios debido a la elevada vascularización del tumor.

Una vez el insulinoma se ha diagnosticado inequívocamente y se ha localizado, se elimina en la mayoría de los casos por enucleación o resección operatoria. Sin embargo, cuando las condiciones médicas del paciente excluyen la operación, o cuando los síntomas pueden ser fácilmente controlados con la dieta o pequeñas dosis de medicación, se realiza tratamiento médico. Las medidas en la dieta incluyen comer más a menudo y comer formas de glúcidos absorbibles lentamente, como son los polisacáridos presentes en el pan, las patatas y el arroz. Durante los episodios hipoglucémicos se recomiendan glúcidos rápidamente absorbibles, como los presentes en los zumos de frutas. Las medicaciones más comúnmente usadas para suprimir la secreción de insulina son la diazoxida y las benzotiadiazinas natriuréticas (Perry y Vinik, 1996).

En el caso de insulinomas malignos, se presentan los mismos síntomas asociados a la hipoglucemia. Y dado que las metástasis también mantienen una hipersecreción hormonal se requiere la completa resección del tumor para que los síntomas desaparezcan completamente. En el caso de que la resección no sea posible se realiza un tratamiento con quimioterapia y adiramicina, aunque ésta conlleva una considerable toxicidad.

I.C.2.d. Modelos experimentales para el estudio del cáncer de páncreas

La sintomatología tardía del cáncer de páncreas, y la efectividad prácticamente nula de las modalidades terapéuticas de cirugía, radioterapia o quimioterapia, hacen imprescindible profundizar en el conocimiento de la biología de este tipo de neoplasia.

El estudio de las propiedades biológicas de los tumores pancreáticos fue en principio difícil, dada la inaccesibilidad de tejido tumoral viable para estudios de laboratorio, la falta de modelos experimentales, y la ausencia de antígenos específicos de tejido que pudieran ayudar en el diagnóstico y terapia. En un esfuerzo por superar estas dificultades, se desarrollaron los primeros modelos animales de cáncer de páncreas, mediante la inducción con carcinógenos químicos de tumores pancreáticos en cobayas (Reddi y Rao, 1975), hámsters (Pour y col., 1974, 1977) y ratas (Dissin y col., 1975; Longnecker y Curphey, 1975). Por otro lado, la búsqueda de modelos *in vitro* que permitieran el estudio directo de los factores que influyen en los patrones de crecimiento y la conducta metastásica, la producción de determinados marcadores biológicos o la respuesta a diversos tratamientos, culminó en el establecimiento de líneas celulares a partir de tumores pancreáticos humanos, que han resultado ser valiosas herramientas para el estudio del cáncer de páncreas.

I.C.2.d.1. Modelos "in vitro": líneas celulares

La capacidad de manipular fácilmente células pancreáticas neoplásicas *in vitro* ha supuesto un gran paso en el conocimiento de la biología tumoral pancreática, ya que permite trabajar en situaciones controladas y repetibles.

El trabajo con células tumorales permite la caracterización bioquímica de las células cancerosas y la determinación de antígenos diferenciales (no expresados en células normales), estudios metabólicos y de expresión génica en situación cancerosa. Asimismo, es posible estudiar los efectos de hormonas, factores de crecimiento, fármacos antitumorales, agentes de diferenciación, etc. en la proliferación, morfología y actividad metabólica de las células en cultivo.

Las líneas celulares tumorales pancreáticas humanas establecidas hasta el momento se han clasificado como ductales, con las únicas excepciones de una línea de origen acinar y otra derivada de un ampuloma (Frazier y Longnecker, 1993). A pesar de clasificarse todas como de origen ductal, existen importantes diferencias entre ellas, tanto a nivel morfológico como biológico, que se centran en los estados de diferenciación, tiempos de duplicación, expresión de proteína y de determinados antígenos fetales o tumorales, así como alteraciones genéticas a nivel cariotípico y molecular.

La mayoría de las líneas celulares de cáncer de páncreas descritas en la bibliografía se han establecido a partir de tumores que presentaban morfología ductal, lo que es lógico, ya que el 90% de los tumores pancreáticos son adenocarcinomas y el 75% de ellos se consideran de origen ductal. Por otro lado, hay que recordar que existe una gran controversia respecto al origen de estos adenocarcinomas, ya que tanto células acinares como ductales son capaces de formar estructuras tubulares en situaciones patológicas (Bockman, 1981).

Líneas de origen ductal

Las líneas de adenocarcinoma pancreático humano utilizadas en esta tesis han sido, Capan-1 y Panc-1. Capan-1 fue establecida a partir de una metástasis hepática de un adenocarcinoma pancreático humano muy diferenciado (Fogh y col., 1977a y b), y Panc-1 se estableció a partir de adenocarcinoma pancreático humano poco diferenciado (Lieber y col., 1975). A continuación se detallan algunos de los estudios más relevantes realizados con ambas líneas.

Maillet y col. (1993) realizaron un estudio comparativo de los tiempos de duplicación de las líneas de adenocarcinoma pancreático. Hallaron que varían entre 12 y 70 horas, y se observó una clara correlación con el grado de diferenciación histológica y ultraestructural. Las

líneas que crecían más lentamente presentaban un elevado grado de diferenciación. El tiempo de duplicación de Capan-1 era algo más de 30 horas, mientras que Panc-1 se incluía en el grupo de 20 a 30 horas. Se ha observado que la línea Capan-1, al crecer en ratones atímicos, muestra características morfológicas, biológicas y bioquímicas similares a las del tumor original, lo que la hace una herramienta muy útil para el estudio de la biología del cáncer de páncreas (Kyriazis y col., 1982).

La expresión del RNA mensajero para el TGF- α y de la proteína, tanto en su forma soluble como transmembrana, se ha detectado tanto en la línea Capan-1 como en Panc-1 (Smith y col., 1987; Estival y col., 1992; Oikawa, 1995; Watanabe y col., 1996). En ambas líneas también se ha descrito la expresión de otro ligando del EGF-R, la anfiregulina (Ebert y col., 1994; Oikawa y col., 1995). Respecto al receptor de EGF, la línea Capan-1 presenta 2 subclases de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad (Oustry y col., 1990), y en el caso de Panc-1 se ha detectado la sobreexpresión del EGF-R (Korc y col., 1986). Por lo que se refiere al resto de erbBs, Capan-1 presenta niveles elevados de erbB-2 y niveles de erbB-3 similares a los del EGF-R; mientras que en Panc-1 no se ha detectado erbB-3 y los niveles de erbB-2 son similares a los EGF-R (Oikawa y col., 1995). La expresión de otros factores de crecimiento y sus receptores se ha estudiado en la línea Panc-1. Se ha observado que expresa el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 2 y el receptor de FGF tipo I (Leung y col., 1994). También se ha determinado que produce TGF- β 1, β 2 y β 3 (Beauchamp y col., 1990).

Barton y col. (1991) estudiaron las anomalías del gen supresor de tumores p53 en líneas de cáncer de páncreas y descubrieron que Panc-1 presenta una mutación en el exón 8 y los niveles de expresión de la proteína son elevados, al igual que en Capan-1. Kalthoff y col. (1993) determinaron que el gen de la p53 presenta una mutación en el exón 5 en Capan-1. Respecto a K-*ras*, se han detectado mutaciones en el codón 12 tanto en Capan-1 como en Panc-1 (Kalthoff y col., 1993; Suwa y col., 1994).

Líneas de origen acinar

Se han establecido muy pocas líneas celulares derivadas de carcinomas de células acinares. La mejor caracterizada es AR42J, establecida a partir de un carcinoma acinar primario de un ratón tratado con azaserina (Jessop & Hai, 1980). Esta línea produce enzimas exocrinos y ha permitido el estudio de la regulación de la expresión de los mismos. La única línea humana de origen acinar descrita es HPCYO (Yamaguchi y col., 1990), que produce tripsina, pero no amilasa (dos enzimas marcadores de origen acinar).

Líneas de origen endocrino

El uso de líneas celulares derivadas de islotes de Langerhans está limitado por la disponibilidad de tejido pancreático endocrino. Numerosos investigadores han intentado

establecer líneas celulares secretoras de insulina que mantengan una regulación de la secreción de insulina normal. Se han utilizado diferentes aproximaciones que incluyen la inducción de tumores pancreáticos mediante irradiación o infección vírica, inmortalización de células beta *in vitro*, y desarrollo de ratones transgénicos en los que se dirige la expresión del oncogén hacia las células beta. Pocos de estos intentos han tenido éxito. Las líneas celulares secretoras de insulina más ampliamente utilizadas son RIN (Gazdar y col., 1980), HIT (Santerre y col., 1981), MIN6 (Miyazaki y col., 1990) e INS-1 (Asfari y col., 1992). Estas células expresan principalmente insulina y pequeñas cantidades de glucagón o somatostatina. Ninguna de estas líneas celulares imita perfectamente la fisiología de las células beta, pero son herramientas muy valiosas para el estudio de los eventos moleculares que acompañan a la función y disfunción de dichas células (Poitout y col., 1996). En esta tesis se ha trabajado con la línea HIT, establecida a partir de un cultivo primario de islotes de Langerhans de hámster tipo Syrian transformados con SV40 (Santerre y col., 1981).

Consideraciones generales para el cultivo de líneas celulares pancreáticas

Existen algunos aspectos que se deben tener en cuenta durante el trabajo *in vitro* con líneas celulares pancreáticas. En primer lugar, es necesario un control rutinario de las células con el fin de determinar si se han producido cambios, que pueden ocurrir como resultado de alteraciones en las condiciones de cultivo, tasa de crecimiento superior de una subpoblación celular, plasticidad genómica, contaminación con agentes infecciosos o con otra línea celular (Frazier y Longnecker, 1993). Además, algunas líneas celulares son capaces de presentar diferencias en sus propiedades a distintos niveles de confluencia.

El control rutinario de la morfología se puede llevar a cabo a través de microfotografías tomadas en diferentes pasos y situaciones del cultivo (sobre todo si existen cambios morfológicos en cultivos confluentes). Análisis cariotípicos de rutina, así como análisis de isoenzimas son especialmente útiles en líneas con elevado número de pasos (subcultivos) y siempre que exista alguna sospecha de cambios en las células en cultivo. En el momento de establecer una línea es importante realizar estos análisis cariotípicos y de isoenzimas lo antes posible con el fin de tener un punto de referencia en controles posteriores.

I.C.2.d.2. Modelos animales "in vivo"

Los modelos animales de cáncer de páncreas han proporcionado información sobre la histogénesis y los cambios moleculares asociados a este tipo de tumor. Hasta el momento se han desarrollado tres modelos: carcinogénesis química en rata o hámster, ratones transgénicos, e implantación directa de tejido tumoral humano en ratones inmunodeprimidos (Longnecker y col., 1992; Fu y col., 1992).

La rata se ha utilizado frecuentemente como animal modelo para provocar cáncer de páncreas. Los tumores son de fenotipo acinar y bien diferenciados, de crecimiento lento y baja capacidad metastásica, características totalmente opuestas a la de los tumores exocrinos humanos. Tampoco se han identificado mutaciones en *Ki-ras*, ni alteraciones de expresión del receptor de EGF y c-ErbB-2 (Hall y col., 1990; Lemoine y col., 1992b,c). Este conjunto tan importante de diferencias fenotípicas y biológicas entre los tumores humanos y el modelo de carcinogénesis en rata hacen que este modelo sea poco válido para el estudio del cáncer de páncreas exocrino humano.

En el hámster de raza *Syrian golden* se pueden inducir tumores pancreáticos con carcinógenos como las nitrosaminas (Lognecker et al, 1984; Scarpelli y col., 1986) o por manipulaciones quirúrgicas (Rosenberg y col., 1984). Estos tumores presentan un fenotipo ductal muy similar al observado en el hombre, con una reacción desmoplásica pronunciada y una clara predominancia de la invasión perineural. Los animales presentan ictericia y caquexia, y el curso de la enfermedad es muy rápido, como en los adenocarcinomas ductales humanos. Análogamente, los tumores de hámster presentan en un estadio temprano frecuentes mutaciones de *Ki-ras* en los codones 12 y 13 (Cerny y col., 1990; Fujii y col., 1990; Ushijama y col., 1991) y se han observado también alteraciones en la expresión de la proteína p53 (Hall y Lemoine, 1993). La combinación de todas estas similitudes morfológicas, "clínicas" y moleculares entre el modelo de hámster y el tipo más frecuente de carcinoma pancreático en el hombre hacen que este modelo animal sea de gran utilidad para el estudio del cáncer de páncreas (Pour y col., 1991).

Los ratones transgénicos, que expresan oncogenes en el páncreas, constituyen un nuevo modelo de carcinogénesis pancreática. Son una valiosa herramienta para la caracterización *in vivo* de la transformación neoplásica focal y la progresión tumoral en el páncreas (Longnecker y col., 1992). Para conseguir la expresión en el páncreas, los oncogenes se sitúan bajo el control de secuencias promotoras específicas de células acinares. Los primeros estudios se centraron en la expresión de una construcción del promotor de la elastasa-1, una proteína acinar, con el gen del antígeno T grande del virus de simios 40 (SV40). La capacidad oncogénica del antígeno T es debida a que se une al DNA celular y vírico e induce su replicación, y a la vez forma complejos con p53 y Rb inactivando sus funciones (Fanning y Knippers, 1992). Se observó que aparecían en los ratones transgénicos tumores acinares después de 3-6 meses (Ornitz y col., 1987). La expresión de manera análoga del oncogén *ras* activado dio lugar a adenocarcinomas más agresivos, pero que aún mantenían el fenotipo acinar (Quaife y col., 1987). Otras líneas de transgénicos han proporcionado importantes datos sobre la biología pancreática, especialmente en referencia a la histogénesis del tumor. Así, la expresión dirigida de TGF- α en células acinares ha producido transformaciones ductales (Jhappan y col., 1990; Sandgren y col., 1990), y ratones transgénicos en los que se ha

dirigido la expresión de *c-myc* hacia las células pancreáticas acinares han desarrollado tumores con fenotipo ductal asociados a desmoplasia (Sandgren y col., 1991).

En todos los modelos de animales transgénicos para tumores de islotes se han utilizado construcciones del antígeno T de SV40 unidos a promotores de genes que dirigen la expresión hacia los islotes. Entre dichos promotores están el del gen de la insulina (Hanahan, 1985), el de vasopresina (Murphy y col., 1987) y el del glucagón (Rindi y col., 1991). Es de destacar que también se han detectado insulinomas en líneas de ratones transgénicos que no llevaban un promotor heterólogo o llevaban promotores para genes no específicos de islotes (Bell y col., 1990). La delección del estimulador del gen de SV40 Tag es común a todas las construcciones que producen insulinomas en ratones transgénicos (Palmiter y col., 1985; Messing y col., 1985; Murphy y col., 1987). Todos los modelos aquí descritos proporcionan tumores endocrinos funcionalmente activos desde el punto de vista hormonal.

Los modelos de cáncer de páncreas en ratones inmunodeprimidos o atímicos (*Balb/c/mu/mu*) consisten en la implantación de tumores pancreáticos humanos (o la inyección de células tumorales pancreáticas) en estos animales para estudiar la formación y características de los tumores derivados. Los primeros estudios mostraron que tumores injertados por vía subcutánea o intramuscular son útiles en los estudios de crecimiento tumoral y malignidad, aunque pierden la capacidad metastásica del tejido tumoral de origen (Sordat y col., 1973). Por ello, recientemente, se ha desarrollado un nuevo modelo consistente en la implantación de tejido tumoral humano intacto procedente de biopsias en el propio páncreas del ratón (implantaciones ortotópicas), lo que aumenta el porcentaje de éxito de implantes y da lugar a un patrón de diseminación en el ratón atímico muy similar al del tumor humano (Fu y col., 1992; Reyes y col., 1993). Por lo tanto, este modelo de tumores de injerto (*xenografts*) puede ser de gran utilidad para diseñar y ensayar la posible utilidad terapéutica de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas individuales para pacientes con cáncer de páncreas.

I.C.3. TUMORES DE PLEXO COROIDEO

Los tumores de plexo coroideo son el otro tipo de neoplasias con el que se ha trabajado en esta tesis, por ello se explicarán en este apartado.

I.C.3.a. Epidemiología, etiología y terapia de los tumores de plexo coroideo

El plexo coroideo es un epitelio que se extiende desde el epéndimo y reviste los ventrículos cerebrales y la médula espinal (Figura I.13.). Está en íntimo contacto con las células epiteliales de los capilares y con el líquido cefalorraquídeo (CSF), y forma parte de la barrera hematoencefálica. Los tumores derivados de las células neuroepiteliales del plexo

coroideo, ya sean papilomas o carcinomas, son neoplasias raras (suponen el 0,6 % de todos los tumores intracraneales) que normalmente se dan en niños menores de 12 años, aunque pueden desarrollarse a cualquier edad. La curva de distribución en función de la edad presenta 2 picos: uno al principio de la infancia y otro a edad avanzada. Este segundo pico corresponde a tumores en adultos descubiertos al realizar la autopsia. Los papilomas que se desarrollan en niños de muy corta edad son probablemente congénitos (Schiffer, 1993; Levin y col., 1993). Se estima que los papilomas son entre 4 y 10 veces más comunes que los carcinomas (Packer y col., 1992).

Los tumores de plexo coroideo podrían tener una etiología vírica. La secuencia del SV40 TAG se ha detectado, por PCR y por inmunohistoquímica, en aproximadamente la mitad de estos tumores (Bergsagel y col., 1992; Lednický y col., 1995). Recientemente se ha descubierto, por técnicas de PCR, que las secuencias codificantes para el antígeno T de SV40 están presentes en células sanguíneas periféricas y espermatozoides del 23 y 45 % respectivamente de donantes sanos estudiados (Martini y col., 1996), y se ha sugerido que las células sanguíneas periféricas podrían ser vectores para la transmisión de SV40 a otros tejidos del huésped.

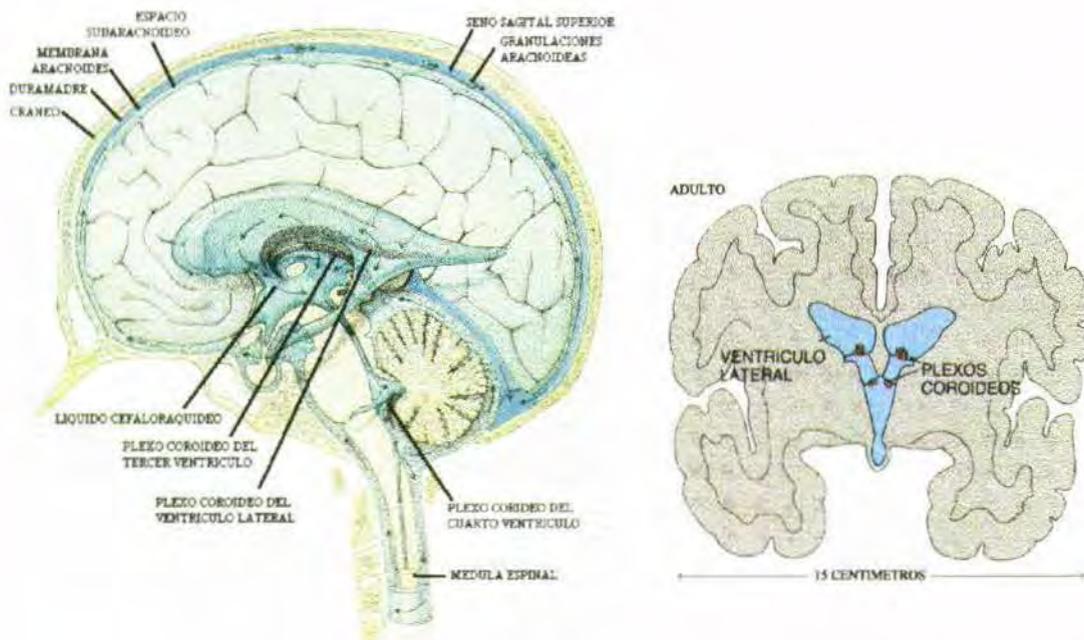


Figura I.13.: El plexo coroideo del organismo adulto y su localización ventricular.

Los tumores de plexo coroideo normalmente tienen un buen pronóstico, aunque con cierta frecuencia se dan recurrencias locales. Sin embargo, no aparecen metástasis vía el CSF. Actualmente, la mortalidad después de la resección operatoria es inferior al 15%, y la

supervivencia a los 10 años del 88%. Los tumores malignos de plexo coroideo o plexo carcinomas son poco frecuentes y se detectan mayoritariamente en niños o adolescentes. En el caso de los carcinomas sí que aparecen metástasis ya sean extracraneales o via el CSF (Schiffer, 1993).

Aunque los papilomas y carcinomas de plexo coroideo estén extensamente distribuidos a lo largo de los espacios ventriculares o subaracnoides, la detección de los papilomas es normalmente subclínica, mientras que por el contrario los carcinomas son claramente sintomáticos. Los tumores de plexo coroideo se detectan fácilmente por barrido de tomografía computerizada o por resonancia magnética. En pacientes con cambios anaplásicos, es recomendable el seguimiento del paciente por mielografía o examinación del CSF.

El tratamiento más común de los papilomas de plexo coroideo es la resección quirúrgica total. La radioterapia en los tumores de plexo coroideo sólo se aplica en el caso de papilomas no resectables o de carcinomas, y la quimioterapia en tumores anaplásicos o en los casos que hay recurrencia. Dada la naturaleza agresiva de la mayoría de tumores anaplásicos, la terapia en estos casos es igualmente agresiva, con radioterapia y en algunos casos quimioterapia intraventricular.

I.C.3.b. Histología de las patologías neoplásicas del plexo coroideo

El lugar de aparición de los tumores de plexo coroideo son preferentemente los ventrículos cerebrales, con frecuencias del 50, 34 y 15.3 % en los ventrículos laterales, el cuarto ventrículo y el tercer ventrículo respectivamente. Los tumores de los ventrículos laterales parecen ser más frecuentes en los niños y los del cuarto ventrículo en adultos. Los tumores del tercer ventrículo son extremadamente raros. Muy excepcionalmente, el tumor es biventricular. Los tumores también pueden ser extraventriculares.

Dado que los papilomas tienden a crecer lentamente, se expanden hasta llenar el ventrículo y bloquear el flujo del CSF. Además, se cree que el propio papiloma secreta CSF. Los papilomas o carcinomas de plexo coroideo pueden producir hidrocefalia por obstrucción del CSF, por sobreproducción de dicho líquido por el tumor, o por el daño producido por la reabsorción de CSF debido a las continuas hemorragias. Como resultado, aparece con frecuencia una presión intracraneal aumentada. Los tumores en el cuarto ventrículo pueden provocar también ataxia.

Los tumores tienen un aspecto globular y rojizo, y algunas veces tienen apariencia de coliflor. Son tumores blandos y muy vascularizados, que crecen primero por expansión dentro del ventrículo, desplazando y comprimiendo posteriormente estructuras yuxtaventriculares. Pueden alcanzar un volumen considerable y, además de llenar la cavidad ventricular, salir de

ésta e invadir el tejido nervioso. Histológicamente, su estructura es muy simple, pues a pesar de presentar numerosas vellosidades, la neoplasia mantiene el aspecto del plexo coroideo normal. Los márgenes de las papilas están constituidos por estroma vascular-conectivo. Normalmente no se observan mitosis y, si las hay, son signos de mayor malignidad. La identificación de los tumores de plexo coroideo malignos, o carcinomas, es difícil y esencialmente se basa en la observación de infiltración en el tejido nervioso, la aparición de signos histológicos de malignidad, la desaparición de la típica arquitectura regular del tumor, y la presencia de actividad mitótica. Aunque generalmente son patológicamente distintos, a veces las neoplasias de plexo coroideo primarias pueden ser difíciles de diferenciar de carcinomas papilares metastásicos, ependimomas papilares o meduloblastomas. De los ependimomas normalmente se diferencian por la naturaleza del estroma que los rodea, que es neuroglial en los ependimomas y fibrovascular en los papilomas de plexo coroideo. Del resto de tumores papilares pueden diferenciarse gracias a estudios inmunohistoquímicos (Ang y col., 1990).

I.C.3.c. Modelos experimentales para el estudio de las neoplasias de plexo coroideo

En los últimos años se han obtenido un gran número de animales transgénicos que desarrollan tumores de plexo coroideo. Son modelos valiosos para el estudio de las neoplasias cerebrales de plexo, pues los tumores aparecen de forma endógena en el contexto fisiológico normal y mimetizan la etiología de este tipo de tumor.

Janisch y Schrieber (1977) observaron que en hámsters recién nacidos inoculados intracerebralmente con el virus SV40 aparecían papilomas de plexo coroideo. Posteriormente, Brinster y col. (1984) describieron el primer modelo de animal transgénico que desarrollaba tumores de plexo coroideo, aunque algunos de estos ratones también presentaban otras patologías. Este modelo se obtuvo por microinyección de una construcción del gen del virus SV40 fusionado a secuencias reguladoras del gen de la metalotionina. En los años siguientes se desarrollaron una gran variedad de modelos transgénicos a partir de construcciones que contenían el estimulador completo del gen nativo de SV40, en los que aparecían tumores de plexo coroideo, independientemente de la presencia de secuencias reguladoras de otros genes fusionados al DNA del virus (Palmiter y col., 1985; Van Dyke y col., 1987; Messing y col., 1988; Marks y col., 1989). En modelos de animales transgénicos donde el transgén utilizado tenía el gen del antígeno T sin la secuencia de 72 pb del estimulador, pero con la secuencia repetitiva de 21 pb los tumores de plexo coroideo aparecían raramente (Palmiter y col., 1985; Reynolds y col., 1988). Todo esto ha llevado a sugerir que la secuencia de 72 pb del estimulador y la secuencia repetitiva de 21 pb del gen de SV40 dirige la expresión del oncogén vírico al plexo coroideo.

Los tipos de tumores que desarrollaron estos modelos transgénicos fueron tanto papilomas como carcinomas del plexo coroideo, y la aparición de los tumores se daba en los primeros meses de vida de los ratones, lo que se correlaciona con la mayor frecuencia de los tumores humanos en niños. La disponibilidad de estos modelos animales ha permitido caracterizar estos tumores, tanto histológicamente como respecto a la expresión de genes.

1.D. LOS INHIBIDORES PROTEICOS DE PROTEASAS

El inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) ha sido la molécula objeto del presente trabajo. Se han estudiado sus efectos sobre tumores pancreáticos y de plexo coroideo.

El PCI es uno de los numerosos inhibidores proteicos de proteasas presentes en la naturaleza. Las proteasas, es decir, aquellos enzimas cuya función consiste en hidrolizar enlaces peptídicos de proteínas, están involucradas en prácticamente todos los aspectos de la vida (Schnebli y Braun, 1986). Los inhibidores proteicos de proteasas son, como estas, ubicuos, y se encuentran en múltiples formas en numerosos tejidos animales y vegetales, así como en microorganismos. La función fisiológica general de los inhibidores de proteasas es prevenir proteólisis no deseadas en una doble vertiente: para proteger proteínas de enzimas proteolíticos propios o extraños, y para impedir la proteólisis incontrolada en aquellos lugares donde la proteólisis limitada es importante en procesos bioquímicos o fisiológicos (Laskowski y Kato, 1980). Los inhibidores de proteasas se encuentran, por ello, implicados en los mismos procesos que las proteasas, algunos de los cuales son el procesamiento de hormonas peptídicas y neuropéptidos, la activación del complemento y la coagulación de la sangre, la fecundación, la carcinogénesis, los mecanismos de defensa contra patógenos, etc. (Ribbons y Brew, 1976; Ryan, 1989; Fritz y col., 1990). Por lo anteriormente explicado, los inhibidores de proteasas tienen un gran interés biotecnológico, y algunos de ellos se comercializan en la actualidad, dado que poseen diferentes aplicaciones farmacéuticas, en investigación biomédica e industriales (Hewlet, 1990; Scharpe y col., 1991). La función fisiológica exacta de numerosos inhibidores de proteasas se desconoce, pues muchos de ellos se han descubierto y aislado por su capacidad de inhibir proteasas de las que es fácil disponer (p. ej., tripsina, quimotripsina, subtilisina,...) y no se sabe cuál es el enzima que inhiben en condiciones fisiológicas, su verdadera diana. Constituyen, por esta razón, proteínas a la búsqueda de una función.

Con la única excepción de las macroglobulinas, los inhibidores de proteasas presentan las características siguientes:

- Cada inhibidor de proteasa sólo inhibe proteasas pertenecientes a la misma clase mecanística.
- La inhibición es competitiva.

- En el complejo enzima-inhibidor, la actividad enzimática respecto a todos los sustratos queda totalmente suprimida.

En los vegetales se han encontrado inhibidores de proteasas pertenecientes a tres clases mecanísticas (Ryan, 1989):

- Inhibidores de serina-proteasas: se encuentran muy extendidos en el reino vegetal y pertenecen, como mínimo, a seis familias no homólogas entre sí.
- Inhibidores de cisteína-proteasas: se han hallado hasta el momento en patatas, piña tropical y arroz.
- Inhibidores de metaloproteasas: se han descrito inhibidores de carboxipeptidasas (A y B) en patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*S. lycopersicon*), que se han denominado, respectivamente, inhibidores de carboxipeptidasa de patata (PCI) y de tomate (TCI).

I.D.1. INHIBIDORES DE PROTEASAS Y CÁNCER

En la última década se ha demostrado que una gran variedad de inhibidores de proteasas de diferentes orígenes (animal, vegetal y de microorganismos) tienen una fuerte actividad anticarcinogénica en modelos animales *in vivo* (Kennedy, 1994). Entre éstos, el inhibidor de Bowman-Birk (BBI), derivado de soja, que inhibe a la quimotripsina y la tripsina, se ha estudiado extensamente. El BBI inhibe la carcinogénesis inducida por diferentes tipos de carcinógenos, y administrado por diferentes vías (incluida la dieta) inhibe la aparición de diferentes tumores en varias especies animales (Kennedy, 1993). Sin embargo, se desconoce con exactitud el mecanismo por el cual muchos inhibidores de proteasas (como el BBI), contribuyen a la prevención del cáncer.

Los inhibidores de proteasas podrían interferir en la génesis y el desarrollo tumoral mediante una gran variedad de mecanismos (DeClerk y Imren, 1994; Kennedy, 1993; Clawson, 1996), algunos de ellos ya mencionados en el apartado I.B.3. En efecto, los inhibidores de proteasas pueden:

- Bloquear la cascada de proteasas implicadas en el proceso invasivo y metastásico.
- Inhibir la angiogénesis.
- Inhibir la liberación de factores de crecimiento necesarios para el crecimiento tumoral.
- Impedir la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales posiblemente están implicados en el inicio de la transformación celular.
- Afectar la expresión de ciertos oncogenes (*c-myc*, *c-fos*).
- Reducir la amplificación del DNA asociada a la transformación celular inducida por radiación.

I.D.2. EL INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI)

I.D.2.a. Características generales

El PCI es una proteína pequeña, rica en puentes disulfuro, presente de forma natural en la patata. Su conformación es globular, y está formada por un núcleo central compacto del que protuyen las colas N y C terminales (Figura I.14.). En la naturaleza, el PCI existe en cinco isoformas, cuyas propiedades se resumen en la Tabla I.7. (Hass y col., 1979). Como se puede observar, se trata de proteínas muy pequeñas, de 37-39 residuos, correspondientes a pesos moleculares entre 4075 y 4333 Da. Todas ellas tienen un punto isoelectrico inferior a 7, y no poseen ni leucina ni metionina y su coeficiente de extinción del PCI a 280 nm es de $E_{0,1\%}=3$. El PCI es un inhibidor de las carboxipeptidasas A y B de muy alta afinidad, siendo su K_i del orden de nM. No existen diferencias significativas en esta K_i entre las diferentes isoformas del inhibidor. El PCI es muy resistente a la proteólisis y a altas temperaturas, debido a su reducido tamaño y a la presencia de los tres puentes disulfuro por molécula (Ryan y col., 1974).

Tabla I.7.: Características de las isoformas del PCI de los tubérculos de patata.

Propiedad	Isoforma				
	PCI-Ia	PCI-Ib	PCI-IIa	PCI-IIb	PCI-III
Peso molecular	4219	4089	4333	4204	4075
Nº de residuos	39	38	39	38	37
Punto isoelectrico	4,6		5,8		6,5
K_i , app. (CPA)	1,9-3,5 nM		1,5-2,7 nM		1,6-3,3 nM
K_i , app. (CPB)	3,2-6 nM		1,1-5,5 nM		1,3-3,3 nM

Las cinco isoformas del PCI tienen secuencias de aminoácidos casi idénticas, como se muestra a continuación. Todas poseen 3 puentes disulfuro. La isoforma utilizada en el presente trabajo ha sido la IIa.

	5	10	15	20	25	30	35
PCI-Ia	<EQHADPI	CNKP	<u>CKTHDD</u>	CSGAWF	CQA	CWNAAGT	CGPYVG
PCI-Ib	<EHADPI	CNKP	<u>CKTHDD</u>	CSGAWF	CQA	CWNAAGT	CGPYVG
PCI-IIa	<EQHADPI	CNKP	<u>CKTHDD</u>	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPYVG
PCI-IIb	<EHADPI	CNKP	<u>CKTHDD</u>	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPYVG
PCI-III	HADPI	CNKP	<u>CKTHDD</u>	CSGAWF	CQA	CWNSART	CGPYVG

Por lo que respecta a su localización en la planta, el PCI es especialmente abundante en los tubérculos, y se ha encontrado que se acumula, en grado variable, en las hojas, tallos y

yemas (Hass y col., 1979), sobre todo en circunstancias especiales, como por ejemplo en respuesta a heridas (Graham y Ryan, 1981). Respecto a su localización intracelular (Hollander-Czitko y col., 1985), se ha descrito que el PCI se acumula en las vacuolas de las células del mesófilo en las hojas de la patata, por lo que es de esperar que en las células del resto de los órganos donde aparece el PCI sea también de localización vacuolar.

Dado que el PCI en su fuente natural no es demasiado abundante, en el presente trabajo el inhibidor se ha obtenido de manera recombinante en *E.coli*. Se ha utilizado un gen sintético para el PCI, que se ha expresado en *E.coli* para obtener el inhibidor recombinante en grandes cantidades mediante fermentación (Molina y col., 1992; Molina y col., 1994; Marino y col., 1994).

La función o funciones fisiológicas del PCI no están aún claras. Se ha sugerido que podría regular proteasas endógenas de la patata, o bien tener como misión protegerla contra proteasas de plagas (insectos, fitófagos, hongos, etc; Ryan y col., 1974). Hasta el momento no se ha encontrado que el PCI inhiba ninguna de las carboxipeptidasas encontradas en solanáceas (Ryan, 1981), pero sí se ha descrito que el PCI inhibe una carboxipeptidasa producida por el hongo entomopatogénico de la cutícula de cucarachas *Metarhizium anisopliae* (Leger y col., 1994), así como la de ciertas bacterias (Hass y Ryan, 1981). Hay algunos datos que parecen apoyar la posible función del PCI como una molécula defensiva frente a los herbívoros. Así, se acumula en los tubérculos de patata y se encuentra presente, en una concentración menor, en los órganos aéreos de la planta. Su concentración en las hojas se incrementa de 2 a 3 veces en respuesta a heridas mecánicas (Graham y Ryan, 1981). Éste es el mismo comportamiento que presentan otros inhibidores de proteasas de la patata que se ha comprobado que sí son deletéreos para fitófagos. Además, se ha comprobado que el PCI inhibe el crecimiento del gusano *Diatrotica larval*, que se encuentra en una especie de maíz (Orr y col., 1994).

Estructura tridimensional:

En 1982, Rees y Lipscomb resolvieron, por cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional del complejo PCI-CPA y 5 años después, en 1987, Clore y col. determinaron la conformación del PCI libre, en disolución, mediante resonancia magnética nuclear (Figura I.14.). A pesar de su pequeño tamaño, el PCI posee una conformación globular y constituye un buen ejemplo de "proteína mínima" capaz de adoptar una estructura tridimensional estable y funcional.

Tanto la cristalografía de rayos X como la RMN-2D han revelado que el PCI posee una estructura tridimensional compacta, en forma de un núcleo globular del que sobresalen los extremos N- y C-terminal (Figura I.14.). Le faltan los dos elementos clásicos de estructura

secundaria: las hélices α y las hojas β , y sólo posee una hélice 3_{10} entre los residuos 14 a 18, de manera que su estructura tridimensional se organiza en torno a sus tres puentes disulfuro, que enlazan las cisteínas 8 y 24, 12 y 27 y la 18 y 34, y forman un núcleo alrededor del cual se dobla la molécula. Este núcleo, que también se ha observado en muchas otras proteínas (ver Tabla I.8.), se ha denominado nudo de cisteínas (McDonald y Hendrickson, 1993; Sun, 1995; Ling y Nussinov, 1995). El extremo C-terminal constituye el centro de unión primario del PCI a la carboxipeptidasa, y se introduce en el centro activo de esta durante la formación del complejo PCI-CPA (Figura I.15.). Las simulaciones mediante dinámica molecular del PCI libre, tanto en ausencia como en presencia de disolvente (Oliva y col., 1991 a, b; 1992), revelan que este extremo presenta una conformación con un alto grado de estabilidad que mantiene una direccionalidad respecto al núcleo central del inhibidor, muy similar a la que posee en el complejo PCI-CPA. En el mantenimiento de esta direccionalidad parecen tener un papel importante diversos puentes de hidrógeno que se establecen entre átomos de la cadena principal de los residuos de la cola y otros del núcleo globular, destacando los siguientes: Ala26-Gly35, Trp28-Pro36, Trp22-Tyr37 y Asp16-Tyr37.

Tabla I.8.: Superfamilias de proteínas que comparten un plegamiento de nudo de cisteínas.

1	Lectinas de plantas/péptidos antimicrobianos
2	Inhibidores de proteasas de origen vegetal
3	Kalata B1
4	Gurmarina, polipéptido supresor de gusto dulce
5	Toxina tipo omega
6	Toxina de escorpión
7	Dominio de unión a celulosa
8	(Pro)colipasa
9	EGF/laminina
10	Inhibidor bromeliano VI (inhibidor de cistein proteasas)
11	BB1
12	Tipo Elafina
13	Inhibidor del Factor Xa, antistasin

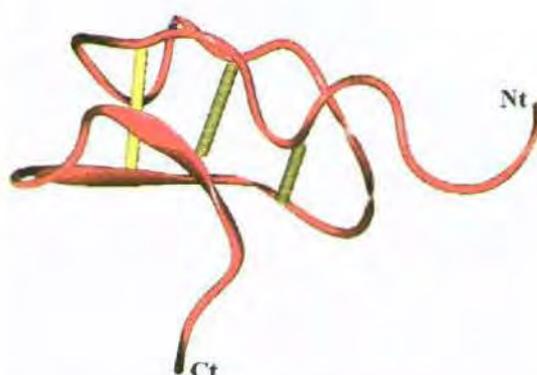


Figura I.14.: Estructura del esqueleto de carbonos α del PCI representado en forma de cinta. Los puentes disulfuro se muestran explícitamente en color amarillo.

I.D.2.b. Interacciones entre el PCI y la carboxipeptidasa A (CPA)

En el complejo PCI-CPA, residuos del centro activo del enzima interaccionan con los cuatro aminoácidos C-terminales del PCI: Gly 39, Val 38, Tyr 37 y Pro 36, formando la región de contacto primario (Figura I.15.). La Val 38 del PCI, que ocupa el subsitio S_1 de la CPA en el complejo entre ambas proteínas, establece diferentes interacciones con residuos del centro activo del enzima, responsables de la energía de asociación del complejo, tal y como se ha demostrado mediante técnicas de ingeniería de proteínas (Molina y col., 1994).

Los residuos 27 a 30 del PCI contactan con los 246 a 248 de la CPA, formando una región de contacto secundario. La cadena lateral de la His15 del PCI también forma parte de esta región (Rees and Lipscomb, 1982).

Breve descripción del mecanismo de acción del PCI

Una vez unido el PCI a la CPA, ésta hidroliza el residuo C-terminal del inhibidor (Gly 39), que permanece atrapado en el centro activo. Si el PCI fuese un sustrato normal, a continuación la CPA cortaría el siguiente residuo, pero esto no ocurre porque el núcleo globular del PCI impide que su cola C-terminal avance un lugar en el centro activo del enzima, lo que sería necesario para que ésta cortase el nuevo residuo C-terminal (Val 38). Por otro lado, las interacciones que se establecen entre el PCI y la CPA provocan que el complejo sea muy estable e impiden su disociación. Por lo tanto, el PCI permanece bloqueando el centro activo de la CPA sin poder ser cortado por ella, de aquí su capacidad inhibitoria.

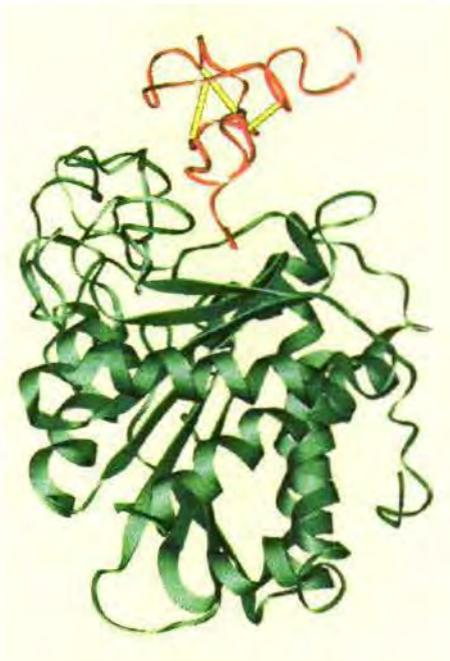


Figura I.15.: Estructura del complejo PCI-CPA. Ambas proteínas se representan en forma de cinta, en verde la CPA, en rojo el PCI (en amarillo sus puentes disulfuro).

I.D.2.c. Aplicaciones del PCI

El PCI, al igual que otros inhibidores de proteasas, tiene varios campos de aplicación, entre los que se encuentran los siguientes:

- El PCI constituye un modelo para el estudio de la relación "estructura-función" en proteínas. Aprovechando que es una proteína pequeña y que se puede expresar en forma nativa, soluble y estable, se pueden introducir cambios en su secuencia de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida, y estudiar las alteraciones que estos cambios pueden provocar en su estructura y cómo afectan a su función inhibitoria (Querol y col., 1993).
- Los complejos proteasa-inhibidor (como el CPA-PCI) son buenos modelos para el estudio de las interacciones proteína-proteína, sobre las cuales aún existen muchas cuestiones por resolver (Molina y col., 1994). El conocimiento de las características estructurales de los complejos proteína-proteína, y de las fuerzas que gobiernan su formación, resulta del máximo interés, no sólo teórico, sino también aplicado, porque podría llevar al diseño de fármacos peptídicos, dirigidos específicamente contra proteínas concretas.
- Inhibición de proteasas en cultivos celulares y tisulares. En las muestras originales para la purificación de ciertas proteínas hay muchas carboxipeptidasas que se deben inhibir.
- Purificación de proteasas: el PCI se utiliza para la purificación de diversas carboxipeptidasas mediante cromatografía de afinidad, uniendo PCI a la resina (Hass y col., 1979 y Hass y Ryan, 1981). El PCI presenta diversas características que lo hacen especialmente adecuado como ligando en cromatografía de afinidad: se une fuertemente a sus enzimas diana; es estable a pHs extremos; el cloruro de guanidinio 6 M no desnaturaliza al inhibidor de forma irreversible y puede por ello ser utilizado para lavar la columna. Los grupos amino del inhibidor se pueden modificar sin reducir su actividad, lo que hace posible acoplar directamente el PCI a Sefarosa activada con BrCN. Como resultado de todas estas propiedades, la resina de afinidad con PCI unido es efectiva y estable durante meses, y se ha utilizado para purificar CPA y CPB porcina y bovina (Ager y Has, 1977), carboxipeptidasa de mastocitos (Everit y Neurath, 1980), y otras.
- Aplicaciones clínicas: en este campo, el PCI podría tener aplicaciones en el futuro en dos áreas diferentes.
 - Se ha encontrado que el PCI, a bajas concentraciones (5 µg/mL), inhibe *in vitro* la transformación tumoral inducida por radiación de células embrionarias de ratón (Billings y col., 1989). El PCI se une primero a la membrana plasmática de las células, y se internaliza rápidamente. Se ha comprobado, asimismo, que el inhibidor II de patata (un inhibidor de serin-proteasas) también inhibe la transformación

tumoral inducida por radiación, y, lo que es más interesante, ambos inhibidores (el PCI y el inhibidor II) tienen un efecto sinérgico, es decir, su efecto supresor de la transformación tumoral se incrementa si se administran conjuntamente. Previamente al estudio de Billings y col. se había demostrado que los inhibidores de serín-proteasas son supresores efectivos de la carcinogénesis inducida químicamente y por radiación, no solo *in vitro* sino también *in vivo* (Hocman, 1992). Esto lleva a suponer que existe una serín-proteasa implicada en la transformación maligna de las células. Los resultados obtenidos por Billings y col. sugieren que hay, al menos, dos actividades proteásicas diferentes involucradas en la transformación maligna de las células: una serín-proteasa y una metaloproteasa, siendo esta última susceptible de ser inhibida por el PCI. Esta metaloproteasa podría ser intracelular, y el PCI llegaría hasta ella gracias a que es internalizado. Por todo esto, no se descarta que en el futuro los inhibidores de proteasas puedan ser utilizados en clínica como inhibidores de la transformación tumoral. Debido al efecto sinérgico citado sería ideal la utilización de una mezcla de uno o diversos inhibidores de serín-proteasas y un inhibidor de metaloproteasas, como el PCI.

- Existen diversas carboxipeptidasas reguladoras implicadas en el control de procesos fisiológicos en el cuerpo humano, como el procesamiento de hormonas peptídicas y neurotransmisores (Gee y col., 1993 y Wang y col., 1994). La mayoría de ellas se encuentran en la membrana plasmática de las células, con el centro activo protuyendo al exterior. Algunas de estas carboxipeptidasas son inhibidas por el PCI, como ocurre con la de mastocitos o la de placenta. Por ello, no es descartable que el día que se conozca la función fisiológica exacta de estas carboxipeptidasas, y su posible papel en disfunciones y enfermedades, el PCI encuentre aplicación como inhibidor de las mismas en los casos en que una excesiva actividad carboxipeptidásica esté implicada en la enfermedad.

- Resistencia a plagas en plantas: ya se ha comentado como el posible papel fisiológico del PCI podría ser conferir resistencia frente a fitófagos. Así, se ha descrito que el gusano *Diatrotica larval*, que se encuentra en una especie de maíz, ve inhibido su crecimiento al ser alimentado con PCI y fragmentos tripticos de una multicistatina de patata (Orr y col., 1994). Por lo tanto sería posible crear plantas transgénicas para el PCI con el fin de conferirles una mayor resistencia a fitófagos, como ya se ha hecho con otros inhibidores de proteasas (Ryan, 1989).

- En el presente trabajo, como se describirá posteriormente, se ha encontrado otra posible aplicación clínica del PCI, de gran transcendencia.

Objetivos

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido el estudio de los efectos del PCI sobre células tumorales, así como el análisis de su mecanismo de acción a nivel celular y molecular, con el fin de determinar su potencial como nuevo fármaco antitumoral.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la acción *in vitro* del PCI sobre el crecimiento de células tumorales de páncreas.
2. Estudiar la acción *in vivo* del PCI sobre tumores implantados en ratones atímicos e inducidos en ratones transgénicos.
3. Caracterizar el mecanismo celular de acción del PCI mediante estudios de internalización del inhibidor y de alteración de la expresión génica en células de cáncer de páncreas.
4. Determinar el mecanismo molecular de acción del PCI mediante estudios de unión y activación de receptores.

Material y Métodos

III.A. OBTENCIÓN DE PCI RECOMBINANTE

III.A.1. EQUIPO Y PRODUCTOS QUÍMICOS EN GENERAL

III.A.1.a. Equipo

Durante la realización del presente trabajo se han utilizado con carácter general los aparatos que se detallan a continuación. Aquellos aparatos empleados sólo para técnicas concretas se citan en los apartados donde se describen las técnicas correspondientes.

Agitadores magnéticos Agimatic-NM (Selecta, España)
Agitador vórtex Technokartell, Tk3S (Selecta, España)
Aparato de ultrafiltración de agua Mono-Q plus (Millipore, EE.UU.)
Autoclave AE-75 (Raypa, España)
Balanzas FY-300 y ER-120A (A&D Co. Salter, Japón)
Baño termostático Tectron S-543 (Selecta, España)
Bloque termostático Tectron-100 (Selecta, España)
Cámara de flujo laminar 2G.9 (Telstar, España)
Centrífuga de eppendorfs 2K15 (Sigma, España)
Centrífuga RC-5B (Sorvall, EE.UU.)
Congeladores -20°C (Aspes y Balay, España) y -80°C (Sanyo, Japón)
Destilador de agua Milli-Ro 6 (Millipore, EE.UU.)
Espectrofotómetro CE6602 (Cecil, Reino Unido)
Estufa de cultivo I-280 (Raypa, España)
Estufa de secado T6030 (Heraeus, R.F.A.)
Fuentes de alimentación para electroforesis modelos G-200 (SBS instruments, España) y EPS 200 (Pharmacia Biotech, Suecia)
Impresora para espectrofotómetro CE6606 (Cecil, Reino Unido)
Incubador de precisión HotCold-UM (Selecta, España)
Lector de microplacas Elx800 (Bio-Tek Instruments Inc., EE.UU.)
Liofilizador HETOLap Equipment (HETO, Dinamarca)
Microondas M704 (Philips, R.F.A.)
pHmetro micropH2000 (Crison, España)
Pipetas automáticas (Finnpipette, Finlandia)
Placas de ELISA modelo 17298 (Nunc, Dinamarca)
Rotovapor (centrífuga de vacío) VR-1/120/240 (HETO, Dinamarca)

III.A.1.b. Productos químicos

Los productos químicos de uso general utilizados han sido reactivos de grado analítico procedentes de las compañías Fluka (Suiza), Merck (R.F.A.), Serva (R.F.A.) y Sigma Chemical Co. (EE.UU.). La procedencia de los productos de uso más específico se indicará a medida que estos aparezcan en el texto.

III.A.2 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

III.A.2.a. Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron para el crecimiento de la cepa bacteriana *E.coli* [pIMAM3] se detallan a continuación:

Medio de cultivo M9CAS

La composición es:

Sales M9x5	200 mL
MgSO ₄ 1 M	2 mL
CaCl ₂ 0.1 M	1 mL
Tiamina 1 M	1 mL
Glicerol 80%	Hasta 0,5% final
Casaminoácidos 20%	Hasta 0,2% final
Agua destilada	Hasta 1 L

Estas siete disoluciones se esterilizan por separado, la tiamina por filtración y el resto mediante autoclavado (120°C, 20 min).

Composición de las sales M9x5 :

Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	32,3 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	2,5 g
H ₂ O	Hasta 1 L.

Una vez mezcladas, la disolución se ajusta a pH 7,4 y se esteriliza en autoclave.

Medio de fermentación

Se utiliza M9CAS, adicionando una serie de oligoelementos (Marino, 1994):

Los oligoelementos son :

oligoelemento	cc. final
MnSO ₄ .H ₂ O	10 µg/L.
CaCl ₂ .6H ₂ O	4 µg/L.
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2 µg/L.
CuCl ₂ .H ₂ O	1 µg/L.
H ₃ BO ₃	0,5 µg/L.
AlCl ₃	1 µg/L.
FeSO ₄ .7H ₂ O	40 µg/L.

III.A.2.b. Cepa utilizada y mantenimiento de la misma

En el presente trabajo la cepa utilizada ha sido:

-*Escherichia-coli* cepa MC 1061(Casadaban y Cohen, 1980) con genotipo: hsd R2, hsd M⁺, hsd S⁺, ara D139, Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X47, gal E15, gal K16, rps L (Str^r), Mcr A, Mcr B1. Esta cepa estaba transformada con el plásmido pIMAM3 de 7250 pb (Figura III.1), dicho plásmido consiste en un gen sintético para el PCI insertado en el vector de expresión pIN-III-ompA-3 (Molina, 1992). La cepa fue suministrada por los Drs. F. X. Avilés y M. A. Molina.

El vector pIN-III-ompA-3 pertenece a la familia de vectores pIN-III-ompA (Ghrayeb y col., 1984), que contienen un gen de resistencia a la ampicilina, el gen del represor *lacI*, un origen de replicación del tipo ColE1 y un promotor *lpp-lacZ*po, inducible por IPTG, que controla la expresión de la secuencia señal de secreción OmpA. Esta es una secuencia de 63 pb que codifica para un péptido señal de secreción detrás del cual hay tres dianas de restricción únicas (*Eco*RI, *Bam*HI y *Hind*III) en las que se insertan los genes foráneos, que quedan fusionados al péptido señal OmpA. Cuando atraviesa la membrana interna de la bacteria y sale al espacio periplásmico el péptido señal es cortado, dejando la proteína recombinante libre. Los tres vectores de la familia pIN-III-ompA varían en el marco de lectura en el que se encuentran las dianas de restricción únicas mencionadas.

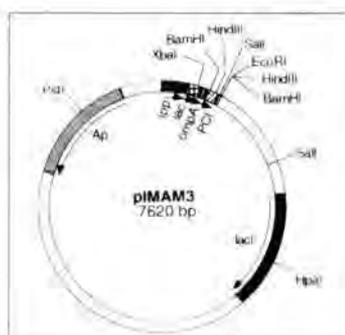


Figura III.1. Mapa del vector pIMAM3. *lpp*, promotor de lipoproteína; *lac*, promotor operador lac; *ompA*, secuencia para el péptido señal OmpA; *PCI*, gen para el PCI-IIa; *lacI*, gen para el represor lac.

Para el mantenimiento de la cepa portadora de pIMAM3 se realizaron glicerizados con medio de congelación.

La composición del medio de congelación x 2 es:

K ₂ HPO ₄	12,6 g
Citrato sódico	0,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,18 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,8 g
KH ₂ PO ₄	3,6 g
Glicerol	88 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Una vez preparado, se autoclava (120°C, 20 min) y se conserva a temperatura ambiente.

III.A.2.c. Condiciones de cultivo de *E.coli* productora de PCI

La cepa de *E. coli* portadora del plásmido pIMAM3 se cultivó en medio M9CAS con 50 µg/mL de ampicilina, utilizando como fuente de carbono glicerol al 0,5%. El crecimiento se realizó a 37°C y con una agitación de 250-300 rpm. Las cepas de *E.coli* [pIMAM3] se conservaron glicerizadas a -70°C. Los glicerizados se realizaron directamente a partir de las colonias obtenidas por transformación de *E. coli* con pIMAM3. Para el crecimiento de estas cepas en medio líquido en primer lugar se inició un cultivo de noche de la cepa deseada, inoculándola a partir de un glicerizado en 1 a 5 mL de M9CAS+Ap. Al día siguiente se inoculó el volumen deseado de M9CAS+Ap fresco con 1/100 de cultivo de noche.

III.A.3. EXPRESIÓN DEL PCI RECOMBINANTE

El PCI recombinante se obtuvo por fermentación discontinua alimentada de la cepa de *E.coli* MC1061[pIMAM3]. El protocolo empleado se detalla a continuación.

III.A.3.a. Preparación de una fermentación

1- Montaje del fermentador

A- Se monta el fermentador (Biostat B, Braun, R.F.A.) tal y como se utilizará (Figura III.2), colocando las botellas y calibradores en la posición de uso. Se comprueba que esté bien cerrado, que los tubos que salen de las botellas de alimentación lleguen bien a las bombas y que los cables que salen de las sondas de pH, O₂, antiespumante etc., lleguen bien hasta el cuerpo del fermentador (donde deberán conectarse).

B- Se llena la camisa externa con agua hasta aproximadamente 3/4 de su capacidad, para conseguir un calentamiento más homogéneo del vaso del fermentador y evitar la rotura del vidrio durante el autoclavado. Se dejan los conductos de entrada y salida de la camisa abiertos, ya que de lo contrario puede explotar con la presión.

C- Se comprueba que los tubos que acaben libres tengan algodón y papel de aluminio en la punta. Deberán estar pinzados con pinzas Hoffman tanto los trozos de goma de conexión, como los que acaben libres, para evitar el escape de medio de cultivo durante el autoclavado.

D- Antes de poner el vaso en el autoclave, se comprueba que las partes eléctricas de las sondas de O₂ y pH estén protegidas.

2- Llenado del fermentador, esterilización y calibrado de las sondas.

A- La sonda de pH se calibra externamente al vaso del fermentador. Ya que el electrodo de pH se sumerge directamente dentro del medio de fermentación (debido a que no tiene una funda que lo separe del medio) se calibra antes de autoclavar. El calibrado resiste el proceso sin sufrir modificaciones, mientras que la sonda de O₂ se calibra después de autoclavar.

B- Se llena el vaso del fermentador con el medio deseado. En este caso se pone a autoclavar juntamente con el vaso, el agua y las sales M9. El resto de componentes del medio se añadirán después del autoclavado. Finalizados estos dos procedimientos, se pone el vaso del fermentador, completamente montado (tal como será utilizado) en el autoclave, para su esterilización. No olvidar dejar un orificio abierto para evitar que explote por exceso de presión, que se cerrará inmediatamente al sacar el vaso del autoclave.

C- Una vez autoclavado, se espera que baje la temperatura para proceder a acabar de llenar el fermentador. Para agilizar este proceso, se puede conectar el vaso al cuerpo del fermentador y proporcionarle agitación y circulación de agua fría por su camisa. Cuando se encuentre alrededor de los 37°C, se añaden bajo campana el resto de componentes del medio. En este caso, mediante este procedimiento, se añade: CaCl, MgSO₄, tiamina, glicerol, casaminoácidos, mezcla de oligoelementos y ampicilina. Si se agregan pocas cosas, se puede hacer "in situ", utilizando un séptum en alguna puerta de la tapa del vaso. En este trabajo se añadió el inductor IPTG por un séptum, inmediatamente antes de empezar la fermentación.

D- Se deja el fermentador toda la noche en las condiciones iniciales de fermentación, es decir en agitación, aireación a 37°C y con las sondas conectadas. Esto permitirá la polarización de la sonda de O₂, que debe estar, como mínimo, ocho horas conectada antes de su utilización. Además, dejar el medio durante toda la noche en estas condiciones permitirá comprobar si ha habido alguna contaminación, ya que si es así se verá el medio opaco y no cristalino (debido al crecimiento de microorganismos).

E- Se calibra la sonda de O₂. Primero se calibra al 0%, bombeando N₂ por el sistema de aireo durante 20-30 min con agitación fuerte (900 rpm). Este tiempo es suficiente para desplazar todo el O₂ contenido en el fermentador. Después se calibra al 100% bombeando aire, también con agitación, y durante el mismo tiempo. El fermentador queda así preparado para iniciar la fermentación. Se prosigue con la inoculación.

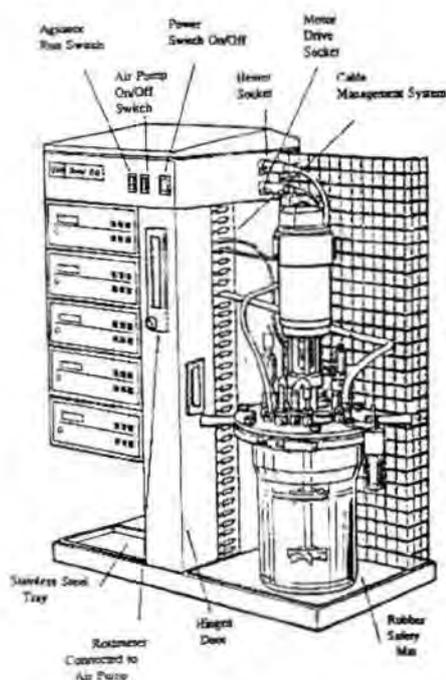


Figura III.2.: Esquema de un fermentador

III.A.3.b. Obtención del inóculo

Para llegar al día de la fermentación con un inóculo adecuado, se debe empezar la preparación con dos días de antelación. Dado que los inóculos se hacen 1/100 para cultivos en erlenmeyers, y 1/10 para inocular al fermentador, el primer día se hace una inoculación (mojando la punta de un asa de Kohl en el glicerinado deseado) en 1,5 mL del medio de cultivo M9CAS + Ap. Se deja crecer toda la noche a 37°C y 300-350 rpm, para tener así el inóculo primario. El segundo día se añade el inóculo primario a un erlenmeyer que contiene 150 mL de medio fresco (inóculo 1/100). Se deja crecer el cultivo o/n en idénticas condiciones. Este es el inóculo secundario. El tercer día se siembra el fermentador con los 150 mL de inóculo secundario. Como que la fermentación que se realiza es de 1,5 L, este contendrá 1350 mL de medio fresco (inóculo 1/10).

III.A.3.c. Fermentación discontinua alimentada

El tipo de fermentación en este trabajo ha sido discontinua alimentada o "fed batch". Esta técnica es esencialmente un cultivo en batch que se alimenta con nutrientes frescos. En este tipo de fermentación hay dos

fases, durante la primera las células crecen hasta agotar los nutrientes del medio inicialmente puestos en el fermentador. Si finalizase aquí, la fermentación sería típicamente un cultivo en batch. Al continuar, se entra en una segunda etapa en la que se deben añadir los nutrientes limitantes del crecimiento, para mantener el cultivo en fase exponencial. Si se deja de suplementar el medio en este punto, el cultivo entrará en fase estacionaria, y posteriormente de muerte. La otra característica fundamental de este tipo de fermentación es la aireación forzosa que se consigue burbujeando oxígeno a presión a través del cultivo. Esta aireación forzosa conjuntamente con el suministro continuo de nutrientes permite la obtención de densidades celulares del cultivo 60 veces superiores a las que se consiguen en un cultivo discontinuo.

Las técnicas de control feedback se clasifican, para este tipo de cultivos, en dos grupos principales: control feedback indirecto, que consiste en seguir parámetros de fermentación que están ligados indirectamente con el sustrato que puede o no ser limitante (como el oxígeno disuelto, cociente respiratorio y pH); y control feedback directo, que consiste en el seguimiento de la concentración del sustrato en el medio de cultivo.

En este trabajo se utilizó la presión de oxígeno como indicador del estado metabólico del cultivo (control indirecto). Así, si las células están limitadas por alguno de los nutrientes, experimentan un descenso de su actividad metabólica, lo que se traduce en un consumo más bajo de oxígeno. Debido a esto, aumenta la presión de oxígeno en el fermentador, y es esto lo que se detecta a través de la sonda. Un ascenso rápido de la presión de O₂ indica que el sustrato limitante, en aquel momento, es la fuente de carbono. Si la presión de O₂ aumenta más lentamente, y cuando se adicionan unas gotas de NH₃ empieza a bajar, es indicativo de que el sustrato limitante, en aquel momento, es la fuente de nitrógeno.

La adición de nutrientes en una fermentación típica se muestra en la Tabla III.1. aunque cada fermentación es diferente de la anterior, y el orden en que se deben añadir los sustratos puede variar, por que cada fermentación debe seguirse para poder tomar en cada momento la decisión adecuada.

Tabla III.1. adición de nutrientes durante una fermentación.

Condiciones iniciales: pH = 7, temp. = 37 °C, agitación = 300 rpm, aire = 6 L/min
Medio = M9CAS + Ap + Oligoelementos + IPTG.

<i>horas de fermentación</i>	<i>adiciones</i>
2,15	CASaa
4,00	glicerol +CASaa
4,25	MgSO ₄ +CaCl + sales M9 + tiamina + Ap
4,45	CASaa
5,00	enriquecimiento del aire con O ₂
10,30	MgSO ₄ + CaCl + sales M9 + tiamina + Ap +glicerol + CASaa + IPTG.
26-30	FINAL

III.A.4. PURIFICACIÓN DEL PCI RECOMBINANTE

La purificación del PCI recombinante se llevó a cabo por centrifugación, seguida de cromatografía atmosférica de fase reversa, FPLC de intercambio aniónico y finalmente HPLC de fase reversa. El proceso de purificación se siguió estimando, después de cada paso, la concentración de proteínas espectrofotométricamente, y la concentración de PCI recombinante por determinación de la actividad inhibitoria de CPA.

III.A.4.a. Obtención de medio extracelular de cultivos por fermentación

El medio procedente de una fermentación se somete al siguiente procedimiento:

1. Se centrifuga a 10.000 x g durante 30 min.
2. Se filtra por 0,8, 0,4 y 0,22 μm sucesivamente. Los filtros utilizados fueron Millex - GV (Millipore, EE.UU.), ya que tienen una baja retención de proteínas.
3. Se concentra por filtración tangencial (Pellicon Millipore, EE.UU.) a través de membranas de tamaño de poro de 1000 Da.

III.A.4.b. Concentración por cromatografía de fase reversa

El medio procedente del paso anterior se concentra nuevamente utilizando columnas "Sep-Pak C₁₈ environmental" (Waters, EE.UU.) de 35 cm³. Estas son columnas de fase reversa ya empaquetadas, que retienen el PCI.

El procedimiento seguido es:

1. Se pretrata la columna pasándole primero 50 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y después 100 mL de agua grado Mono-Q.
2. Se pasa el medio por la columna.
3. Se lava la columna con 100 mL de agua grado Mono-Q.
4. Se lava la columna una vez con 50 mL de acetonitrilo 10% y otra con 50 mL de acetonitrilo 15%, para eliminar proteínas débilmente unidas a la columna.
5. Se eluye el retenido con 50 mL de isopropanol al 30%. Se recoge en tubos de 50 mL.
6. Se evapora el retenido en el rotovapor hasta un volumen aproximadamente 1/10 del inicial. Esta disolución es el material de la etapa 1.

III.A.4.c. FPLC de intercambio aniónico

La columna de intercambio aniónico utilizada fue una TSK-DEAE 5PW de 21,5 x 150 mm (LKB,Suecia). El aparato de FPLC utilizado fue el FPLC System[®] (LKB Pharmacia, Suecia) al que se encuentra acoplado un ordenador Tandon PAC 3865x.

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Tampones de FPLC:

- Tampón A: Tris-acético 20 mM pH 8,5. Se obtiene disolviendo Tris (hidroximetilaminometano) a una concentración 20 mM y ajustando su pH a 8,5 con acético glacial.
- Tampón B: Tris-acético 20 mM pH 8,5 + Acetato amónico 0,8 M. Se obtiene disolviendo el Tris y el acetato amónico a las concentraciones señaladas y ajustando el pH con amoniaco.

Se filtran y desgasifican ambos tampones. Se mide la conductividad del tampón A, que no acostumbra a superar los 400 µS.

2. Se equilibra la columna pasándole tampón A a un flujo de 4 mL/min durante, como mínimo, media hora. Al final del equilibrado el pH y la conductividad, a la salida de la columna, deben ser iguales a los del tampón A.

3. Mientras la columna se está equilibrando se centrifuga el material de la etapa 1 a 10000xg durante 5-10 min. A continuación se añade tampón A hasta 30 mL y se mide su conductividad y pH. Esta no ha de superar los 1500 µS. Si esto sucede hay que diluir el material en tampón A. Respecto al pH, si es inferior a 8,25 hay que subirlo hasta este valor añadiendo NaOH 1 M. Finalmente, se pasa el material por un filtro de 0,22 µm.

4. Se carga el material en la columna y se realiza la cromatografía utilizando el gradiente siguiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
30	100	0
90	80	20
100	0	100
125	0	100
130	100	0

A: Tris-AcOH 20 mM (pH 8,5)
 B: Tris-AcOH 20 mM; AcONH₄ 0,8 M (pH 8,5)
 El flujo utilizado es de 4 mL/min

5. La cromatografía se sigue detectando la A₂₈₀ a la salida de la columna.

6. El pico correspondiente al PCI recombinante se localiza determinando su actividad inhibitoria de CPA. Se reúnen las fracciones con PCI, que constituyen el material de la etapa 2.

El material de la etapa anterior se concentra de nuevo mediante una columna Sep-Pak C₁₈ con la finalidad de reducir su volumen y eliminar las sales. El protocolo seguido es:

1. Se pretrata la columna pasándole primero 50 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y después 100 mL de agua grado Mono-Q.
2. Se pasa el material de la etapa 2 por un filtro de 0,22 µm y a continuación por la columna.
3. Se lava la columna con 100 mL de agua grado Mono-Q.
4. Se eluye el retenido con 50 mL de isopropanol al 30%. Se recoge en tubos de 50 mL.
5. Se evapora el retenido en el rotovapor hasta que queda un volumen muy pequeño, para diluirlo finalmente en 2 mL de H₂O. Esta disolución es el material de la etapa siguiente.

III.A.4.d. HPLC de fase reversa

El último paso de la purificación del PCI recombinante es una cromatografía HPLC de fase reversa. La columna utilizada es una C4 semipreparativa Vydac 214TP1010 (1,0 x 25 cm), que tiene un tamaño de partícula de 10 µm y un diámetro de poro de 30 nm.

El protocolo seguido fue:

1. Preparación de los tampones A y B, que son los siguientes:

- Tampón A: Agua Mono-Q con un 0,1% de TFA.

- Tampón B: Acetonitrilo con un 0,1% de TFA.

Se filtran y desgasifican ambos tampones.

2. Se equilibra la columna con una mezcla 80% A + 20% B a un flujo de 1,4 mL/min al menos durante 20 min.
3. Mientras la columna se está equilibrando se centrifuga el material de la etapa 3 a 10000xg durante 5 a 10 min.
4. Se carga la muestra en la columna y se realiza la cromatografía según el gradiente siguiente:

Tiempo(min)	%A	%B	
0	80	20	
5	80	20	A: H ₂ O + 0,1% TFA
45	60	40	B: CH ₃ CN + 0,1% TFA
50	20	80	El flujo es de 1,4 mL/min
55	20	80	
57	80	20	

5. Se recoge en una fracción el pico del PCI, que aparece hacia los 35 min. Si se desea, se puede comprobar la presencia de PCI mediante determinación de la actividad inhibitoria de CPA, utilizando otras fracciones como control.

6. Se liofiliza la fracción anterior, obteniéndose así el PCI purificado.

III.B. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

III.B.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de la cantidad de proteína total y de PCI presente en las diferentes muestras se utilizaron los protocolos que se describen a continuación.

III.B.1.a. Determinación de la concentración de proteína

Las estimaciones de la cantidad de proteína total se realizaron utilizando una adaptación del método de Bradford (1976), basado en la unión del colorante azul de Coomassie a las proteínas, utilizando albúmina sérica como patrón. La determinación se realiza en placa de ELISA y se lee la absorbencia a 620 nm en lector de microplacas.

III.B.1.b. Determinación de la concentración de PCI recombinante

Para la determinación de la cantidad de PCI recombinante presente en las muestras se utilizaron tres procedimientos: el primero espectrofotométrico, aplicable solo a disoluciones puras de PCI, el segundo basado en la medida de la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A de la muestra, y el tercero por ELISA empleando anticuerpos contra el PCI.

III.B.1.b.1. Absorbencia A 280 nm.

En el caso de soluciones de PCI puras se determina su concentración conociendo que el coeficiente de extinción es $E_{0,1\%} = 3$ (Hass y Ryan 1981).

III.B.1.b.2. Determinación de la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.

El ensayo usado para la determinación de la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A de las muestras fue el descrito por Hass y Ryan (1981), con alguna modificación.

El ensayo es:

1. Se prepara una disolución de benzoil-L-glicil-fenilalanina (hipuril-fenilalanina, sustrato artificial de la CPA) 1 mM en tampón de actividad de CPA (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M)

La hipuril-fenilalanina es un sustrato de alta afinidad para la CPA cuya absorbencia a 254 nm aumenta de forma notable al ser hidrolizado por el enzima, lo que permite seguir el curso de la reacción enzimática.

2. Se prepara una disolución de CPA bovina 0,1 mg/mL en tampón de actividad de CPA diluyendo 2 µL de disolución de CPA 25 mg/mL (Boehringer Mannheim, R.F.A.; conservada a 4°C) en 0,5 mL de tampón de actividad.

3. Se mezcla en una cubeta de cuarzo de 1 mL:

Disolución de hipuril-fenilalanina	1 mL
Disolución de CPA 0,1 mg/mL	20 µL (2 µg CPA)
Muestra	2-50 µL

La cantidad de muestra que se añade en el ensayo depende de la concentración de PCI que se espera esté presente en ésta.

4. Se mezcla invirtiendo la cubeta dos o tres veces después de haber tapado su boca con parafilm, y se sigue inmediatamente la A_{254} en un espectrofotómetro durante 2 min.

Para estimar la cantidad de PCI presente en una muestra mediante este ensayo se debe disponer de una disolución control adecuada que sea lo más parecida posible a la muestra pero que no tenga PCI. Esta disolución control se debe someter al ensayo utilizando el mismo volumen que se utilizará de muestra. La cantidad de PCI presente puede entonces estimarse de la forma siguiente:

1. Se calculan las pendientes de las rectas de A_{254} frente al tiempo (min) obtenidas en los ensayos del control y la muestra.

2. Se calcula el porcentaje de inhibición de la actividad CPA producido por la muestra según la fórmula.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Pendiente control} - \text{Pendiente muestra})}{\text{Pendiente control}}$$

3. Se calcula la concentración de PCI en la muestra según la fórmula:

$$\text{Conc. PCI } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\% \text{ Inh}}{100} \times \frac{2 \mu\text{g CPA}}{35250 \mu\text{g CPA}/\mu\text{mol}} \times \frac{1 \mu\text{mol PCI}}{1 \mu\text{mol CPA}} \times \frac{4295 \mu\text{g PCI}}{1 \mu\text{mol PCI}} \times \frac{\text{Vol. utilizado (mL)}}{\text{Vol. muestra (mL)}}$$

Hay otras sustancias, además del PCI, que pueden producir una cierta inhibición de la CPA. Así, la utilización de controles incorrectos puede producir errores en estas estimaciones. Durante este trabajo se han utilizado diferentes tipos de control según la muestra de que se tratara:

- Fracciones de los diferentes pasos de purificación: tanto para los picos de FPLC y HPLC se utiliza como control una fracción de tiempo anterior al correspondiente al pico de PCI.

- Soluciones de PCI puras: se utiliza como control agua destilada.
- Determinaciones de actividad inhibitoria de medio de cultivo con PCI: se utiliza el mismo medio de cultivo proporcionado a las células, durante el mismo tiempo, al cual no se había añadido PCI.

III.B.1.b.3. Ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA)

Se realiza utilizando anticuerpos purificados anti-PCI (Molina, 1993). Se determina la respuesta de diluciones de PCI de concentración conocida. A continuación se realizan curvas-patrón con los datos de éstas a partir de las cuales se interpolan las concentraciones de PCI en las muestras. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Se prepararan diluciones de PCI de concentración conocida en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,6). Dichas diluciones se preparan a partir de una disolución de PCI cuya concentración se estima por medición de la A_{280} y por determinación de la actividad inhibitoria de CPA. Las diluciones de PCI utilizadas habitualmente van de 5 a 200 ng/mL (200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 y 5 ng/mL).

La preparación del tampón carbonato es como sigue:

a) Se prepara la llamada disolución A disolviendo 2,756 g de Na_2CO_3 en 130 mL de agua destilada, y la llamada disolución B disolviendo 6,217 g de NaHCO_3 en 370 mL de agua destilada. Dichas disoluciones pueden almacenarse a temperatura ambiente.

b) Se prepara el tampón carbonato mezclando 26 mL de A con 74 mL de B y 100 mL de agua destilada. Se mide su pH, que ha de ser muy próximo a 9,6.

2. Se preparan diluciones de las muestras en tampón carbonato-bicarbonato. Dichas diluciones son 1/10 y 1/100 ó 1/100 y 1/1000 según las concentraciones de PCI esperadas en las muestras.

3. Incubación del antígeno: se colocan 100 μL de las diluciones patrón y de las muestras en pocillos de una placa de ELISA. Es conveniente poner todas las diluciones por duplicado. Se mantiene al menos 1 h a 37°C en una cámara húmeda.

4. Lavados: se elimina el exceso de la disolución de antígeno de la placa de ELISA por decantación. Se lavan los pocillos tres veces con "Saline Tween". En cada lavado, se llenan los pocillos con dicha disolución y luego se vacían por decantación. Tras el último lavado, se seca la placa golpeándola contra papel "Trapicel".

El "Saline Tween" se prepara diluyendo 1/10 en agua destilada una disolución x10 cuya composición es:

NaCl	90 g
Tween 20 (BioRad)	5 mL
Agua destilada	1 L

Esta disolución puede conservarse a temperatura ambiente.

5. Bloqueo de los lugares libres: Se añade a cada pocillo 100 μL de una disolución de BSA al 1% en tampón PBS-Tween. Se incuba 1 h a 37°C en cámara húmeda.

El tampón PBS se prepara diluyendo 1/5 en agua destilada una disolución PBSx5 cuya composición es:

NaCl	40,908 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,67 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,72 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Se ajusta a pH 7,2 con ácido fosfórico o NaOH.

El tapón PBSx1 es NaCl 140 mM; Na_2HPO_4 7,5 mM; NaH_2PO_4 2,5 mM.

El PBS Tween se prepara añadiendo al tampón PBS un 0,05% de Tween 20.

6. Se decanta el PBS Tween de los pocillos de la placa de ELISA.

7. Incubación de los anticuerpos: Se añaden a los pocillos 100 μL de una dilución adecuada en PBS Tween de los anticuerpos (o antisuero) dirigidos contra el antígeno utilizado. Se incuba 1 h a 37°C en cámara húmeda. En nuestro caso se emplea una dilución 1/2000 de los anticuerpos anti-PCI purificados.

8. Lavados: Se procede como en 4.

9. Incubación del conjugado: Se añade a los pocillos una dilución 1/2000 en PBS Tween de conjugado GAR-Po ("goat anti-rabbit peroxidase", Nordic, Holanda). Este consiste en anticuerpos de cabra contra la porción F_c de anticuerpos de conejo unidos químicamente al enzima peroxidasa. Se incuba a 37°C durante 1 h en cámara húmeda.

10. Lavados: Se procede como en 4. Asegurarse que al final los pocillos de la placa de ELISA están bien secos, de lo contrario pueden obtenerse resultados extraños.

11. Revelado: Se añade a cada pocillo 100 μ L de disolución reveladora (sustrato colorimétrico de la peroxidasa). Se incuba en cámara húmeda a 37°C el tiempo necesario para que los pocillos adquieran color, para lo que en general basta con 5 a 10 min.

La preparación de la disolución reveladora es como sigue:

a) Se prepara tampón fosfato 0,1 M pH 7, cuya composición es:

KH ₂ PO ₄	5,3 g
NaH ₂ PO ₄	8,65 g
H ₂ O	Hasta 1 L

b) Se preparan 500 mL de una disolución de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreto monohidrato (MBTH) 1,8 mM en tampón fosfato 0,1 M pH 7. Para ello se disuelven 210 mg de MBTH en 400 mL de tampón fosfato, se lleva el pH a 6,25 con clorhídrico concentrado y se agita 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añade tampón fosfato hasta 500 mL, se ajusta a pH 6,25 con HCl y se filtra a través de un filtro Whatman n°1. Se mide la A_{285} de una dilución 1/10 de la disolución y se calcula la concentración de MBTH en la misma sabiendo que la DO_{285} de una dilución 1/10 de una disolución 1,8 mM ha de ser 0,930. La disolución se alicuota y se congela a -20°C, conservándose a oscuras pues es fotosensible.

c) Se prepara una disolución de ácido 3-dietilaminobenzoico (DMAB) en tampón fosfato 0,1 M pH 7. Para ello se disuelven 6 g de DMAB en 160 mL de tampón fosfato, se lleva a pH 7 con NaOH 5 M y se agita 1 h a temperatura ambiente ajustando periódicamente el pH. A continuación se lleva a 200 mL con tampón fosfato, se ajusta el pH a 7 y se filtra. Finalmente se mide la A_{305} de una dilución 1/200 de la disolución, que debe ser 1,29; y se alicuota la disolución, conservándose a -20°C.

d) Se prepara la disolución reveladora inmediatamente antes de usarla mezclando:

Disolución de DMAB 180 mM	2,35 mL
Disolución de MBTH 1,8 mM	9,3 mL
PBSx1	6 mL
H ₂ O ₂ 30%	6,8 μ L

En el caso de que las disoluciones de DMAB y/o MBTH tuvieran molaridades diferentes a las descritas se usan los volúmenes de las mismas adecuados para lograr idéntica molaridad final en la disolución reveladora, a la vez que se modifica el volumen de PBS añadido para que el volumen final de disolución reveladora sea el mismo.

12. Paro de la reacción: Se añaden a cada pocillo 40 μ L de una disolución de H₂SO₄ 2 M.

13. Medida de las absorbencias: Se determina la absorbencia de cada pocillo a 620 nm usando un lector de microplacas.

En los ELISAs realizados se destinaron siempre cuatro pocillos a blancos: en uno se añadió antígeno y luego anticuerpo, pero no conjugado. En otro anticuerpo y conjugado, pero no antígeno; en un tercero antígeno y conjugado pero no anticuerpo; y en el último antígeno, suero control de un conejo sin inmunizar y conjugado. Dichos pocillos se tomaron como blancos a la hora de determinar la A_{620} de los demás.

Con los datos de A_{620} de los pocillos con concentraciones conocidas de PCI se obtuvo una curva patrón que se ajustó según una regresión logarítmica y gracias a la cual se interpoló la concentración de PCI en las muestras a partir de la A_{620} de los pocillos que contenían éstas.

III.C. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

III.C.1 EQUIPOS Y MATERIAL BÁSICO

Campana de cultivo de flujo laminar Cultair Bio 48M (Cultek, España)

Centrifuga de tubos Digicen-R (ALRESA, España)

Citómetro de flujo: EPICS-752 Flow Cytometer (Coulter Electronics Inc, EE.UU.)

Criotubos de 1,8 mL (Nunc, Dinamarca)

CytoFluor™ 2300/2350 Fluorescence Measurement System (Millipore, EE.UU.)

Equipo de nitrógeno líquido (Abelló Oxígeno Linde, España)

Frasco Roux de cultivo de plástico estériles de 75, 150 y 300 mL (Nunc, Dinamarca)

Hemocitómetro (Afora, España)
Incubador de CO₂ Biocenter 2001 (Salvis, Suiza)
Microscopio invertido de contraste de fases (Zeiss, R.F.A.)
Microscopio óptico (Zeiss, R.F.A.)
Placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Nunc, Dinamarca)
Placas de cultivo de 24 y 96 pocillos (Costar, EE.UU.)

III.C.2. MEDIOS Y DISOLUCIONES

Azul de tripano (Merck, R.F.A.)
BCECF-AM (Molecular Probes, Inc., EE.UU.)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) líquido (Sebak, R.F.A.)
DMSO (Dimetil Sulfoxido) (Sigma, España)
EBSS (Eagle's Balance Salt Solution) con EDTA
EGF (R&D, EE.UU.)
Eosina (Merck, R.F.A.)
Gentamicina 50 mg/mL (Sebak, R.F.A.)
FBS (Foetal Calf Serum) (Sebak, R.F.A.)
Hematoxilina de Delafield (Merck, R.F.A.)
Insulina (Boheringer Mannheim, R.F.A.)
Yoduro de propidio (Boheringer Mannheim, R.F.A.)
Kit EZ4U (Biomedica, Austria)
Medio de montado (Merck, R.F.A.)
Piruvato 100 mM (Sebak, R.F.A.)
RNasa A (Boheringer, R.F.A.)
RPMI-1640 líquido (Sebak, R.F.A.)
Tripsina en polvo (Difco, R.F.A.)

PREPARACIÓN DE MEDIOS Y DISOLUCIONES

BCECF-AM: (2',7'-bis-(2-carboxi-etilo)-5-(6) carboxifluoresceína, aminóxido-metilo éster): se prepara resuspendiendo 100 µg de dicho reactivo en 10 µL de DMSO que se añaden a 12 mL de medio (DMEM+ 10%FBS).

EBSS: 0,4 g de KCl, 6,8 g de NaCl, 2,2 g de NaHCO₃, 0,14 g de NaH₂PO₄-H₂O, 1 g de D-glucosa y 0,2 g de EDTA en 1 L de agua destilada. La mezcla se esteriliza por filtración (Embudo Nalgene, EE.UU.) con un filtro de 0,22 µm de baja adsorción de proteínas (Gelman, R.F.A.)

Eosina: 1 g de eosina en 100 mL de H₂O destilada. Una vez preparada se añaden unas gotas de ácido acético.

Hematoxilina de Delafield: primero se preparan las disoluciones A (4 g hematoxilina, 25 mL alcohol absoluto) y B (40 g sulfato aluminico amónico en 400 mL de H₂O destilada). Se mezclan y al cabo de 4 o 5 días se filtran y se añaden 100 mL de glicerina y 100 mL de alcohol metílico. Pasados 4 o 5 días más se filtra y ya se puede utilizar.

Medio incompleto: DMEM o RPMI (200 mL) + piruvato 0,5 mM (1 mL de una disolución 100 mM) + gentamicina 50 µg/mL (0,2 mL de una disolución 50 mg/mL) + L-glutamina 4 mM (4 mL de una solución 200 mM).

Medio completo con suero bovino: Medio incompleto + 10% FBS.

Medio de congelación: DMEM o RPMI + 20% FBS + 10% DMSO.

Disolución de fijación de las células: etanol 70% a -20°C.

Disolución de yoduro de propidio: yoduro de propidio (PI) 50 µg/mL y ribonucleasa 20 µg/mL.

Disolución de tripsina: 0,5 g de tripsina en polvo, 0,2 g de EDTA, 8 g NaCl, 400 mg KCl y 350 mg de citrato sódico en 1 L de agua destilada. La mezcla se esteriliza por filtración (Embudo Nalgene, EE.UU.) con un filtro de 0,22 μm de baja adsorción de proteínas (Gelman, R.F.A.).

Tampón CMFH-Tripsina-EDTA: 7,54 g/L NaCl, 0,37 g/L KCl, 0,0478 g/L Na_2HPO_4 , 0,084 g/L NaHCO_3 , 0,9 g/L glucosa (dextrosa), 5,96 g/L HEPES, tripsina concentración final 0,0025% y EDTA concentración final 2 mM. Dicha disolución se tampona con NaOH a pH 7,4; y posteriormente se filtra bajo campana con un filtro de 0,22 μm .

Tampón PBS. Su composición es la siguiente: NaCl 140 mM; Na_2HPO_4 7,5 mM; NaH_2PO_4 2,5 mM. Su pH se ajusta a 7,5 con NaOH o ácido fosfórico.

Medio sin suero (DMEM - FBS): se prepara mezclando 200 mL de DMEM, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM, 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%.

Medio libre de suero (SFM): se prepara mezclando 200 mL de DMEM, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM, 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%, transferrina a una concentración final 5 $\mu\text{g/mL}$ y selenito sódico a una concentración final 5 ng/mL.

Disolución de EGF: se prepara una disolución 100 $\mu\text{g/mL}$ de EGF en 10 mM ácido acético-0,2%BSA, que se esteriliza por filtración. Posteriormente se realiza una dilución 1:10 de la disolución madre también en 10 mM ácido acético-0,2%BSA. Se conserva alicuotada a -80°C .

Disolución de insulina: se prepara una disolución stock de insulina 10 mg/mL en agua milliQ, que se esteriliza por filtración. Las diluciones posteriores se realizan en PBS-0,1%BSA. Se conserva alicuotada a -80°C .

III.C.3. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

III.C.3.a. Líneas comerciales (ATCC)

A431: línea de carcinoma epidermoide ATCC N° CRL 1555. Establecida por Giard y col. (1973) a partir de un carcinoma epidérmico de vulva de una mujer de 85 años de edad.

B16F10: El melanoma B16 es un tumor muy indiferenciado que se aisló en los laboratorios Jackson (Maine, EE.UU.) en 1954, de un tumor subcutáneo espontáneo surgido en un ratón de la cepa C57BL/6J. Partiendo de esta línea primitiva, I.J. Fidler obtuvo en 1972, mediante implantes reiterados por vía intravenosa de las células tumorales obtenidas de los focos metastásicos pulmonares, variantes celulares con diferente potencial metastásico. De este modo seleccionó una línea celular con mayor capacidad metastásica que se conoce como B16F10 (Fidler y Nicolson, 1976)

HIT: línea transformada de insulinoma de hámster ATCC N° CRL 1777. Establecida por Santerre (Santerre y col., 1981) a partir de un cultivo primario de islotes de Langerhans de hámster tipo Syrian, que fueron transformados con SV40.

Capan-1 : línea de adenocarcinoma pancreático humano, ATCC (American Type Culture Collection) N° HTB-79. Establecida por Fogh y col. (1977a y b) a partir de una metástasis en hígado de un adenocarcinoma pancreático de un hombre de 40 años blanco con tipo sanguíneo A+. La morfología de las células es de tipo epitelial, la citopatología *in vitro* determinó un adenocarcinoma de células muy diferenciadas. En ratones atímicos las células desarrollan adenocarcinomas similares a carcinomas pancreáticos de células ductales.

PANC-1: línea de adenocarcinoma pancreático humano poco diferenciada ATCC N° CRL 1469. Establecida por Lieber y col. (1975) a partir de un carcinoma pancreático de origen ductal de un hombre blanco de 56 años de edad.

III.C.3.b. Líneas procedentes del M.D. Anderson Cancer Center

MDAPanc-3: línea de adenocarcinoma pancreático humano. Establecida por Olivé (Frazier y col., 1990) a partir de una metástasis en hígado de un adenocarcinoma pancreático moderadamente diferenciado localizado en la cabeza del páncreas de un paciente blanco de 52 años.

III.C.3.c. Líneas establecidas por el grupo

IBF-CP3: línea de adenocarcinoma pancreático humano. Establecida por E. Fernández (Fernández, 1994). Esta línea deriva de una biopsia de un adenocarcinoma de cabeza de páncreas. La paciente de 54 años presentaba metástasis hepáticas. La anatomía patológica permitió clasificar el tumor como adenocarcinoma mucosecretor moderadamente diferenciado con marcada reacción desmoplásica del estroma.

iCAII-2: línea de insulinooma de ratón. Establecida por E. Fernández. Esta línea deriva del insulinooma de un ratón transgénico para una secuencia de la anhidrasa carbónica y la región codificadora del antígeno T de SV40.

III.C.4. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

III.C.4.a. Mantenimiento del cultivo

Las células de las líneas utilizadas se cultivan rutinariamente en medio completo con 10% de suero fetal bovino (FBS) en frascos Roux de cultivo estériles. Los frascos se mantienen en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 87% de humedad. Se dejan crecer las células hasta un 90% de confluencia, cambiando el medio según las necesidades del cultivo (cada 3-5 días). Una vez obtenida la monocapa se tripsinizan las células para realizar nuevos subcultivos, y si se desea para congelar una parte en N₂ líquido.

Las cantidades de medio añadidas según el tamaño del frasco utilizado son:

- Frasco de 25 cm³ : 5 mL de medio.
- Frasco de 75 cm³ : 15 mL de medio.
- Frasco de 150 cm³ : 30 mL de medio.

III.C.4.b. Tripsinización

El proceso de tripsinización incluye los siguientes pasos (cantidades utilizadas en el caso de frascos de 25 cm³):

1. Se retira el medio del frasco.
2. Se limpian las células con 1 mL de EBSS durante 1 min. Se retira la disolución salina. Este lavado permite eliminar los restos de medio con suero que queden en el cultivo y favorecer el proceso de desanclado de las células del frasco al añadir EDTA.
3. Se añaden al frasco 0,5 mL de tripsina y se coloca en el incubador, hasta observar al microscopio invertido que las células empiezan a desengancharse (adoptan una morfología redonda y refringente), normalmente basta 1 o 2 min. Para acabar de desengancharlas se da un golpe seco al frasco. La reacción se para añadiendo al frasco 1 mL de medio completo.
4. Se recoge el medio con las células y se centrifuga en un tubo cónico estéril a 1500 rpm durante 10 min.
5. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el sedimento en seco, se añade 1 mL de medio nuevo y se siembran nuevos frascos.

III.C.4.c. Recuento directo

El procedimiento para realizar el recuento y así conocer la viabilidad y el número de células en cualquier momento del cultivo incluye los siguientes pasos:

1. Tripsinización de las células según lo descrito el apartado III.C.4.b.
2. Una vez resuspendidas las células en 1 mL de medio, se toma una alícuota de 10 µL y se coloca en un eppendorf. Se añaden 10 µL de azul de tripano y se mezcla. Se toman 10 µL de la mezcla y se depositan en un hemocitómetro. Las células vivas se observan como esferas refringentes y claras,

mientras que las muertas se observan como opacas y teñidas de azul, ya que el colorante sólo es capaz de penetrar en las células muertas.

3. Se cuenta el total de células de la zona W del hemocitómetro bajo el microscopio invertido, diferenciando las vivas de las muertas. Las células contadas se convierten en células por mL multiplicando la cifra obtenida por 1×10^4 (factor de corrección de volumen) y por 2 (factor de la dilución hecha para el recuento). La viabilidad se calcula dividiendo el número de células vivas por el total de células contadas y multiplicando por 100.

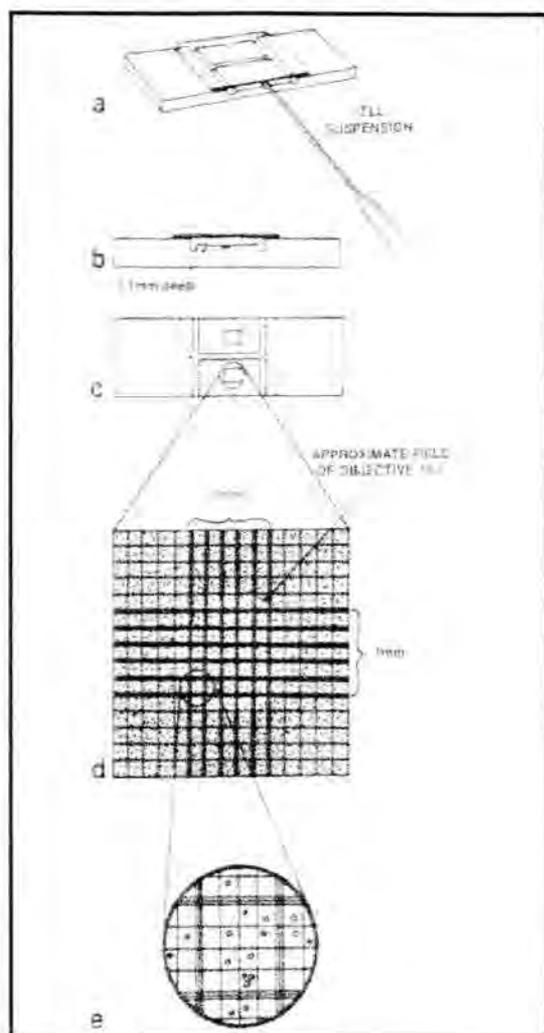


Figura III.3.: Hemocitómetro

III.C.4.d. Congelación y descongelación

Una vez las células se han tripsinizado y centrifugado (apartado III.C.4.b) se puede proceder a su congelación. Se deshace el sedimento en seco y se añade el medio de congelación (apartado III.C.2) a 4°C (el medio de congelación contiene DMSO, este producto hace que el citoplasma se comporte como un gel durante la congelación, lo que evita la formación de cristales que podrían romper las células). Todo el proceso de congelación se realiza manteniendo los tubos y el medio en hielo, ya que el DMSO es tóxico para las células a temperaturas más elevadas.

Se recoge este medio con las células y se guarda en alícuotas de 1 mL en criotubos. El proceso de congelación utilizado incluye los siguientes pasos:

1. El criotubo se mantiene 1 h a -20°C .
2. Se deja al menos una noche a -80°C en una caja de poliestireno.
3. Se guarda en N_2 líquido (-196°C).

El proceso de descongelación de las células es el siguiente: se sacan las células de N₂ líquido y se descongelan rápidamente en un baño a 37°C, una vez se ha deshecho el hielo se recoge el medio con las células y se coloca en un tubo de centrifuga estéril de 15 mL. Se añade gota a gota medio completo (a 4°C) al tubo, agitando enérgicamente después de añadir cada gota para homogeneizar la mezcla. Se añade medio de cultivo hasta un volumen de 6 mL. Este proceso es necesario para diluir de manera lenta el DMSO que contienen las células. Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se deshace en seco. Se añade medio de cultivo y se colocan las células en un frasco nuevo.

III.C.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR EL PCI

Con la finalidad de determinar si la presencia de PCI en el medio de cultivo puede producir algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las diferentes líneas celulares (apartado III.C.3.) se han utilizado diferentes procedimientos para determinar la proliferación relativa en presencia o ausencia de PCI. También se ha analizado si el efecto producido por el PCI implica cambios en las fases del ciclo, o si induce citotoxicidad de forma inespecífica sobre las células.

III.C.5.a. Disoluciones de PCI para incorporar a los cultivos

El PCI liofilizado se disuelve en agua grado Mono Q y se determina su concentración espectrofotométricamente. El coeficiente de extinción del PCI es $E_{0,1\%} = 3$ (Has y Ryan, 1981). La concentración de PCI se corrobora por actividad inhibitoria de CPA.

Posteriormente el PCI se disuelve en medio completo con 10 % FBS hasta obtener una concentración que nos permita incorporar al cultivo la concentración que queremos.

La disolución de PCI se filtra, en condiciones estériles, a través de filtros de 0,22 µm, de baja retención de proteínas (Nalgene, EE.UU.).

III. C.5.b. Efectos del PCI sobre el crecimiento celular

Se realizaron diferentes análisis para determinar el crecimiento celular relativo en presencia de PCI: recuento directo del número de células y determinación indirecta de las mismas mediante sales de tetrazolio. También se estudió el efecto del tratamiento prolongado con PCI sobre el crecimiento celular.

III.C.5.b.1. Recuento directo del número de células mediante hemocitómetro

En este ensayo, con el fin de determinar si la presencia de PCI en el medio de cultivo produce algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares estudiadas, se calcula el número final de células en presencia y en ausencia de inhibidor. El cálculo se realiza por tripsinización y posterior recuento directo del número de células en un hemocitómetro.

El procedimiento detallado es el siguiente:

1. En tres frascos de cultivo de 25 cm² se siembran 5×10^5 células en cada uno y se añade un volumen total de medio de cultivo de 5 mL:
 - Un primer frasco es el control, y no se le añade PCI.
 - A un segundo frasco se le añade PCI unas horas después de iniciado el cultivo, una vez que las células se han adherido al fondo del frasco. Este tipo de ensayo se define como de **post-adhesión**.
 - A un tercer frasco se le añade PCI en el mismo momento de inicio del cultivo, antes de que las células hayan tenido tiempo de adherirse al fondo de frasco, constituyendo el ensayo de **pre-adhesión**.
2. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 5% de CO₂. El medio contenido en los frascos se cambia cada 3-4 días. Al frasco control se le añade medio libre de PCI y a los otros dos medio con PCI.
3. Cuando el cultivo de uno de los frascos llega a la situación de monocapa (o bien tras un número determinado de días) se procede a contar el número de células en cada uno de ellos. Para ello, en primer lugar se tripsinizan las células y posteriormente se determina su número (apartado III.C.4.c).

Los ensayos se realizaron con 2 concentraciones diferentes de PCI, 5 y 10 µg/mL. Billings y col. (1989) habían utilizado una concentración de 5 µg/mL en ensayos de transformación celular inducida por

radiación, y habían observado un efecto de inhibición. Además, esta concentración no resultaba tóxica para las células (Billings y col., 1989), por lo que se decidió emplearla en los ensayos. Con la finalidad de ver si podía haber una relación dosis-efecto se duplicó dicha concentración.

El efecto que produce la presencia de PCI en el medio se expresa como % de inhibición del crecimiento celular, que se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ Inh.} = 100 - \left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas control} - \text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas frasco con PCI}}{\text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas control}} \times 100 \right)$$

El efecto de la presencia del PCI también se puede expresar como el % de crecimiento celular relativo a los controles (sin PCI), que se calcula:

$$\% \text{ Crec.} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas control} - \text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas frasco con PCI}}{\text{N}^{\circ} \text{ cél. vivas control}} \times 100$$

Se realizaron ensayos de proliferación celular por recuento del número de células con las líneas MDAPanc-3, IBF-CP3 y HIT.

III.C.5.b.2. Ensayo de proliferación por determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio

En este ensayo, con el fin de determinar si la presencia de PCI en el medio de cultivo produce algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares, se evaluó la cantidad final de células tras un número determinado de días, en presencia y en ausencia de inhibidor. El número final de células se determinó mediante sales de tetrazolio (kit EZ4U), que al ser añadidas a los cultivos son reducidas por enzimas mitocondriales de las células, a derivados de formazán, cuyo color es distinto. La cantidad de derivados formados depende del número de células presentes.

El protocolo detallado que se siguió fue:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se siembran 48 con 5000, 2000 o 500 células por pocillo, según la línea celular. De estos 48 pocillos:
 - En 8 (control) se añaden 200 μL de medio completo sin PCI.
 - En 8 se añaden 200 μL de medio completo con 0,1 μg PCI/mL
 - En 8, medio completo con 1 μg PCI/mL
 - En 8, medio completo con 10 μg PCI/mL
 - En 8, medio completo con 50 μg PCI/mL
 - En 8, medio completo con 200 μg PCI/mL
2. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 5% de CO₂. El medio contenido en los pocillos se cambia cada 3-4 días. El medio viejo se aspira con una pipeta automática. A los pocillos control se les añade medio libre de PCI y a los otros medio con idéntica concentración de PCI a la que tenían previamente.
3. Tras un determinado número de días, se evalúa el número de células por pocillo mediante el siguiente procedimiento:
 - 3.1. Se aspira el medio de cultivo de cada pocillo, y se lavan todos ellos con 200 μL de tampón PBS a 37°C, que se retira. Este paso se realiza dos veces.
 - 3.2. Se añaden a cada pocillo 200 μL de PBS fresco. Se colocan también 200 μL de PBS en tres pocillos que no tengan células (que son los blancos).
 - 3.3. Se coloca en cada pocillo 20 μL de disolución de sustrato (sal de tetrazolio). Se incuba de 2 a 5 h a 37°C.
 - 3.4. Se agita la placa, y se lee la absorbencia a 450 y a 620 nm de cada pocillo. La A₄₅₀ indica la cantidad de derivados de formazán aparecidos, la A₆₂₀ la presencia de desechos celulares.

Para calcular el resultado del ensayo, se procede como sigue: de la A₆₂₀ de cada pocillo se sustrae la media de las A₆₂₀ de los blancos. A continuación, de la A₄₅₀ de cada pocillo se resta el resultado de la

sustracción anterior, así como la media de la A₄₅₀ de los blancos. El resultado así obtenido es directamente proporcional a la cantidad de células presentes en el pocillo. A continuación se obtiene la media y la desviación típica de los resultados de los pocillos sometidos a idéntico tratamiento.

El efecto de la presencia del PCI se puede expresar como el porcentaje de crecimiento celular relativo a los controles (sin PCI), que se calcula sencillamente:

$$\% \text{ Crec.} = \frac{\text{Media resultados pocillos control} - \text{Media resultados pocillos con PCI}}{\text{Media de resultados control}} \times 100$$

Se realizaron ensayos de proliferación celular por determinación indirecta del número de células con las líneas: Capan-1, Panc-1, A431 e iCAII-2.

III.C.5.b.3. Determinación de la curva de crecimiento de la línea celular Capan-1 en presencia y ausencia de PCI

Uno de los aspectos más importantes para seguir el efecto del PCI sobre las líneas celulares, es la realización de curvas de crecimiento. A partir de ellas se pueden determinar tres parámetros importantes: el tiempo de latencia, el tiempo de duplicación, y la densidad de saturación en monocapa. Estos tres datos indican cómo la presencia de PCI afecta al crecimiento celular.

La curva de crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 se determinó cultivando las células en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. Se emplearon placas de seis pocillos, cada uno con 10 cm² de superficie. El número de células sembrado inicialmente por pocillo fue de 1×10^5 , y se realizaron cambios de medio cada cuatro días, añadiendo PCI nuevo en el medio en el caso de las células tratadas con PCI.

Se determinaron tres curvas de crecimiento: en ausencia de PCI, y en presencia de PCI a concentraciones de 1 µg/mL, y de 10 µg/mL. Inicialmente se siembran 45 pocillos-réplica para cada tratamiento. Durante 15 días, se toman diariamente tres de los pocillos-réplica de cada tratamiento y se cuenta su número de células mediante tripsinización y recuento empleando hemocitómetro (apartado III.C.4.b y III.C.4.c.). El recuento de los primeros frascos nos permite determinar el tiempo de latencia, los siguientes se encuentran en la fase exponencial y el resto en la de saturación. Con estos datos se construye una gráfica de número de células en función del tiempo (días).

III.C.5.b.4. Estudios del efecto del tratamiento prolongado con PCI sobre el crecimiento celular

Se realizaron diversos experimentos para determinar el efecto del tratamiento prolongado con PCI sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales. Las líneas celulares analizadas han sido Capan-1 e iCAII-2.

En el caso de la línea Capan-1 se realizaron 2 tipos de ensayos diferentes que se describen a continuación:

a) Ensayos de proliferación:

1. Se siembran dos pocillos de una placa de 12 con 5000 células. Uno de los pocillos se crece con medio (células no pretratadas), y el otro con medio con 50 µg/mL de PCI (células pretratadas). Las células se mantienen en dichas condiciones durante el tiempo que se indica en la sección de resultados como tiempo de pretratamiento.

2. Dos veces por semana el medio de los pocillos se reemplaza por medio fresco con o sin PCI, y cada vez que en alguno de los pocillos se alcanza confluencia, las células se tripsinizan y 1/10 de las mismas se vuelve a sembrar en el pocillo originario, el resto de células se descarta o congela.

3. Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento deseado, las células se tripsinizan, se cuentan, y se emplean para iniciar ensayos de proliferación como los descritos en el apartado III.C.5.b.2. El número de células que se siembra por pocillo en la placa de proliferación (de 96 pocillos) es de 2000, sembrándose 7 réplicas para cada tratamiento. Las células se someten entonces a tratamiento con distintas concentraciones de PCI, o bien a la ausencia del mismo.

4. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se estima el número de células por pocillo como se ha descrito en el apartado III.C.5.b.2.

b) Curva de crecimiento

Se obtienen las curvas de crecimiento de células Capan-1 pretratadas con PCI, así como de células no pretratadas. El protocolo empleado es idéntico al descrito para los ensayos de proliferación, con la particularidad de que se siembran el mismo día y empleando las mismas células cinco placas de 96 pocillos distintas, que se revelan a los 3, 6, 9, 13 y 17 días.

En el caso de la línea iCAII-2 sólo se llevaron a cabo ensayos de proliferación. Estos se realizan de forma idéntica a lo descrito en el caso de Capan-1, con la única diferencia que el número de células que se siembra por pocillo en la placa de 96 es de 500 en lugar de 2000, ya que el tiempo de duplicación de la línea iCAII-2 es inferior al de la línea Capan-1.

III.C.5.b.5. Estudio del efecto del PCI sobre la proliferación celular inducida por el EGF y la insulina

Se realizaron ensayos como los del Apartado III.C.5.b.2. con la principal diferencia de que las células se hicieron crecer en medio sin suero fetal bovino durante los días del ensayo. Estos fueron estudios a tiempo corto, 72h, y de competencia con un factor de crecimiento más el PCI. Los factores de crecimiento estudiados fueron dos, el EGF y la insulina. El protocolo seguido fue el mismo para los dos factores y lo único que varió fue la concentración utilizada de cada uno de ellos, 10 ng/mL y 5 µg/mL respectivamente, para el EGF y la insulina. Estos ensayos se realizaron con la línea Capan-1.

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se siembran 5000 células por pocillo en 36 de ellos. Las células se siembran en medio completo (DMEM+ 10%FBS).

2. Después de 72h, tras haber permitido la adhesión de las células a la superficie del pocillo así como la división de las mismas, se retira el medio de los pocillos y para eliminar los restos de suero se añaden 200 µL de PBS a cada pocillo.

3. Se retira el PBS y se añaden 200 µL de DMEM sin FBS.

4. Después de 24h se retira el medio y se aplican los siguientes tratamientos:

- En 6 pocillos (control): se añaden 200 µL de medio libre de suero (SFM).

- En 6 pocillos se añadieron 200 µL de SFM más PCI a una concentración final de 50 µg/mL.

- En 6 pocillos se añaden 200 µL de SFM con una concentración final 10 ng/mL de EGF o 5 µg/mL de insulina.

- En 6 pocillos se añaden 200 µL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCI a una concentración final de 50 µg/mL.

5. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂.

6. Tras 72 horas, se evalúa el crecimiento celular por pocillo, según el procedimiento detallado en el protocolo del apartado III.C.5.b.2.

III.C.5.c. Efectos del PCI sobre otros procesos celulares

Se determinó si el efecto que produce el PCI es citotóxico o citostático. También se analizó como afecta el inhibidor a la distribución de las fases del ciclo celular

III.C.5.c.1. Citotoxicidad

Con el fin de establecer si el efecto inhibitor del crecimiento producido por el PCI es debido a que induce citotoxicidad de forma inespecífica, o si el efecto es específico, y provocada por la alteración de algunos procesos celulares, se realizó un ensayo de citotoxicidad "in vitro" del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1.

El ensayo de citotoxicidad se basa en la utilización de dos fluoróforos: la BCECF-AM y el yoduro de propidio. El primero se emplea como marcador de células viables debido a que penetra rápidamente en el citoplasma celular donde es fragmentado por la acción de las esterasas, y se convierte en una molécula fluorescente. Estas esterasas son sólo activas cuando la células están vivas. El yoduro de propidio es un

derivado del fenantreno que se une específicamente a la estructura polinucleotídica de los ácidos nucleicos intercalándose entre sus pares de bases. Debido a su estructura iónica no puede penetrar en las células vivas, pero sí en las muertas, y marca DNA y RNA. El ensayo consiste en poner en contacto las células con el PCI y seguir la viabilidad y mortalidad durante 24 h; se considera que un producto es citotóxico si, a una determinada concentración, produce una disminución de la viabilidad respecto a las células control (no tratadas con dicho producto) que conlleva un aumento de la mortalidad.

El procedimiento que se siguió fue:

En una placa de 24 pocillos se siembra cada uno de ellos con 160.000 células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Se dejan en el incubador durante 24 h, tiempo suficiente para que las células estén completamente adheridas a la superficie, y en ese momento se inicia el ensayo.

1. Se lee la absorbencia de la placa con un citofluor. El citofluor es un fluorímetro diseñado especialmente para la lectura de fluorescencia en células. Tiene un control por ordenador que permite utilizar varias combinaciones de filtros de excitación-emisión a la vez. En nuestro caso se utiliza un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 530 y 645 nm. Estos filtros permiten detectar la fluorescencia de los dos reactivos utilizados para el ensayo de citotoxicidad, la BCECF-AM y el yoduro de propidio. Esta primera lectura, 24 h después de sembrar las células, corresponde a la autofluorescencia de las células, que luego se resta al valor final de fluorescencia.

2. A continuación se incuban las células con la BCECF-AM durante 30 min a 37°C. La cantidad de BCECF-AM que se añade a cada pocillo es de 500 µL de la disolución descrita en el apartado III.C.1.

3. A continuación se lee la absorbencia de la placa. Esta medida corresponde a la fluorescencia total.

4. Se lava la placa dos veces con medio (DMEM + 10% FBS). Estos lavados permiten eliminar la fluorescencia que no ha sido incorporada por las células.

5. Se añaden 200 µL de medio a cada pocillo con las diferentes concentraciones de PCI a ensayar, se realizan cuadruplicados de cada concentración ensayada. En nuestro caso son de 0, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 45 µg/mL, 60 µg/mL, 75 µg/mL. Al mismo tiempo se añaden 50 µL de yoduro de propidio a cada pocillo, para tener una concentración final de dicho producto 2 µM.

6. Lectura de la placa. Esta lectura corresponde al tiempo 0 y a partir de este momento se realizan lecturas cada hora mientras dura el ensayo.

Una vez obtenidos todos los valores de intensidad de fluorescencia (I.F.) a los diferentes tiempos se calcula el valor real de fluorescencia debido a la BCECF-AM y el yoduro de propidio mediante la siguiente fórmula:

$$I.F. = I.F. \text{ a un determinado tiempo} - I.F. \text{ autofluorescencia de las células}$$

III.C.5.c.2. Análisis por citometría de flujo de la distribución de las fases del ciclo celular

La metodología de la citometría de flujo permite realizar histogramas de contenido de DNA a partir del cual se puede estimar el porcentaje de células que están en cada una de las fases del ciclo celular: G₁/G₀, S y G₂/M (Ormerod y Kubbies, 1992).

La finalidad de este experimento fue determinar si el tratamiento con PCI de las células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 produce alguna variación en la distribución de las fases del ciclo celular.

A continuación se detalla el procedimiento que se siguió para realizar los estudios de citometría flujo:

1. Se siembran 1×10^6 células en frascos de 75 cm² (3 frascos para cada tratamiento). Se realizan: un tratamiento control sin PCI y seis tratamientos con 50 µg/mL de PCI a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 7 y 12 días.

2. Después del tratamiento se lavan dos veces las células con la disolución de lavado.

3. Se procede a desenganchar las células añadiendo 1 mL del tampón CMHF-Tripsina-EDTA por frasco. La reacción se para con 2 mL de medio completo por frasco.

4. Se centrifugan las células durante 5 min a 1500 rpm.

5. Se lavan nuevamente las células 2 veces con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺. En el último lavado se descarta el sobrenadante.

6. Se resuspende el sedimento de células en 200 μL de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , se le añaden 2 mL de etanol al 70% a -20°C . Es necesario que la adición sea lenta y vaya acompañada de una ligera agitación, para evitar la formación de agregados de células. En este punto se pueden guardar las células a 4°C hasta el momento de pasarlas por el citómetro de flujo, siendo el tiempo mínimo de fijación de 2 h.

7. El día del análisis por citómetro, se centrifugan las células durante 5 min a 1500 rpm y a 4°C .

8. Se lava dos veces el sedimento de células con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

9. Se tiñen las células durante 15 min a 37°C con 1 mL de la disolución de yoduro de propidio.

10. Se pasan las células por el citómetro de flujo, excitándolas con un laser de 488 nm, lo que permite detectar la fluorescencia roja de los complejos DNA-yoduro de propidio.

La citometría de flujo permite determinar el porcentaje de células en la fases del ciclo celular: G_1/G_0 , S y G_2M . Así se puede comparar esta distribución para cada uno de los tratamientos realizados.

III.D. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA

III.D.1. MARCADO DEL PCI CON RITC

Con el fin de averiguar si el PCI es incorporado por las células, y seguir su posible localización dentro de las mismas una vez internalizado, se procedió al marcado fluorescente de la molécula de PCI. El fluoróforo escogido fue el RITC (Rhodamine B isothiocyanate, figura III.4.), pues se ha descrito que el complejo que forma con proteínas es más estable que el formado por otros fluoróforos (Billings y col., 1989). El RITC reacciona selectivamente con aminas a través de su grupo isotiocianato. Así, puede reaccionar con el grupo amino libre del extremo N-terminal o bien con los grupos amino de las lisinas 10 y 13 de la molécula del PCI (I.D.2.a), dando complejos relativamente estables a la excitación por la luz, con un espectro de absorción y emisión no muy sensible al pH, y excitables a 546 nm.



Figura III.4.: RITC

El protocolo de marcado fue el descrito por Billings y col.(1989), ligeramente modificado:

1. Se disuelven 2 mg de PCI, purificado según el apartado III.A.4., en tampón bicarbonato sódico 0,5 M pH 9,2 hasta una concentración final 1 mg/mL (disolución A).

2. Se disuelven 0,4 mg de RITC (SigmaAldrichQuímica S.A., España) en agua grado Mono-Q hasta una concentración 1 mg/mL (disolución B).

3. Se mezclan las disoluciones A y B a temperatura ambiente durante 3 h en una plataforma giratoria, siempre protegiéndolas de la luz.

4. Se centrifuga a $2000 \times g$ durante 1 min para que precipite el material insoluble.

5. Para eliminar el RITC libre no unido al PCI se pasa la muestra por una columna de gel filtración PD-10 (Sephadex G-25 M, Pharmacia, Suecia), según el siguiente protocolo:

5.1. Se equilibra la columna con 25 mL de agua grado Mono-Q.

5.2. Se añade la muestra en un volumen que no supere los 2,5 mL.

5.3. Se eluye el RITC-PCI con 4 mL de agua grado Mono-Q.

5.4. El RITC libre se eluye después de pasar 10 mL. más de agua por la columna.

III.D.2. DETERMINACIÓN DEL PCI MARCADO

La cantidad de RITC unida al PCI se determina espectrofotométricamente, a partir del coeficiente de extinción del RITC a 560 nm que es de $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}$.

La cantidad de PCI marcado se determina mediante una prueba de inhibición de la actividad carboxipeptidasa A, en la que se usa como control la disolución de RITC libre que se obtiene de la columna PD-10. No se puede determinar la concentración espectrofotométricamente a 280 nm porque el RITC tiene anillos aromáticos que absorben fuertemente a dicha longitud de onda.

III.D.3. INCORPORACIÓN DEL RITC-PCI A LOS CULTIVOS CELULARES

En los estudios de incorporación del RITC-PCI se sigue el protocolo de Billings y col. (1989), ligeramente modificado:

Disoluciones:

- Disolución de RITC-PCI.
- Disolución de fijación: 50% metanol - 50% acetona.
- PBS- Glicerol (1:1, v:v).

Protocolo:

1. Se ponen a crecer 200.000 células de la línea a estudiar en cámaras de cultivo (Lab-Tek Tissue culture chamber/slide, Nunc, Dinamarca) y se dejan crecer durante 48 h.
2. A las células creciendo en fase exponencial se les cambia el medio y en el nuevo medio se añade RITC o RITC-PCI, manteniendo este durante 1 a 4h dentro del incubador.
3. Se retira el medio después de la incubación y se lava la monocapa de células con PBS durante 10 min a oscuras.
4. Se fijan las células con 350 μL de una disolución 50% metanol - 50% acetona durante 8 min a 4°C en una cámara oscura y húmeda.
5. Se lavan de nuevo las células con PBS durante 10 min a oscuras.
6. Se secan las preparaciones con papel absorbente y con mucho cuidado de no tocar las células. Se montan las preparaciones con PBS : glicerol y se sellan con laca de uñas.
7. Se observan al microscopio de fluorescencia, si la observación no es inmediata se mantienen las preparaciones a 4°C y a oscuras.

En las preparaciones se distinguen diferentes tipos de incubación:

- Muestras control:

- a- La monocapa de células se incuba con la disolución de RITC eluida de la columna PD-10 para comprobar si hay una internalización y/o unión inespecífica del fluoróforo a las células.
- b- Se añade el RITC-PCI a la placa donde no hay células creciendo para ver si se adhiere inespecíficamente a la placa.
- c- Se realiza todo el proceso sin añadir en ningún momento el RITC-PCI ni el RITC para ver si las propias células presentan fluorescencia al irradiarlas con la luz de excitación del fluoróforo.

- Muestras problema:

La monocapa de células creciendo se incuba con la disolución de RITC-PCI, a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación.

III.E. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DETECCIÓN DE RNA MENSAJEROS

Poder aislar moléculas de RNA intactas es esencial para analizar la expresión génica. La principal dificultad en el aislamiento del RNA es que las ribonucleasas, que son enzimas producidos por las células y los microorganismos presentes en la piel y en el material de laboratorio, degradan rápidamente el RNA. El primer paso en la extracción de RNA implica, pues, la lisis celular en un ambiente químico que provoque la desnaturalización de las ribonucleasas. El RNA se separa entonces del resto de macromoléculas celulares. La transferencia tipo Northern permite determinar la cantidad y el tamaño de cualquier RNA mensajero mediante la utilización de sondas de DNA marcadas radiactivamente.

La transferencia tipo Northern se utilizó para estudiar el efecto del PCI en la expresión de ciertos genes en líneas tumorales.

III.E.1. SONDAS UTILIZADAS

a) β_2 Microglobulina

Sonda obtenida por PCR a partir de DNA genómico humano. Se obtuvo usando los siguientes cebadores:

B2M-N901-920/5: TTAGCTGTGCTCGCGCTACT

B2M-N3999-3980: TAACCACAACCATGCTTAC

que se diseñaron a partir del gen de la β_2 microglobulina. La sonda resultante tiene 940 pb. (Güssow y col., 1987)

b) p53

Sonda obtenida a partir de la retrotranscripción de mRNA de células humanas. El fragmento de 1760 pb se insertó en las dianas *Sal I* y *EcoRI* en el plásmido pUC8. El plásmido es resistente a ampicilina. (Harlow y col., 1985).

c) Tripsina

Sonda obtenida a partir del mRNA del tripsinógeno I de páncreas de rata. El inserto de aproximadamente 700 pb, pcXP4-78, se clonó en la diana *Pst I* del vector pBR322. El plásmido presenta resistencia a la tetraciclina pero no a la ampicilina (McDonald y col., 1982).

III.E.2. MARCADO RADIOACTIVO DE LAS SONDAS. PURIFICACIÓN DE LA SONDA MARCADA

El protocolo seguido para el marcado de las sondas con ^{32}P es el descrito por Feinberg y Volgestein en 1983, que se detalla a continuación.

Disoluciones:

- Disolución TM: 250 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl_2 , 50 mM β -mercaptoetanol pH 8.
- Disolución DTM: dATP, dTTP y dGTP 100 μM en disolución TM.
- Disolución OL: 1mM Tris y 1mM EDTA pH 7,5 + 90 unidades /mL de oligodeoxirribonucleótidos.
- Disolución LS: 1 M HEPES pH 6,6 : DTM : OL (25:25:7). Almacenar alícuotas a -20°C .
 - Disolución de paro: 10 mM EDTA, 1% SDS.
- Tampón NET: 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,6.
- BSA Fracción V (Boehringer Mannheim, R.F.A.) 10 mg/mL.
- (α - ^{32}P) dCTP 3000 Ci/mmol, 10,0 mCi/mL (Amersham, EE.UU.).
- DNA polimerasa (Klenow) (Boehringer Mannheim, R.F.A.)
- t-RNA (Serva, R.F.A.) 10 mg/mL.
- Sefadex G-100 pureza para Biología Molecular (Pharmacia, Suecia).
- Disolución de centelleo (Cytoscint TM, ICN Biomedicals Inc., EE.UU.)
- Acetato sódico 2 M pH 5,0.

Protocolo:

1. Se ponen entre 50 y 100 μCi de ^{32}P -dCTP en un eppendorf (5 μL). Se secan en rotovapor 10 min. Se añaden 5,7 μL de LS y 1 μL de BSA.
2. Se pipetea 75 ng de sonda en un eppendorf y se llevan a 6,6 μL con agua estéril. Se hace un orificio en la tapa del eppendorf y se hierve durante 3-5 min. Se enfría en hielo.
3. Se añade la sonda al eppendorf con ^{32}P -dCTP, LS y BSA.
4. Se adiciona 1 μL de DNA polimerasa (Klenow), se mezcla el contenido con agitación suave y se centrifuga unos segundos. Se mantiene de 3 h a toda la noche a temperatura ambiente.
5. Se añaden 25 μL de disolución de paro y 5 μL de t-RNA.
6. Se separa la sonda marcada del ^{32}P -dCTP libre en una columna de Sephadex G-100 de 5 mL en tampón NET preparada en una pipeta de 10 mL de plástico estéril. Se carga la mezcla de reacción y se eluye con tampón NET. Se recogen 10 fracciones de 0,5 mL.

7. Se toman 10 μL de cada fracción y se añaden 2 mL de disolución de centelleo, se mezcla y se lee en el contador de centelleo.

8. Se recoge el primer pico radiactivo, se añaden 50 μL de acetato sódico 2 M pH 5 y 1 mL de etanol a cada eppendorf. Se mantiene a -80°C durante al menos 30 min.

9. Se centrifuga en minifuga 15 min. Se descarta el sobrenadante, se seca el sedimento y se resuspende en 100 μL de TE.

10. Se mezclan 5 μL de cada eppendorf con 2 mL de disolución de centelleo y se leen las muestras en el contador de centelleo. Se estima el número de cuentas por μL .

III.E.3. PURIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO poli (A+)

III.E.3.a. Almacenamiento de las células

Para la extracción de RNA mensajero de células en cultivo se precisan como mínimo las monocapas de 10 frascos de 75 cm^3 , lo que corresponde a unas 6×10^7 células. La extracción puede realizarse a partir de sedimentos celulares de frascos acabados de tripsinizar, o bien a partir de sedimentos congelados a -80°C . Es conveniente poner en cada tubo cónico las células correspondientes a un frasco y medio como máximo. Se almacenaron sedimentos de células tratadas con 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI durante 12 días y células control que crecieron durante los mismos días en ausencia de PCI.

III.E.3.b. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA es preciso ser extremadamente cuidadoso pues cualquier pequeña contaminación de RNAsa degradará toda la muestra. Por ello es necesario trabajar siempre con guantes limpios, autoclavar todo el material de plástico y utilizarlo solamente para extracción de RNA, lavar el material de vidrio con NaOH 1 N y enjuagarlo con agua destilada estéril y tratada con dietilpircarbonato al 0.1 % (DEP) (Sigma, U.S.A), y finalmente tratar todas las soluciones acuosas con DEP al 0.1 % durante al menos 6 h en agitación y autoclavar posteriormente (al autoclavar el DEP se elimina).

Método del tiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi., 1987)

Disoluciones:

- Disolución de Stock: 250 mg de tiocianato de guanidinio (Promega, EE.UU.), 293 mL de dH_2O estéril, 17,6 mL de citrato sódico 0,75 M pH 7, se añaden 26,4 mL de sarcosil al 10% a 65°C . Se esteriliza por filtración y se mantiene en la oscuridad.

- Disolución D: es una mezcla de 0,36 mL de 2-mercaptoetanol por cada 50 mL de disolución de stock (Tiocianato de Guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, sarcosil 0,5 % y 2-mercaptoetanol 0,1 M).

- Cloroformo: alcohol isoamilico (49:1).

- Fenol saturado con agua.

- Acetato sódico 2 M pH 4 tratado con DEP y esterilizado.

- SDS 0,5% tratado con DEP o bien EDTA 1 mM pH 8 tratado con DEP y estéril.

Protocolo:

1. Se utilizan células frescas o bien congeladas.
2. Se añade 1 mL de disolución D a cada tubo cónico y se agita con vórtex durante 2 min.
3. Se añaden 0,1 mL de acetato sódico 2 M pH 4. Se agita 5 segundos.
4. Se adiciona 1 mL de fenol. Se agita 5 segundos.
5. Se añaden 0,2 mL de la mezcla de cloroformo: alcohol isoamilico. Se agita 10 segundos. Se mantiene en hielo 15 min.
6. Se centrifuga en Sorvall SS-34 a 10000 rpm durante 20 min a 4°C .
7. Para precipitar el RNA se pasa la fase acuosa a un tubo nuevo y se añade 1 volumen de isopropanol en hielo (o bien se adicionan 2 volúmenes de etanol frío). Se agita 10 segundos y se deja a -20°C durante una hora.
8. Se centrifuga a 10000 rpm a 4°C durante 20 min. Se elimina el sobrenadante.
9. Se reprecipita el RNA como sigue: se disuelve el sedimento de RNA en 0,3 mL de disolución D. Se transfiere a un eppendorf y se precipita con 1 volumen de isopropanol (o doble volumen de etanol). Se agita con vórtex 10 segundos y se mantiene 1 h a -20°C .

10. Se centrifuga en minifuga a 4°C durante 10 min. Se descarta el sobrenadante.
11. Se lava el sedimento con 0,5 mL de etanol frío al 75%. Se centrifuga en minifuga a 4°C durante 10 min. Se descarta el sobrenadante y se seca en rotovapor 15 min.
12. Se disuelve el sedimento en 50 µL de SDS 0,5% a 65°C y se mantiene a esta temperatura durante 10 min. También se puede disolver en EDTA 1 mM pH 8.

III.E.3.c. Electroforesis con ácido cítrico

La concentración de RNA total obtenido se calcula como sigue: se toman 5 µL de muestra y se diluyen en 0,5 mL de dH₂O tratada con DEP. Se lee la absorbencia a 260 nm en cubetas de cuarzo tratadas con NaOH 1N y lavadas con dH₂O autoclavada y tratada con DEP. Se estiman 50 µg de RNA total por cada unidad de densidad óptica.

Para comprobar la calidad del RNA extraído, se somete éste a electroforesis en geles de urea y ácido cítrico (Frazier y col., 1983). Como equipo de electroforesis se empleó el modelo Sub-cell (Bio-Rad, EE.UU.).

Disoluciones:

- Agarosa de baja electroendósmosis (Boehring Mannheim, R.F.A.).
- Urea 10 M.
- Citrato 0,25 M pH 3,5: 48,03 g de ácido cítrico, 10 g NaOH, llevar a 1 L.
- Tampón de carga: 5 mL de citrato 0,25 M, 39 mL de urea 10 M, 10 g de sacarosa y 25 mg de azul de bromofenol, llevar a 50 mL con agua.
- Disolución de bromuro de etidio 10 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 7,6 (Boehring Mannheim, R.F.A.).

Protocolo:

1. Se prepara un gel de agarosa al 2%: 2 g de agarosa, 60 mL de urea 10 M, 10 mL de citrato 0,25 M y 30 mL de agua destilada. Se funde la agarosa en microondas y se prepara el gel tal y como se indica a continuación:

Preparación del gel:

1. Se pesa la cantidad necesaria de agarosa y se introduce en un erlenmeyer.
 2. Se añade agua destilada (el volumen de agua añadido debe ser igual al volumen final del gel menos el volumen de tampón concentrado que se añadirá) y se lleva a ebullición para fundir la agarosa. Si se trata de geles al 2% es preferible llevar a ebullición tres veces consecutivas.
 3. Se agita de 2 a 5 min. Es importante asegurarse de que toda la agarosa está fundida, es decir, que no queden partículas de la misma en el fondo del frasco.
 4. Se añade el tampón concentrado, se agita de nuevo y se deja enfriar hasta que la temperatura se sitúe por debajo de los 50°C.
 5. Mientras la agarosa se enfría, se prepara el molde para el gel poniendo cinta adhesiva en sus extremos (que son abiertos), situándolo en la cubeta y colocando el peine formador de bolsillos. Dejar 0,5 a 1 mm entre el fondo del bolsillo y la base del gel. Asegurarse con un nivel de que el conjunto está perfectamente horizontal.
 6. Se vierte la agarosa en el molde. Asegurarse de que no queden burbujas en el interior del gel.
 7. Se deja solidificar. La solidificación es tanto más rápida cuanto más concentrado es el gel.
 8. Una vez el gel está solidificado, se quita la cinta adhesiva de los extremos.
2. Se cargan entre 3 y 5 µg de RNA total por pocillo en un volumen de 20 µL. Se añaden 30 µL de tampón de carga.
3. Para la electroforesis se prepara 1 L de tampón de electroforesis: 100 mL de citrato 0,25 M y 900 mL de agua. Se coloca el tampón en la cubeta, teniendo cuidado de que el gel no esté sumergido y que el tampón en ambos lados de la cubeta no entre en contacto.
4. Se corre el gel a 100 V hasta que el azul de bromofenol haya recorrido una distancia de unos 5 cm.
5. Se tiñe el gel entre 15 y 30 min con 5 µg/mL de bromuro de etidio en el tampón de electroforesis. Se elimina con agua el exceso de BrEt. Se visualiza en transiluminador de UV y se fotografía.

III.E.3.d. Obtención de RNA poli (A+)

En la obtención de RNA poli (A+) es necesario extremar los cuidados para evitar la contaminación por ribonucleasas ya que en ningún paso se suministran inhibidores de ribonucleasa. Así pues es necesario trabajar con material recién esterilizado, guantes y soluciones tratadas con DEP y esterilizadas.

Magneto-esferas

El sistema de aislamiento de RNA poli (A+) con magneto-esferas (PolyATtract mRNA Isolation Systems, Promega, EE.UU.) permite aislar mRNA en 45 min partiendo de RNA total sin utilizar columnas de oligo (dT) celulosa, lo que elimina los problemas que este método conlleva. El sistema utiliza un cebador de oligo (dT) biotinado que hibrida en disolución a una alta eficiencia con la región 3' poli (A+) presente en la mayoría de los mRNA maduros de eucariotas. Los híbridos son capturados y lavados en condiciones de alta astringencia utilizando partículas paramagnéticas (PMP) unidas a estreptavidina y un soporte magnético. El mRNA se eluye de la fase sólida mediante la simple adición de agua estéril libre de ribonucleasa. Los pasos se indican en la figura III.5.

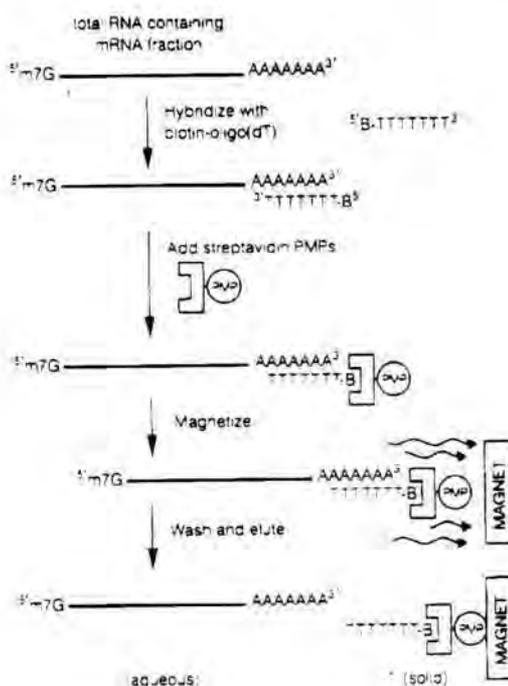


Figura III.5.: Diagrama del proceso de aislamiento de mRNA mediante el uso de magneto-esferas.

Disoluciones:

- 20 x SSC : 87,7 g de NaCl, 44,1 g de citrato sódico, 500 mL de dH₂O. Ajustar el pH a 7,2 con NaOH. Tratar con DEP y esterilizar.

Protocolo:

1. En un tubo estéril se pipetea entre 0,1-1 mg de RNA total y se llevan hasta un volumen de 500 µL con agua libre de ribonucleasa. Se coloca el tubo en un bloque térmico a 65°C durante 10 min.
2. Se añaden 3 µL del cebador oligo (dT) biotinado y 13 µL de 20 x SSC. Se mezcla suavemente y se incuba a temperatura ambiente hasta que la muestra se enfríe completamente (unos 10 min). Se preparan 1,2 mL de 0,5 x SSC estéril (30 µL de 20 x SSC y 1,17 mL de agua) y 1,4 mL de 0,1 x SSC estéril (7 µL de 20 x SSC y 1,393 mL de agua).
3. Se resuspenden las PMP-estreptavidina suavemente hasta que estén completamente dispersas en el tubo y se capturan en el soporte magnético hasta que todas las partículas estén en el lateral del tubo (30 segundos). Se retira el sobrenadante con una pipeta con mucho cuidado (no centrifugar las

partículas).

4. Se lavan las PMP-estreptavidina tres veces con $0,5 \times \text{SSC}$ (0,3 mL por lavado) resuspendiendo las partículas en la disolución, capturando las PMP con el soporte magnético y retirando con cuidado la disolución con ayuda de una pipeta.

5. Se resuspenden las partículas magnéticas en 0,1 mL de $0,5 \times \text{SSC}$. Se añade el contenido de la reacción de hibridación. Se incuba a temperatura ambiente 10 min.

6. Se capturan las PMP utilizando el soporte magnético y se elimina el sobrenadante con cuidado sin tocar las partículas. Se conserva el sobrenadante de RNA hasta estar seguros que el mRNA se ha unido al cebador de oligo (dT).

7. Se lavan las partículas cuatro veces con $0,1 \times \text{SSC}$ (0,3 mL por lavado) igual que en el paso 4. En el lavado final, se elimina la totalidad de la fase acuosa.

8. Para eluir el mRNA, se resuspende el sedimento de partículas paramagnéticas en 0,1 mL de agua libre de ribonucleasa. Se capturan las PMPs en el soporte y se transfiere el mRNA eluido a un eppendorf estéril. Se repite la elución volviendo a resuspender las partículas en 0,15 mL de agua. Se reúne éste mRNA con el anterior (volumen total 0,25 mL). Si en el proceso se ha arrastrado alguna partícula, se elimina por centrifugación. Se determina la concentración por lectura a 260 nm en cubetas de cuarzo libres de ribonucleasa.

III.E.4. TRANSFERENCIA TIPO NORTHERN

La transferencia tipo Northern permite determinar la cantidad y el tamaño de un RNA mensajero específico en preparaciones de RNA poli (A)⁺ (Alwine y col., 1977). El RNA se separa mediante un gel desnaturante de agarosa y formaldehído, y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Thomas, 1980) o nylon (Bresser y Gillespie, 1983). El tamaño y cantidad de un RNA específico se determina por hibridación del RNA de la membrana con una sonda de DNA marcado.

III.E.4.a. Geles desnaturantes de agarosa y formaldehído

Disoluciones:

- Tampón de elución $\times 10$ (MOPS): 41,8 g de MOPS, 4,1 g de acetato sódico, 40 mL de EDTA 250 mM, dH₂O hasta 1 litro, ajustar a pH 7 con NaOH. Se filtra y se mantiene en la oscuridad.

- Disolución de desnaturación para muestras: 0,72 mL de $10 \times \text{MOPS}$, 3,6 mL de formamida 98%, 1,17 mL de formaldehído 37% y 0,5 L de dH₂O. Se filtra. Se prepara disolución nueva cada 3 meses.

- Tampón de carga: 1 mL de $10 \times \text{MOPS}$, 2,5 g de ficoll, 5 μg de azul de bromofenol, dH₂O hasta 10 mL.

Protocolo:

1. Se prepara el gel como sigue: se pesan 1,87 g de agarosa, se añaden 24 mL de tampón de elución $10 \times$ y 168,8 mL de dH₂O. Se lleva a ebullición en microondas hasta que toda la agarosa esté fundida. Se enfría hasta 60°C y se adicionan 39,2 mL de formaldehído al 37% en campana extractora, se mezcla. Se coloca la agarosa en un equipo Maxi-Protean (Bio-Rad, EE.UU.) con vidrio pequeño esmerilado (33x16 cm) y pinza de 10 pocillos. Se deja polimerizar el gel durante 1 h.

2. Preparación de las muestras: Se colocan en un eppendorf 20 μg de RNA poli (A⁺) disuelto en agua. Se secan las muestras en rotovapor y posteriormente se añaden 5 μL de agua libre de ribonucleasa, se preparan los marcadores de RNA (5 μL) como el resto de las muestras. Se adicionan 20 μL de disolución de desnaturación de muestras. Se calientan a 60°C en un baño durante 15 min y a continuación se enfrían en hielo. Se añaden 10 μL de tampón de carga.

3. Se preparan 3 litros de tampón de elución y se monta el equipo de electroforesis. Se cargan las muestras con ayuda de una pipeta automática. Se corre la electroforesis a 70-80 V durante 3 h aproximadamente.

4. Se saca el gel del equipo y se trata en una estufa a 65°C con dH₂O tratada con DEP (previamente mantenida a 65°C) durante 30 min para eliminar el formaldehído que contiene el gel.

5. Se corta el bolsillo correspondiente a los marcadores de peso molecular y se tiñe durante 20 min con bromuro de etidio. Se destiñe toda la noche y se fotografía.

III.E.4.b. Transferencia

Disoluciones:

- 20 x SSC (apartado III.E.3.d).

Protocolo:

1. Se corta un filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schwell, R.F.A.) del tamaño del gel, tres trozos de papel Whatman nº1 del mismo tamaño y dos trozos de 33x16 cm.
2. Se prepara 1 litro de 10 x SSC. Se sumergen los filtros en la disolución. Se prepara la transferencia según el esquema de la Figura III.6. Se coloca en la bandeja la disolución 10 x SSC, encima el soporte y los 2 papeles Whatman cuyos extremos deben llegar hasta el fondo de la bandeja. Se pone el gel encima y sobre éste el filtro de nitrocelulosa; se eliminan las burbujas entre el gel y el filtro con ayuda de una pipeta. Se colocan encima los tres papeles Whatman eliminando las burbujas cada vez, y sobre éstos se depositan servilletas de papel. Se envuelve la parte inferior en papel transparente para evitar evaporaciones y se pone un peso de aproximadamente 300 g sobre el papel.
3. Se deja transferir toda la noche.

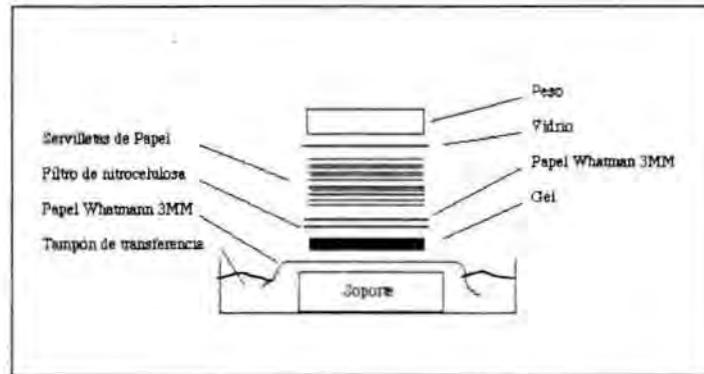


Figura III.6. Esquema de la transferencia

III.E.4.c. Fijación del RNA al filtro

En el caso de filtros de nitrocelulosa el proceso a seguir es: se saca el filtro de la transferencia y se seca sobre papel de filtro. A continuación se coloca en un horno de vacío a 80°C durante 2-4 h. El filtro se puede guardar de esta forma hasta su utilización envuelto en papel de filtro.

III.E.4.d. Prehibridación

Disoluciones:

- 20 x SSPE: 179 g de NaCl, 27,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, 7,4 g EDTA, y dH_2O hasta 500 mL. Se trata con DEP y se autoclava.
- 50 x Disolución Denhardtts: 5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de BSA fracción V, y dH_2O hasta 500 mL. Se trata con DEP. Se alicuota y se congela.
- Disolución de prehibridación: 1 g de glicina, 1 mL de SDS 20%, 25 mL de 20 x SSPE y 10 mL de 50 x disolución denhardtts. Llevar a 100 mL con dH_2O tratada con DEP. Preparar justo antes de su uso.

Protocolo:

Se coloca el filtro en una bolsa de hibridación. Se añaden 50 mL de la disolución de prehibridación por filtro. Se eliminan las burbujas y se sella la bolsa herméticamente. Se deja incubar en un baño a 42°C con agitación toda la noche.

III.E.4.e. Hibridación

Disoluciones:

- 20 x SSPE (apartado III.E.4.d.)
- 50 x disolución denhardtts (apartado III.E.4.d.)
- tRNA: 10 mg tRNA (Serva, R.F.A.) por mL de agua tratada con DEP.
- Disolución de hibridación: 0,1 g de glicina, 2,5 mL de 20 x SSPE, 0,1 mL de SDS 20%, 0,5 mL de 50 x disolución denhardtts, 0,25 mL de tRNA (10 mg/mL), 4,5 mL de formamida y 2,05 mL de agua libre de ribonucleasa. Se prepara justo antes de su uso.

Protocolo:

1. Se saca el filtro de la bolsa y se coloca sobre papel Whatman para eliminar los restos de disolución de prehibridación. Se deja el filtro en el papel 5-10 min como máximo y se mete en una bolsa de hibridación nueva.

2. Se prepara la disolución de hibridación. Se toma 1×10^7 cpm de la sonda marcada (apartado III.E.2.) por filtro, se colocan en un eppendorf, se hace un agujero en el tapón y se hierva durante 3 min. Se enfría rápidamente en hielo. Se añade la sonda a 3 mL de disolución de hibridación.

3. Se añade la disolución con la sonda desnaturalizada a la bolsa que contiene el filtro. Se eliminan las burbujas con ayuda de una pipeta con extremo cuidado ya que la disolución es radiactiva. Se sella la bolsa.

4. Se incuba en un baño con agitación a 42°C toda la noche.

III.E.4.f. Lavados

Disoluciones:

- 20 x SSC (apartado III.E.3.d.)
- SDS 20%.

Protocolo:

1. Se saca el filtro de la bolsa con cuidado y se coloca sobre papel Whatman para eliminar los restos de disolución de hibridación. Se pone el filtro en una bandeja en agitación para proceder a los lavados.

2. Lavados:

a) 2 x SSC (50 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5 mL SDS 20%) en 500 mL. Se incuba 5 min a temperatura ambiente. Se repite una vez más.

b) 1 x SSC (25 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5 mL SDS 20%) en 500 mL. Se incuba 30 min a temperatura ambiente.

c) 0,5 x SSC (12,5 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5 mL SDS 20%) en 500 mL. Se incuba 30 min a temperatura ambiente.

d) 0,1 x SSC (2,5 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5 mL SDS 20%) en 500 mL. Se incuba a 42°C durante 30 min.

III.E.4.g. Autorradiografía

Una vez lavado el filtro, se coloca sobre papel Whatman, se eliminan los restos de disolución y se deja secar al aire. A continuación el filtro se envuelve en papel transparente y se mete en un cassette de exposición con una película Kodak X-OMAT AR (EE.UU.) con dos placas amplificadoras. Recordar poner la cara que contiene el RNA hacia la película. Se impresiona la película colocando el cassette a -80°C el tiempo necesario.

La autorradiografía se revela en la cámara oscura con disolución reveladora Kodak (EE.UU.), se para el revelado en acético 10% y se fija con disolución fijadora Kodak (EE.UU.). Se lava la película con agua y se seca al aire.

III.E.4.h. Recuento de emisión beta

La cuantificación de los filtros hibridados con las sondas respectivas se realizó con un contador Betacospe 603 plit Analyzer (Betagen, EE.UU.). Se emplean los filtros secos y envueltos en papel transparente. El tiempo de recuento fue de 45 min para los filtros hibridados con la sonda de p53 y $\beta 2$ microglobulina y de 2 h para la sonda de tripsina.

III.E.4.i. Eliminación de la sonda

Los filtros una vez autorradiografiados, se pueden reutilizar para una nueva hibridación si se elimina del filtro la sonda marcada.

Protocolo:

1. Se mete el filtro en una bolsa de hibridación nueva con 50 mL de agua libre de ribonucleasa (tratada con DEP y estéril) a 65°C. Se sella la bolsa evitando que queden burbujas.
2. Se coloca la bolsa dentro de una bandeja con agua hirviendo. Se mantiene la bolsa a 100°C en agitación durante 5-10 min.
3. Se saca el filtro de la bolsa y se seca al aire en el caso de filtros de nitrocelulosa. Se envuelve el filtro en papel transparente y se expone toda la noche a -80°C en las condiciones del apartado III.E.4.g.
4. Se comprueba que no existe marcado. El filtro puede volver a ser hibridado.

III.F. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE RECEPTORES

Con la finalidad de analizar si el PCI es capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), se han realizado ensayos de unión competitiva del EGF y el PCI al EGF-R. También, se ha estudiado si el PCI altera la dimerización del receptor mediante técnicas de entrecruzamiento químico; y se ha analizado si dicho inhibidor afecta al nivel de fosforilación del EGF-R mediante dos ensayos diferentes: ensayos de actividad quinasa en complejos inmunes (ICKA) y detección por inmunotransferencia de proteínas fosforiladas.

III.F.1. ENSAYOS DE UNIÓN COMPETITIVA DEL PCI AL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

Para estos ensayos se ha seguido el protocolo estándar de "binding" (unión o interacción) descrito por Oustry y col. (1991) con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

Aparte del material reseñado en el apartado III.C.1. y III.C.2., se emplearon los materiales y disoluciones precisos para realizar un ensayo de "binding", que se describen a continuación:

- Medio de "binding": DMEM-0,3 % BSA- 20 mM HEPES pH 7,4.
- EGF: se prepara una disolución stock 12 μ M en tampón HEPES 20 mM-BSA 0,3%. Las diluciones posteriores se realizan en el medio de "binding" (ICN, U.S.A).
- 125 I-EGF: se prepara una disolución stock en tampón HEPES 20 mM-BSA 0,3%. Las diluciones posteriores se realizan en el medio de "binding" (ICN, U.S.A).
- PCI: se prepara una disolución stock 1 mg/mL en H₂O grado Mono-Q y las diluciones posteriores en medio de "binding".
- Disolución de lavado: PBS-BSA 0,1%.- Disolución de permeabilización: NaOH 1N-SDS 0,1%.
- Contador gamma (LKB, Suecia).

Los estudios de unión competitiva del PCI al EGF-R se realizaron con la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. De acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se siembran $1,25 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos, que se mantienen en cultivo durante 48 h en DMEM 10% FBS. Se siembran triplicados para cada concentración de competidor a ensayar.
2. Veinticuatro h antes del ensayo, se reemplaza el medio completo de los pocillos por 2 mL de DMEM sin suero.

3. Al día siguiente se lavan las células 3 veces con medio de "binding" a 4°C.
4. Se incuban las células con 70 µL de medio de "binding" en el que se han añadido las concentraciones de competidor a ensayar. En el caso del EGF las concentraciones ensayadas fueron de 0, 0,005, 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 nM. Para el PCI las concentraciones ensayadas fueron de 0, 2,32 nM, 23,28 nM, 232,8 nM, 2328,2 nM, 11641,4 nM y 46565,7 nM, concentraciones que se habían utilizado previamente en ensayos de proliferación. Posteriormente se añaden 40000 cpm (350 pM) de ¹²⁵I-EGF. La incubación se realiza a 4°C durante 5 h. Para determinar la unión inespecífica, tanto en el caso de competencia con EGF no marcado como con PCI, se incuban pocillos control con un exceso 100 veces molar de EGF no marcado (100 nM) respecto al ¹²⁵I-EGF ensayado.
5. Se lavan las células rápidamente 3 veces con 500 µL de la disolución de lavado fría.
6. Se solubilizan las células con la disolución de permeabilización mediante incubación durante 30 min a temperatura ambiente.
7. La radiactividad en la suspensión se determina con un contador gamma. Para determinar la unión específica, a la radiactividad total unida se le resta el valor de unión inespecífica.

En primer lugar se realiza una competencia entre el ¹²⁵I-EGF y EGF no marcado, este ensayo permite determinar si la línea en estudio, Capan-1, presenta uno o varios tipos de receptor para este factor de crecimiento. Posteriormente, se realiza la competencia entre el PCI y el ¹²⁵I-EGF para comprobar si el PCI compete por los mismos receptores que el EGF.

III.F.2. ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis discontinua en SDS (dodecilsulfato sódico) es una metodología que permite el análisis de mezclas complejas de proteínas (Laemmli, 1970). El método se basa en un soporte físico constituido por fibras de monómeros de acrilamida entrecruzadas con bisacrilamida que polimerizan en disolución en presencia de radicales libres. Estos radicales libres son aportados por el persulfato amónico y quedan estabilizados por el TEMED.

Disoluciones:

- Tampón del gel apilador (x4): Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%.
- Tampón del gel separador (x4): Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%.
- Acrilamida 30%, N-N'-bismetilen-acrilamida 0,8%.
- Persulfato amónico 15% (preparado al momento).
- Temed (N,N,N',N'- tetrametil-1,2-diaminoetano; Bio-Rad, EE.UU.).
- Tampón de elución (x10): glicina 1,92 M, Tris 0,25 M, SDS 1%. Se ajusta a pH 8,3-8,5.
- Tampón de aplicación (x2): Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,01%.

La densidad final de la malla de acrilamida puede ser variable y depende de dos parámetros: la concentración de monómeros y la relación acrilamida-bisacrilamida.

En el caso de la electroforesis discontinua se polimerizan dos tipos de gel: un gel superior o apilador, y un gel inferior o separador. Las funciones que realizan estos dos tipos de gel son diferentes: el apilador permite que las proteínas se concentren en una banda estrecha antes de entrar en el gel separador, aumentando la resolución de este al provocar que toda la muestra entre en el gel inferior al mismo tiempo; y el separador provoca la separación de las proteínas.

Las electroforesis se llevaron a cabo en un equipo Mini-Protean-II (Bio-Rad, EE.UU.). El tamaño de los geles es 9 cm x 6 cm x 1,5 mm.

En primer lugar se polimeriza el gel separador (con el porcentaje de acrilamida deseado, normalmente el 8%) y sobre este el gel apilador (normalmente 3%). Una vez preparados los geles se limpian los bolsillos con agua para eliminar los restos de acrilamida, se montan sobre el soporte y se añade el tampón de elución a la cubeta. En el caso de electroforesis en condiciones desnaturalizantes las muestras se incuban dos min a 100°C en presencia del tampón de aplicación para reducir los puentes disulfuro de la proteína. Finalmente las muestras se cargan en los bolsillos del gel con una jeringa Hamilton.

Las electroforesis se realizaron a intensidad suave y constante (30 mA por gel).

Los marcadores de peso molecular empleados fueron:

Marcadores de peso molecular de amplio rango preteñidos (Novex, EE.UU.): miosina (250.000 Da), BSA (98.000 Da), glutamato deshidrogenasa (64.000 Da), alcohol deshidrogenasa (50.000 Da), anhidrasa carbónica (36.000 Da), mioglobina (30.000 Da), lisozima (16.000 Da), aprotinina (6.000 Da) e insulina, cadena B (4.000 Da).

III.F.3. INDUCCIÓN DE LA DIMERIZACIÓN DEL RECEPTOR DE EGF.

La dimerización del receptor de EGF se induce estimulándolo con EGF. Los dímeros formados se estabilizan por entrecruzamiento químico y se analizan por transferencia tipo western. El protocolo seguido se detalla a continuación.

III.F.3.a. Obtención de los extratos celulares

La línea celular utilizada para este tipo de estudio ha sido A431. Las células se han mantenido en cultivo tal y como se ha descrito en el apartado III.C.4. Para poder realizar los estudios de dimerización del receptor es necesario lisar las células con un detergente, dado que el receptor es una proteína de membrana. A continuación se detallan las disoluciones, así como el protocolo seguido para la obtención de los lisados celulares.

Disoluciones:

- Tampón 1 M de fosfato sódico pH 7,4: se prepara mezclando 19 mL de una disolución 1 M NaH_2PO_4 con 8 mL de una disolución 1 M Na_2HPO_4 .
- Tampón de lisis RIPA B incompleto: su composición es 20 mM tampón fosfato sódico pH 7,4, 1% tritón X-100, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA. Esta disolución se guarda a 4°C.
- Disolución de leupeptina (Sigma, España): se prepara un stock 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que se conserva a -20°C.
- Disolución 250 mM de vanadato sódico, se conserva a -20°C (Sigma, EE.UU.).
- PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) (Sigma, EE.UU.).
- Aprotinina (Sigma, EE.UU.).
- Etanol absoluto (Merck, R.F.A.).

Protocolo:

1. Se cultivan las células en placas de cultivo de 100 mm hasta alcanzar un 70% de confluencia.
2. Se retira el medio de cultivo de las células y se lavan dos veces con PBS frío.
3. Se prepara el tampón RIPA B concentrado de la forma siguiente: se disuelve PMSF en etanol a una concentración 200 mM. Se añade al tampón RIPA incompleto PMSF a una concentración final 7 mM, se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 1 M y se filtra la disolución a través de un filtro de 0,22 μm . Entonces se añade aprotinina al 1,4% (v:v), 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina y 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vanadato sódico. Se mantiene la disolución de RIPA B en hielo.
4. Se añaden 0,5 mL de RIPA B concentrado a cada placa. Se desenganchan las células del fondo de la placa con un rascador.
5. Se transfiere el lisado celular a tubos de homogeneización de vidrio, puestos previamente en hielo. Se homogeneiza 50-60 veces.
6. Se transfiere a tubos eppendorfs previamente enfriados y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C.
7. Se transfiere el sobrenadante a eppendorfs y se mantienen en hielo. Se descartan los sedimentos.
8. Se determina la concentración de proteína usando el método de Bradford (Bradford, 1976), diluyendo las muestras 1:50 y 1:100 en agua y se añade el mismo volumen de RIPA B que de muestra a las diluciones de los pocillos de la recta patrón.
9. Se calcula el volumen de lisado celular necesario para tener 10 μg de proteína.

III.F.3.b. Inducción de la dimerización del EGF-R v entrecruzamiento químico de los dímeros formados

Una vez se dispone del lisado celular se puede inducir la dimerización del EGF-R y estudiar si el PCI es capaz de inhibir dicho proceso. Se induce la dimerización del receptor mediante la estimulación del mismo

con EGF, y los dímeros formados se estabilizan por entrecruzamiento químico. Y después se detecta la desaparición de los monómeros y aparición de los dímeros por inmunotransferencia.

Disoluciones

- Disolución de EGF 100 µg/mL en 10 mM acético 0,1% BSA (R&D, EE.UU.).
- Disolución de insulina 25 mg/mL (Boheringer Mannheim, R.F.A.)
- Disolución 10 mM acético, 0,1 % BSA.
- Disolución de glutaraldehído 25%.
- Disolución de glicina 2 M.

Protocolo:

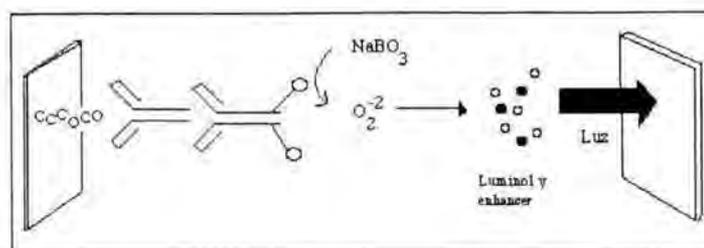
1. Se mezclan en un eppendorf, en este orden:
 x µL de lisado (los necesarios para que haya 10 µg de proteína)
 10,5 µL - x µL de RIPA B concentrado
 3 µL de la disolución de PCI en H₂O
 Se ensayan concentraciones finales de 0.1 a 5 mg/mL de PCI. Y en el caso de los controles se añaden 3 µL de BSA o insulina, concentración final 5 mg/mL
2. Se mezcla con agitación suave y se incuba a T^a ambiente durante 30 min.
3. Se añaden a la mezcla 1,5 µL de la disolución de EGF 1 µg/mL (ésta se prepara por dilución en 10 mM acético 0,1% BSA de la disolución 100 µg/mL). Se mezcla con agitación suave y se incuba a T^a ambiente durante 30 min.
4. Se añaden a la mezcla 5 µL de glutaraldehído 160 mM, preparado a partir de la disolución al 25%. Se mezcla con agitación suave y se incuba exactamente 1 min a T^a ambiente.
5. Se añaden 1,7 µL de glicina 2 M. Se mezcla con agitación suave. El color de la solución vira a amarillo. Se puede proceder entonces a analizar los dímeros formados mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia.

III.F.3.c. Detección por inmunotransferencia de monómeros y dímeros del EGF-R

La detección de los monómeros y dímeros del EGF-R se realizó mediante la técnica de la transferencia tipo Western.

Esta técnica, también llamada *electroblotting* o *Western blotting* (Towbin y col., 1979, Renart y col., 1979), combina la especificidad de detección de los anticuerpos con la resolución obtenida por las técnicas electroforéticas. Se utiliza ampliamente por su especificidad en la detección de proteínas.

Consiste en una técnica electroforética para transferir las proteínas cargadas en un gel de electroforesis a una membrana de material sintético (nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF)) gracias a un campo eléctrico perpendicular a las dos partes. Los monómeros y dímeros del EGF-R se detectan incubando la membrana con un primer anticuerpo capaz de reconocer dicho receptor. A continuación se realiza una nueva incubación con un segundo anticuerpo capaz de reconocer otros anticuerpos y que está conjugado químicamente a moléculas de peroxidasa. Por último el filtro se coloca en presencia de una disolución con un reactivo quimioluminiscente que emite luz al ser oxidado por la peroxidasa, lo que permite realizar una autorradiografía. Los monómeros y dímeros aparecen como bandas de intensidad proporcional a la cantidad de EGF-R en una forma u otra (Figura III.7.). El protocolo seguido se describe a continuación:



Proteína en la membrana Anticuerpo contra la proteína Anticuerpo con peroxidasa Formación de radicales Oxidación del luminol y emisión de luz del producto de reacción Película de Rayos X

Figura III.7. Detección de proteínas por quimioluminiscencia.

III.F.3.c.1. Transferencia

Disoluciones:

- Membranas de PVDF (Boheringer Mannheim, R.F.A.)
- Tampón HEPES vanadato: su composición es 20 mM HEPES pH 7,4 y 100 μ M vanadato sódico.
- Disolución 4x de tampón de carga para SDS-PAGE: Tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 8%, glicerol 20%, y azul de bromofenol 0,02%. Se añade 5% de β -mercaptoetanol justo antes de usar.
- Tampón de transferencia: 192 mM glicina, 25 mM tris, 20% metanol. Conservar a 4°C.

Protocolo:

1. Se toman 3 μ L de cada muestra de lisado procedente de la reacción de entrecruzamiento y se les añaden 17 μ L de dH₂O.
2. Se añade tampón de carga 4x con β -mercaptoetanol a las muestras. Se mezcla por agitación en vórtex. Se hierven las muestras 5 min a 100°C, juntamente con los marcadores.
3. Se centrifugan las muestras a 13000 rpm 2 min a temperatura ambiente.
4. Se cargan las muestras en un gel SDS-PAGE al 5%, descartando los sedimentos.
5. Se corre el gel a 30 mA durante 1-2 h hasta que el BPB sale del gel.
6. Terminada la electroforesis, se sumerge el gel en tampón de transferencia frío y se agita durante 10 min a temperatura ambiente.
7. La membrana utilizada para la transferencia no se puede tocar nunca con las manos desnudas, se debe manipular siempre con guantes. Se corta la membrana del mismo tamaño que el gel y se activa sumergiéndola 2 segundos en 5-10 mL de metanol 100%. Se elimina el metanol sumergiéndola en agua grado Mono-Q en exceso durante 5 min.
8. Los componentes del sistema (papel whatman 3M, esponjas y la membrana activada) se incuban durante 10 min en el tampón de transferencia.
9. Se monta el sistema de transferencia según el siguiente orden a partir del polo negativo (lado negro del sistema):

Esponja
Papel Whatman
Gel de poliacrilamida
Membrana
Papel Whatman
Esponja

A medida que se disponen los diferentes componentes es necesario ir eliminando las burbujas que puedan haber.

10. Dentro de la cubeta del Mini-Trans-Blot de Bio Rad se coloca el sistema, con su bloque de hielo refrigerante (que se ha mantenido a -80°C hasta el momento) y una barra agitadora magnética, y se llena hasta arriba de tampón de transferencia que debe estar en agitación durante todo el proceso.

11. El aparato se conecta a una fuente de electroforesis a un voltaje constante de 100 V durante 4 h.

12. Una vez finalizada la transferencia, se separa el gel de la membrana y se comprueba la efectividad del proceso por la transferencia de los marcadores a la membrana.

III.F.3.c.2. Detección inmunológica por revelado específico con anticuerpos

Disoluciones:

- Anticuerpo de conejo contra el EGF-R (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).
- Anticuerpo de cabra contra la región constante de los anticuerpos de conejo conjugado con peroxidasa (GAR-Po) (Pierce, EE.UU.)
- Kit de quimioluminiscencia para transferencia tipo Western (Boheringer Mannheim, R.F.A.): disoluciones A y B.
- Disolución reveladora Kodak (EE.UU.).
- Disolución fijadora Kodak (EE.UU.).
- Tampón Tris/NaCl (pH 7,5): 10 mM tris, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20, se prepara al momento.
- Tampón de bloqueo: 10 mM tris, 100 mM NaCl; 0,1% tween-20; 1% BSA, se prepara al momento.

Protocolo:

1. Se lava la membrana durante 10 min con tampón Tris/NaCl.
2. Se incuba la membrana a temperatura ambiente durante 3 h, o toda la noche, con el tampón de bloqueo.
3. Se incuba la membrana a temperatura ambiente 1 h, o toda la noche, con el anticuerpo contra el EGF-R. El anticuerpo se prepara diluyendo 1:4000 la disolución comercial en tampón de bloqueo.
4. Se lava la membrana con tampón Tris/NaCl. Un primer lavado de 15 min y 4 más de 5 min.
5. Se incuba la membrana a temperatura ambiente 1 h, o toda la noche, con el GAR-Po. El anticuerpo se prepara diluyendo 1:4000 la disolución comercial en tampón de bloqueo.
6. Se lava la membrana con tampón Tris/NaCl. Un primer lavado de 15 min y 4 más de 5 min.
7. Se mezcla la disolución A precalentada (25°C) con la disolución B en proporciones 100:1 y se incuba durante 30 min más a temperatura ambiente. Ésta es la disolución de detección.
8. En la cámara oscura, se quita el exceso de tampón de los lavados presionando la membrana entre 2 hojas de papel de filtro. Se pone la membrana en una bandeja nueva y se añade la disolución de detección directamente sobre ésta.
9. Se incuba exactamente durante 1 min, agitando manualmente.
10. Se elimina el exceso de disolución de detección. Se envuelve la membrana con película transparente.
11. Se coloca la membrana en un cassette de exposición, con la cara que estuvo en contacto con el gel boca arriba. Sobre la membrana se sitúa una película Kodak X-OMAT AR (EE.UU.). Se expone la película el tiempo necesario hasta un máximo de 1 h.
12. Se revela el film en la cámara oscura con disolución reveladora Kodak (EE.UU.). Se para el revelado con agua destilada y se fija con disolución fijadora Kodak (EE.UU.). Se lava la película con agua y se seca al aire.

III.F.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE EGF.

El grado de fosforilación del receptor de EGF se ha analizado con 2 métodos diferentes. Ambos se basan en la inmunoprecipitación previa del receptor para después estudiar la actividad quinasa del mismo (ICKA) o bien detectar sus tirosinas fosforiladas. A continuación se detallan ambas técnicas.

III.F.4.a. Obtención de los extractos celulares

Las líneas celulares utilizadas para este tipo de estudio han sido A431 y Capan-1. Las células se han mantenido en cultivo tal como se ha descrito en el apartado III.C.4. El protocolo seguido fue el detallado en el apartado III.F.3.a con las modificaciones siguientes.

Disoluciones:

- Disolución de EGF 100 µg/mL en 10 mM acético, 0,1 % BSA (R&D, EE.UU.)

Protocolo:

1. Se cultivan las células en placas de cultivo de 100 mm hasta alcanzar un máximo del 70% de confluencia.
2. Se lavan las células dos veces con PBS atemperado a 37°C. Seguidamente se añade medio sin suero y se hacen crecer en el mismo durante 18 h.
3. Se lavan nuevamente las células 2 veces con PBS atemperado y se añade nuevo medio sin suero. A continuación se añade PCI a la concentración deseada a los cultivos que se quieran tratar y se incuba durante 10 min a 37°C. Seguidamente se añade EGF a los cultivos (5 ng/mL en el caso de la línea Capan-1 y 1 ng/mL para la línea A431) y se incuba nuevamente durante 10 min a 37°C.
4. Se retira el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con PBS frío.
5. Se prepara el tampón RIPA B completo de la forma siguiente: se disuelve PMSF en etanol a una concentración 200 mM. Se añade al tampón RIPA incompleto PMSF a una concentración final 5 mM, se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 1 M y se filtra la disolución a través de un filtro de 0,22 µm. Entonces se añade aprotinina al 1% (v:v), 10 µg/mL de leupeptina y 250 µg/mL de vanadato sódico. Se mantiene la disolución de RIPA B en hielo.
6. Se añaden 0,5 mL de RIPA B completo a cada placa. Se desenganchan las células del fondo de la placa con un rascador.

7. Se transfiere el lisado celular a tubos de homogeneización de vidrio, puestos previamente en hielo. Se homogeneiza 50-60 veces.
8. Se transfiere a tubos eppendorfs previamente enfriados y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C.
9. Se transfiere el sobrenadante a eppendorfs y se mantienen en hielo. Se descartan los sedimentos.
10. Se determina la concentración de proteína usando el método de Bradford (Bradford, 1976), diluyendo las muestras 1:100 en agua y se añade el mismo volumen de RIPA B que de muestra a las diluciones de los pocillos de estándar.
11. Se calcula el volumen de lisado celular necesario para tener 250 µg de proteína. Se completa este volumen hasta 300 µL con RIPA B completo. Se procede a la inmunoprecipitación.

III.F.4.b. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es una metodología que permite la precipitación selectiva de una determinada proteína a partir de una mezcla compleja, mediante la utilización de inmunoglobulinas que reconocen a la proteína escogida y forma complejos antígeno-anticuerpo, que se precipitan con pansorbina.

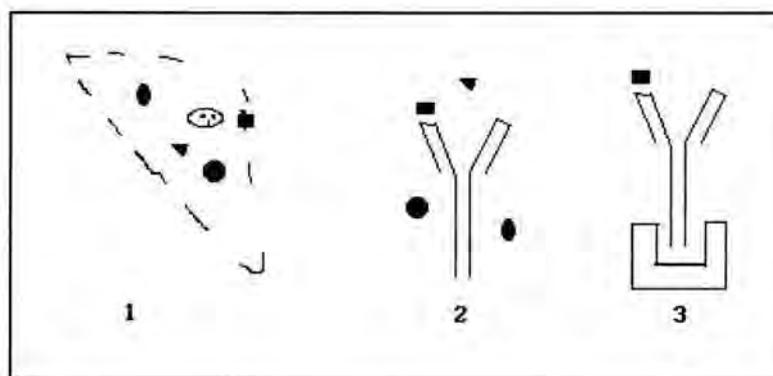


Figura III.8: Inmunoprecipitación: 1. Lisis celular. 2. Formación de los complejos Ag-Ab. 3. Precipitación de los complejos inmunes con pansorbina.

Disoluciones

- Tampón ICKA: su composición es 10 mM tampón fosfato sódico pH 7,4, 150 mM NaCl y 0,1% tritón X-100. Esta disolución se guarda a 4°C.
- Anticuerpo monoclonal contra el receptor de EGF: clon RPN 513 (Amersham Life Science, Reino Unido).
- Pansorbina: suspensión celular de *Staphylococcus aureus*. (Calbiochem, EE.UU.)

Protocolo

1. Se añaden 5 µL de anticuerpo contra el EGF-R a cada muestra de lisado celular y se mezcla mediante vórtex. Se incuba durante 1 h en hielo.
2. Se añaden 50 µL de pansorbina a cada muestra y se mezcla mediante vórtex. Se incuba durante 20-30 min en hielo.
3. Se centrifuga a 13000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante.
4. Se agitan con vórtex los sedimentos y se resuspenden en 1 mL de tampón ICKA frío.
5. Se repiten tres veces los pasos 3 y 4.
6. Se secan los eppendorfs colocándolos boca abajo sobre un papel absorbente. Se dejan los sedimentos en hielo y se procede inmediatamente al ensayo de actividad quinasa o a la transferencia tipo Western, o se congelan los sedimentos, no por mucho tiempo, a -80°C.

III.F.4.c. Ensayos de actividad quinasa utilizando complejos inmunes (ICKA)

Una vez se dispone de receptor inmunoprecipitado se puede estudiar su actividad quinasa determinando la incorporación de fósforo a sus lugares de autofosforilación. En este tipo de ensayo se proporciona al receptor el fósforo en forma de ^{32}P -ATP y después se detecta su incorporación mediante un

gel de electroforesis seguido de autorradiografía.

Disoluciones

- Disolución 100 nM MnCl₂. Esta disolución se guarda a 4°C.
- Tampón HEPES-vanadato: su composición es 20 mM HEPES pH 7,4 y 100 μM vanadato sódico.
- Disolución 1 M KOH. Esta disolución se conserva a temperatura ambiente.
- Disolución de fijación: 40% metanol y 10% ácido acético.
- Secador de geles modelo 583 (Biorad, EE.UU.).

Protocolo

1. Se prepara el tampón de reacción. Cada muestra necesita 50 μL.
 - 1.a. Se determina la cantidad de cofactor (Mn²⁺) a añadir. La concentración final debe ser 8 mM
 - 1.b. Se calcula el ³²P-ATP necesario. Cada muestra necesita 10 μCi.
 - 1.c. Se completa el volumen total con el tampón HEPES-vanadato.
2. Se agitan con vórtex los sedimentos secos y se resuspende cada uno en 50 μL de tampón de reacción acabado de preparar.
3. Se mezcla bien. Se incuba exactamente 10 min a temperatura ambiente.
4. Se para la reacción añadiendo tampón de carga 4x con β-mercaptoetanol. Se mezclan los sedimentos. Se hierven las muestras durante 5 min a 100°C, junto con los marcadores de peso molecular.
5. Se centrifugan los sobrenadantes a 13000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
6. Se cargan las muestras en un gel al 8% SDS-PAGE, preparado tal y como se ha descrito en el apartado III.F.2. Se descartan los sedimentos.
7. Se corre el gel durante 1 h y 30 min a 30 mA.
8. Se fija en la disolución de fijación durante 30-60 min.
9. Se hierva el gel en 1 M KOH durante 20 min.
10. Se transfiere el gel a la disolución de fijación, que se cambia cada 5-10 min, hasta que el gel vuelva a alcanzar su tamaño normal y sea transparente en lugar de blanco. Normalmente tarda entre 30 y 60 min.
11. Se seca el gel en un secador (al menos durante 3 h) y se autorradiografía durante unos 10 min en el caso de la línea A431 y durante 2 a 4 h en el de la línea Capan-1. Se determina la radiactividad del filtro con un contador beta.

III.F.4.d. Detección por inmunotransferencia de proteínas fosforiladas en tirosinas

La detección de la presencia de tirosinas fosforiladas en proteínas se realizó mediante la técnica de la transferencia tipo Western descrita en el apartado III.F.3.c. En este caso el sedimento inmunoprecipitado (obtenido como se explica en el apartado III.F.4.b.) se resuspendió en 30 μL de tampón HEPES-vanadato y se continuó con el protocolo descrito en el apartado III.F.3.c.1. Los residuos de tirosinas fosforiladas se detectaron en la membrana siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.F.3.c.2. En este caso la membrana se incubó únicamente con el anticuerpo antifosfotirosina conjugado con peroxidasa. El anticuerpo se preparó diluyendo 1:2500 la disolución comercial en tampón de bloqueo. El revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia.

III.G. MODELOS ANIMALES

Se han utilizado diferentes modelos animales para estudiar los efectos del PCI. Uno de ellos permitió determinar si el dicho inhibidor afecta a la capacidad metastásica de las células tumorales, y los otros dos si tiene alguna influencia sobre la aparición y desarrollo de tumores *in vivo*.

III.G.1. ENSAYOS DE METÁSTASIS *IN VIVO*

Para estudiar el efecto del PCI sobre la capacidad metastásica de las células tumorales se utilizó el modelo de la línea de melanoma de ratón B16F10. Estas células tumorales se inoculan en ratones singénicos vía intraesplénica, y al cabo de 7 días empiezan a desarrollar metástasis en el hígado.

III.G.1.a. Preparación de las células para su inoculación y tratamiento de los ratones

Las células de la línea de melanoma de ratón B16F10 se mantuvieron en cultivo tal y como se ha descrito en el apartado III.C.4., posteriormente se inocularon en los ratones de la forma siguiente:

Material y disoluciones:

- Material quirúrgico necesario para hacer una incisión y dar unos puntos de sutura.
- Nembutal: anestésico que se administra a una dosis de 50 mg/Kg.
- Alfa MEM HEPES (Gibco, EE.UU.).
- Ratones machos C57BL/6J, de 6 a 8 semanas (IFFA Credo, Francia).

Tratamientos:

- Grupo control: constituido por 5 ratones a los cuales se les inocularon 300.000 células disueltas en 0,1 mL de alfaMEM-HEPES. Los ratones, previamente anestesiados con nembutal, se inoculan via intraesplénica, mediante una pequeña incisión y posterior cierre con puntos.
- Tratamiento 1: otros 5 ratones inoculados de la misma forma que los control. Al sexto día de la inyección, se inicia un tratamiento diario con 10 µg de PCI (disueltos en PBS) por via intraperitoneal.
- Tratamiento 2: en este caso las células con las cuales se inoculan los ratones, en número de 5, se tratan previamente "in vitro", durante 4 días, con una concentración de 0,1 mg/mL de PCI. La inoculación de las células es idéntica a la del grupo control.

III.G.1.b. Determinación del número de metástasis formadas

Material:

- Formalina (Sigma, EE.UU.).
- Disoluciones de hematoxilina-eosina (Apartado III.C.2.).
- Ultramicrotomo modelo Supernova (Reichert, Austria).
- Microscopio óptico (Zeiss, R.F.A.).

Protocolo:

Todos los ratones se sacrifican por dislocación cervical al cabo de 11 días de la inyección de las células tumorales. Seguidamente se les extrae el hígado, que se fija con una disolución de formalina y se obtienen secciones mediante el ultramicrotomo. Posteriormente se tiñen las secciones con hematoxilina-eosina y se cuenta el número de focos metastásicos.

III.G.2. ENSAYOS CON RATONES ATÍMICOS

Para determinar si el PCI tiene algún efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo* se siguió el crecimiento de tumores subcutáneos inducidos en ratones atímicos tratados o no con PCI.

Material y soluciones:

- Reactivos y materiales necesarios para cultivo celular, descritos en el apartado III.C.2.
- Ratones desnudos o atímicos, CD-1 nude/hembras, de seis semanas.
- Jeringas de insulina (Becton Dickinson Labware, EE.UU.).
- Metaphane (anestésico).
- Calibrador Vernier.

Protocolo:

1. Los ratones se inyectan subcutáneamente con 10^7 células de la línea Capan-1 disueltas en 100 µL de DMEM. A los días 12 de la inoculación de las células, se inicia el tratamiento diario por inyección directa en el tumor de 100 µL de las disoluciones de PCI o PBS. En este momento los tumores son palpables y miden como mínimo 2 mm de diámetro. Se inoculan 19 ratones que se distribuyen en 4 grupos:

- Grupo control: constituido por 5 ratones. Se les realiza un tratamiento con PBS.
- Grupo I: constituido, también, por 5 ratones. Se les trata con 11 µg/día de PCI disueltos en PBS.

- Grupo 2: formado por 5 ratones a los que se les aplica un tratamiento con una dosis de PCI de 60 µg/día.
 - Grupo 3: formado por 4 ratones a que reciben una dosis de PCI de 120 µg/día.
2. Durante el tratamiento, que dura 32 días, se determina cada dos días el tamaño de los tumores. Se utiliza un calibrador Vernier, que permite medirlos en todas sus dimensiones. El volumen de los tumores se halla de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$V = \frac{W^2 \times L}{2}$$

donde W es la amplitud del tumor y L la longitud del mismo.

A medida que se conocen los volúmenes de los tumores, cada 7 días se calcula su crecimiento relativo, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen relativo} = \frac{\text{Volumen del tumor al tiempo } t \text{ de tratamiento}}{\text{Volumen al tiempo } 0 \text{ de inicio del tratamiento}}$$

Una vez finalizado el tratamiento se calcula el tiempo de duplicación de los tumores (t_d), de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$t_d = \frac{2 \times d}{V_t - V_0}$$

donde d corresponde a los días de tratamiento, V_t al volumen del tumor al final del tratamiento y V_0 al volumen al inicio del tratamiento.

III.G.2.a. Caracterización histológica de los tumores

Después de 32 días de tratamiento todos los ratones se sacrifican por asfixia en una cámara de CO₂ y se les realiza la autopsia. A todos ellos se les extrae el hígado y el tumor subcutáneo que se les ha inducido.

Todos los tejidos se fijan durante 12 h en formalina tamponada con PBS. Posteriormente se embeben en parafina. Los bloques así obtenidos se cortan en secciones de 5 µm de grosor y se tiñen con hematoxilina-eosina. A partir de estos cortes se realiza el estudio histopatológico de los tumores.

III.G.3. ENSAYOS CON RATONES TRANSGÉNICOS

La tecnología de los animales transgénicos, que consiste en introducir secuencias de DNA exógenas en las líneas germinales, ha permitido obtener ratones transgénicos predispuestos a desarrollar cáncer. Dichos animales constituyen modelos *in vivo* de formación de tumores en los cuales los cambios preneoplásicos ocurren invariablemente en uno o varios órganos en particular y durante un intervalo de tiempo determinado, lo que permite que la progresión neoplásica pueda ser estudiada sistemáticamente.

Muchos modelos transgénicos de desarrollo de tumores se han obtenido por fusión de la secuencia reguladora de un determinado gen a la región temprana del virus SV40, que comprende los genes de los antígenos T grande y t pequeño de dicho virus. La secuencia reguladora dirigirá la expresión de la región temprana a uno o varios órganos, con la consecuente aparición de un tumor debido a la acción oncogénica de los antígenos SV40 (Fanning, 1992).

Por tanto se dispone actualmente de líneas de ratones transgénicos que desarrollan uno o varios tipos de tumores, y en el presente trabajo se empleó una de ellas para comprobar si el PCI puede afectar a la aparición y evolución de tumores

A continuación se describe la línea de ratones con la que se ha trabajado, denominada iCAITag-2, amablemente cedida por la Dra. M.L. Frazier del MD Anderson Cancer Center de Houston, así como el tratamiento aplicado a los mismos.

III.G.3.a. Descripción de la línea transgénica

La línea de ratones transgénicos iCAII-Tag-2 se obtuvo por microinyección de un DNA lineal de concentración 1-2 ng/mL en el pronúcleo de oocitos fertilizados de ratones B6D2 (Gordon y Ruddle, 1981). El fragmento de DNA microinyectado estaba formado por secuencias reguladoras del gen de la anhidrasa carbónica (CAII) unidas a la región codificadora del antígeno T del virus SV40. El fragmento se obtuvo por corte con enzimas de restricción del vector pCASV40-i (Figura III.9), que contiene dos secuencias reguladoras del gen de la anhidrasa carbónica II. Una consiste en los 1.7 Kb situados en dirección 3' a partir del codón ATG del inicio de la traducción que está unida en la orientación opuesta a la encontrada en el gen a una segunda secuencia de 3.5 kb localizada inmediatamente 5' respecto al punto de inicio de la traducción. Dichas secuencias reguladoras se ligaron a una secuencia de 2.7 kb que codifica para el antígeno T del SV40, pero que no tiene ni el promotor ni el estimulador del virus.

Los embriones se aislaron 12 a 24 h postcoito de hembras que han sido inducidas hormonalmente a superovular. Se microinyectaron de 50 a 100 copias del fragmento de DNA transgénico mediante una micropipeta insertada directamente en el pronúcleo del gameto más prominente (el proveniente del macho) (Hogan et al, 1986). El embrión se transfirió entonces directamente al oviducto de una hembra CDI pseudoembarazada. En la descendencia nacida de los huevos microinyectados se analizó por PCR la presencia del transgén integrado en el DNA aislado de la cola de los ratones.

Si el DNA se ha integrado en el genoma de todas las células, para poder establecer una línea transgénica, los ratones que han resultado ser positivos (fundadores) se cruzan con ratones negativos (C57B1/6J). La descendencia positiva de este cruce (la generación F₁) tendrá integrado establemente el transgén en su genoma, y además, todas las células serán positivas para el mismo. Para poder obtener una línea homocigota se cruzan dos ratones positivos de F₁, y en la siguiente generación (F₂) un 25% de los ratones serán homocigotos para el transgén. Se comprueba que dichos ratones son homocigotos cruzándolos con un ratón negativo y si toda la descendencia resulta ser positiva, nos indicará que el ratón de F₂ era homocigoto. Una vez obtenidos los ratones homocigotos se mantiene la línea cruzando siempre ratones homocigotos entre sí.

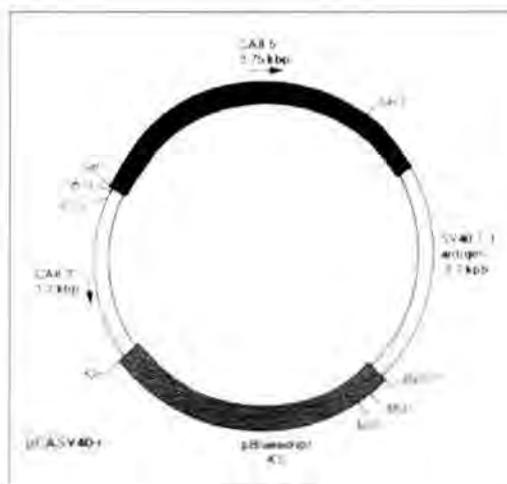


Figura III.9.: Vector pCASV40-i

III.G.3.b. Tratamiento de los ratones

Una vez se dispuso de una población homogénea de ratones homocigotos para el transgén descrito anteriormente, se procedió a su tratamiento con PCI, para ver si éste puede afectar a la aparición y desarrollo de tumores *in vivo*.

Material:

- Ratones transgénicos homocigotos para el vector pCASV40-i.
- Disolución de PCI 100 µg/mL estéril en agua destilada.

- Disolución de PBS estéril.
- Adyuvante completo de Freund (Sigma, EE.UU.).
- Adyuvante incompleto de Freund (Sigma, EE.UU.).
- Jeringas de 1 mL estériles (Becton Dickinson, EE.UU.).
- Agujas de 27G 1/2 estériles (Becton Dickinson, EE.UU.).
- Emulsionador (Becton Dickinson, EE.UU.).

Tratamientos:

-Grupo control: grupo formado por 27 ratones que se tratan con PBS administrado según una pauta de inmunización. Esta consiste en administrar una primera inyección subcutánea de 200 μ L de una mezcla 1:1 de PBS y adyuvante completo de Freund. A la semana de la primera inyección, se administra una segunda, en este caso de 200 μ L de una emulsión 1:1 de PBS y adyuvante incompleto de Freund. La tercera inyección se realiza a los 37 días y la última a los 67 días de la primera, siendo ambas iguales a la segunda.

-Grupo tratado con PCI: grupo formado, también, por 27 ratones que se tratan con PCI administrado según la pauta de inmunización anteriormente descrita, sustituyendo el PBS por una disolución de PCI 100 μ g/mL.

Todos los animales se empiezan a inyectar a los 2 meses de edad y se sigue su evolución hasta el momento en que están moribundos debido a que han desarrollado tumores. Los animales se inspeccionan cada 3 días.

A medida que los ratones se van sacrificando se calcula el % de supervivencia de ambos grupos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de ratones} - \text{N}^{\circ} \text{ de ratones muertos}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de ratones}} \times 100$$

III.G.3.c. Procesamiento de los ratones

Cuando los ratones están moribundos, se sacrifican por asfixia en una cámara de CO₂ y se les realiza la autopsia. A todos ellos se les extrae el cerebro, páncreas y bazo, así como aquellos órganos que presenten anomalías macroscópicas.

Todos los órganos se fijan durante 12 h en formalina tamponada con PBS. Posteriormente se embeben en parafina. Los bloques así obtenidos se cortan en secciones de 5 μ m de grosor y se tiñen con hematoxilina-eosina.

A partir de estos cortes se realiza el estudio histopatológico de los órganos. Se realizan cortes adicionales para realizar estudios de inmunohistoquímica tal y como se detalla en el apartado III.H.1.

III.H. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección de un antígeno determinado en células o tejidos. Se puede así demostrar tanto la presencia como la localización subcelular de dicho antígeno.

Estas técnicas se basan en la utilización de un material (células o tejidos) que está unido a un soporte sólido, lo que facilita su procesamiento posterior. Seguidamente se fija el tejido (o células) y se permeabiliza para asegurarse un libre acceso del anticuerpo, para a continuación incubarlo con el anticuerpo y eliminar el no unido con lavados. Finalmente el anticuerpo unido se detecta directamente (si estaba marcado) o indirectamente mediante un segundo anticuerpo marcado.

A continuación se detalla el protocolo utilizado para la caracterización de los tumores desarrollados por los ratones transgénicos.

III.H.1. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

Esta técnica inmunohistoquímica basa la detección del antígeno en la utilización de un complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa donde la peroxidasa precipita un cromógeno soluble dando un producto coloreado insoluble donde estaba localizado el antígeno.

Un primer anticuerpo reconoce al antígeno. Éste es a su vez reconocido por un segundo anticuerpo biotinado al que se le une el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa que finalmente provoca la aparición de color. Con esta técnica se consigue ampliar la señal de manera muy significativa (Fig. III.10).

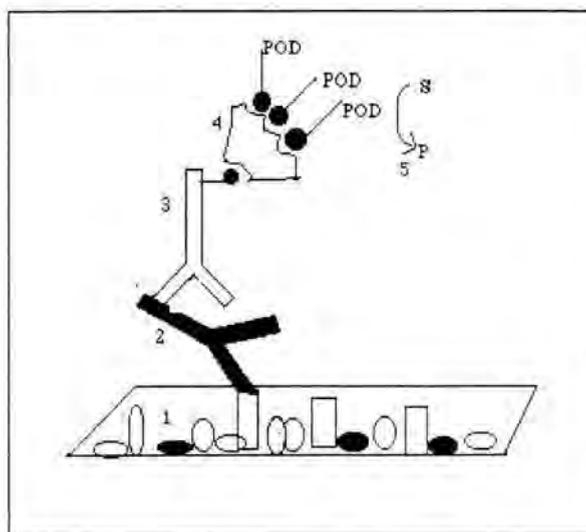


Figura III.10 Detección por inmunoperoxidasa indirecta. 1. Tejido. 2. Anticuerpo primario específico para el antígeno. 3. Anticuerpo biotinado que se une al primario. 4. Complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa. 5. Cromógeno.

Material:

- Polilisina (Sigma, EE.UU.).
- chileno (Panreac, España).
- etanol (Panreac, España).
- H₂O₂ (Merck, R.F.A.).
- Metanol (Panreac, España).
- Disolución de citrato sódico 10 mM pH 6 (Merck, R.F.A.).
- PBS.
- Disolución de bloqueo libre de suero (Dako, EE.UU.).
- Suero no inmune de cabra y de caballo (Dako, EE.UU.).
- Suero de conejillo de indias contra la insulina porcina (Dako, EE.UU.).
- Anticuerpo monoclonal contra la cromogranina (Biogenex, EE.UU.).
- Líquido ascítico contra el antígeno T largo de SV40 (cedido por la Dra. Lozano del M.D. Anderson Cancer Center, EE.UU.).
- ABC Kit elite (Vector, EE.UU.).
- Anticuerpo biotinado contra la región constante de los anticuerpos de conejillo de indias (Vector, EE.UU.).
- Anticuerpo biotinado contra la región constante de los anticuerpos de conejo (Vector, EE.UU.).
- Anticuerpo biotinado contra la región constante de los anticuerpos de ratón (Vector, EE.UU.).
- DAB (diaminobenzidina) (Research Genetics, Inc., EE.UU.).
- Hematoxilina de Mayer's (Richard Allen Scientific, EE.UU.).
- Aqua-Mount: medio de montaje (Lerner laboratories, EE.UU.).

Protocolo:

1. Se realizan cortes de 4 μm de los bloques embebidos en parafina y se ponen en portas recubiertos de polilisina.

Recubrimiento de los portas con polilisina:

- a. Se lavan los portas dos veces en metanol durante 5 min. Se dejan secar al aire.
- b. Se incuban los portas en una dilución 1:10 de polilisina en agua grado Mono-Q durante 10 min.
- c. Se dejan secar los portas completamente al aire.
- d. Se repiten los pasos b y c.

2. Se desparafinan los portas mediante los pasos siguientes: 3 lavados de 5 min en xileno, 2 lavados de 5 min en etanol 100%, 1 lavado de 5 min en etanol 95%, 1 lavado de 5 min en etanol 70% y 2 lavados de 5 min en agua grado Mono-Q.

3. Se bloquea la actividad peroxidasa endógena del tejido incubando los portas en una disolución de agua oxigenada al 3% en metanol durante 10 min.

4. Se lavan los portas en agua grado Mono-Q, 2 lavados de 4 min cada uno.

5. Se colocan los portas en una disolución de citrato sódico 10 mM pH 6 y se llevan a ebullición durante 1 min en el microondas, con ello se consigue exponer el antígeno.

6. Se lavan los portas en PBS, 2 lavados de 4 min cada uno.

7. Se tratan los portas con una disolución de bloqueo libre de suero durante 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

8. Se lavan los portas en PBS, 2 lavados de 4 min cada uno.

9. Se aplica a los portas durante 20 min, como segundo paso de bloqueo, suero no inmune al 2 % disuelto en PBS (este suero corresponde al de la misma especie donde se obtienen los anticuerpos biotinados). Este paso se realiza a temperatura ambiente en cámara húmeda. Para la detección del antígeno T de SV40 y de la cromogranina se utiliza suero de caballo, para la insulina se utiliza suero de cabra.

10. Se elimina el exceso de suero no inmune de los portas y se les añade el primer anticuerpo disuelto en PBS al 1% en suero no inmune. A continuación se explican las diluciones para cada uno de los antígenos a detectar:

Anticuerpo contra el antígeno T de SV40: dilución 1:9 en PBS con un 1% de suero de caballo.

Anticuerpo contra la insulina: dilución 1:2500 en PBS con un 1% de suero de cabra.

Anticuerpo contra la cromogranina: dilución 1:200 en PBS con un 1% de suero de caballo.

Control negativo: se le añade PBS con un 1% del suero no inmune correspondiente.

Se incuba en cámara húmeda durante 1 h a 37°C para el anticuerpo contra el antígeno T de SV40 y a temperatura ambiente para los otros anticuerpos.

11. Se lavan los portas en PBS, 2 lavados de 4 min cada uno.

12. Se cubren los portas con el segundo anticuerpo biotinado diluido en PBS al 1% en suero no inmune:

SV40: dilución 1:1250 en PBS (con un 1% de suero no inmune de caballo) del anticuerpo contra la región constante del anticuerpo de ratón biotinado.

Insulina: dilución 1:200 en PBS (con un 1% de suero no inmune de cabra) del anticuerpo contra la región constante del anticuerpo de conejillo de indias biotinado.

Cromogranina: dilución 1:1250 en PBS (con un 1% de suero no inmune de caballo) del anticuerpo contra la región constante del anticuerpo de ratón biotinado.

Se incuba en cámara húmeda durante 30 min a temperatura ambiente.

13. Se lavan los portas en PBS, 2 lavados de 4 min cada uno.

14. Se cubren los portas con el reactivo del Kit ABC elite:

Se diluyen 50 μL de reactivo A y 50 μL de reactivo B en 2,5 mL de PBS.

Se incuba en cámara húmeda durante 45 min a temperatura ambiente.

15. Se lavan los portas en PBS, 2 lavados de 4 min cada uno.

16. Se cubren los portas con el cromógeno, DAB. Se observa la aparición de color al microscopio. Se para la reacción después de 3 min sumergiendo los portas en agua grado Mono-Q.

17. Se realiza una contratinción de los portas con hematoxilina de Mayers, sumergiendo los portas en la disolución de hematoxilina y eliminando el exceso de la misma poniéndolos en agua calidad Mono-Q.

18. Se cubre el tejido con el medio de montaje y con un cubreobjetos.

19. Se observa la tinción al microscopio.

III.1. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS

III.1.1. COMPARACIÓN TOPOLÓGICA ENTRE EL PCI Y OTRAS MOLÉCULAS POR ANÁLISIS COMPUTACIONAL

Se ha realizado un análisis computacional que permite establecer la similitud topológica de los puentes disulfuro de una proteína con los del resto de las existentes en el banco de datos de estructuras cristalográficas de proteínas (Protein Data Bank, PDB) gracias al programa KNOT-MATCH (Mas y col., 1998). El programa calcula los RMSD (desviación de la raíz cuadrática media) entre las topologías de los puentes disulfuro de las proteínas que compara. Valores bajos de RMSD indican una similitud estructural elevada. De esta forma se ha podido determinar que la topología de puentes disulfuro presente en el PCI es compartida por otras proteínas entre las que se encuentran factores de crecimiento tales como el EGF, TGF- α , heregulina, PDGF, NGF e inhibidores de proteasas como el BBI.

Resultados y Discusión

IV.A. OBTENCIÓN DE rePCI MEDIANTE FERMENTACIÓN

El PCI necesario para los experimentos fue inicialmente cedido por el grupo del Dr. F. X. Avilés del Instituto de Biología Fundamental de la U.A.B. Posteriormente se procedió a obtenerlo utilizando el método de producción de rePCI en fermentador, puesto a punto por Marino (1993).

La producción de rePCI por parte del cultivo bacteriano está directamente ligada a la etapa de crecimiento exponencial. En condiciones de crecimiento bacteriano óptimo, se obtuvieron 200-250 mg de rePCI por litro de medio de cultivo, acompañado de una DO (550 nm) de bacterias de 50-60 unidades, que representan aproximadamente 20 g/L de peso seco de células. La fermentación se realizó en forma discontinua alimentada (apartado III.A.3). Se partió de 1350 mL de medio M9cas + Ap + oligoelementos 1/1000, los cuales se inocularon con 150 mL de un cultivo o/n de *E.coli* MC1061(pIMAM3) e inmediatamente se indujo con IPTG 2 mM (Marino y col., 1994).

En el transcurso de la fermentación se fueron añadiendo al medio los diferentes nutrientes a medida que se iban agotando a causa del crecimiento bacteriano. En la Tabla IV.1 se muestran las adiciones de CASaa, glicerol, CaCl₂, MgSO₄, tiamina y sales M9 que se realizaron a lo largo de una de las fermentaciones. La segunda inducción con IPTG, que se realizó aproximadamente a las 8 horas de fermentación, fue idéntica a la primera.

Tabla IV.1.: Adiciones de soluciones de nutrientes en una fermentación típica.

Tiempo después de inocular (horas)	Glicerol 80% (mL)	Casaminoácidos 20% (mL)	Sales M9 concentradas + Tiamina (mL)	IPTG 200 mM (mL)
5	10	20		
6	20	40	25	
7			50	
8	50	100		1,5
20	20	40		
26	20	40		

Durante toda la fermentación, la presión de oxígeno en el cultivo se mantuvo alrededor del 50-60 % (Figuras IV.1 y IV.2). Esto se consiguió durante las primeras 4-5 horas de fermentación aumentando la agitación hasta llegar a 900 rpm. A partir de este momento, se mantuvo gracias al enriquecimiento del aire con oxígeno, utilizando un módulo mezclador de gases. Se estudió el crecimiento bacteriano y la producción de rePCI tomando muestras periódicamente y analizándolas. Para estimar la concentración de bacterias se midió la absorbencia de la muestra a 550 nm. Después de una centrifugación del medio, se midió la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa en el medio de cultivo, para calcular la cantidad de

rePCI. Con estos análisis se obtuvo la información necesaria para conocer la evolución de las fermentaciones.

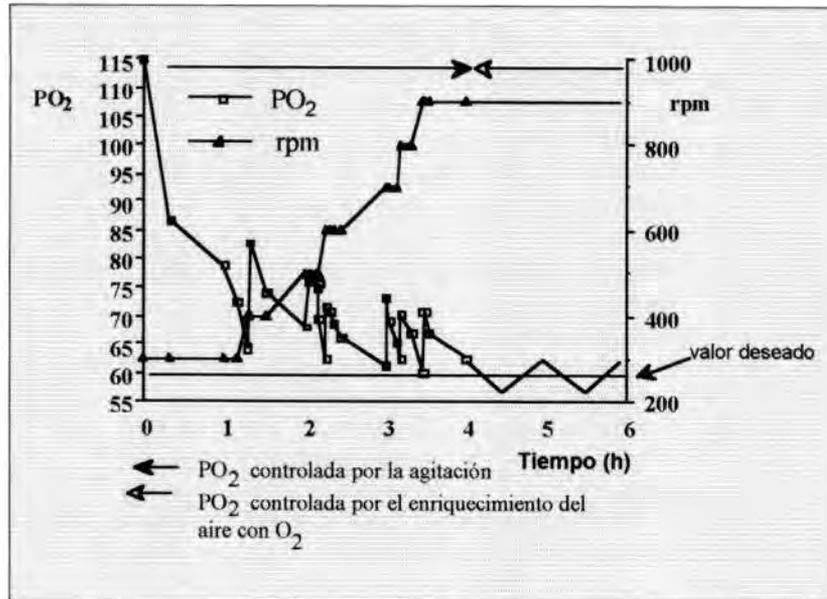


Figura IV.1.: Esquema general de la evolución de la agitación y la presión de oxígeno durante la primera etapa de una fermentación típica de una cepa de *E.coli* productora de rePCI.

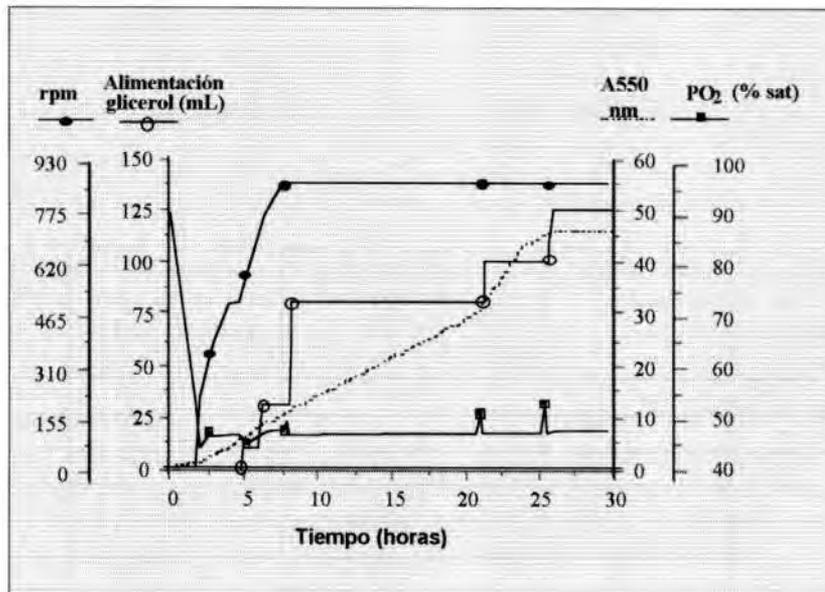


Figura IV.2.: Evolución de la presión de O₂, agitación, adiciones de nutrientes y DO bacteriana durante una fermentación típica de una cepa de *E.coli* productora de rePCI.

El rePCI se purificó del medio de cultivo de las fermentaciones mediante el procedimiento descrito por Molina (1993) modificado por Marino (1993). Consiste en concentración del medio de la fermentación mediante filtración tangencial, nueva concentración de la muestra mediante cromatografía de fase reversa, primera etapa de purificación por cromatografía de intercambio aniónico en FPLC, concentración de la muestra mediante columnas de fase reversa Sep-pak y última etapa de purificación por cromatografía

de fase reversa en HPLC. El protocolo permite obtener PCI puro (> 99% pureza, determinado por HPLC de fase reversa) con unos rendimientos superiores al 50%.

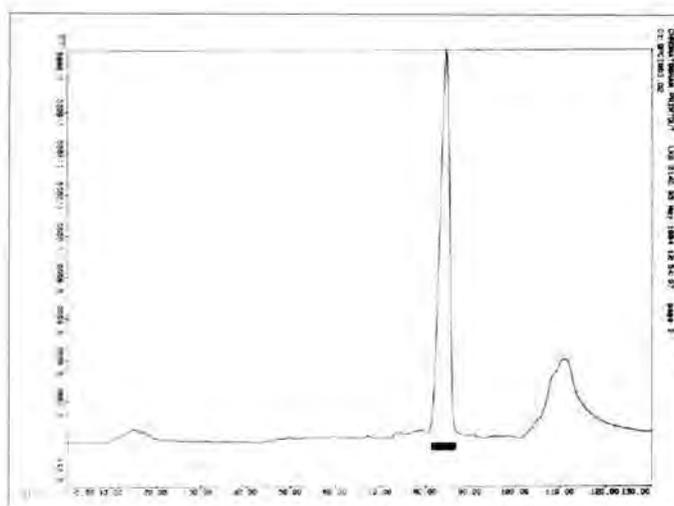


Figura IV.3.: Cromatografía de intercambio aniónico (en columna de DEAE-Sepharose) de una alícuota de 250 mL de cultivo concentrado de la fermentación de *E.coli* productora de rePCI. La línea continua muestra las lecturas de absorbencia a 280 nm, y el rectángulo la fracción con actividad inhibitoria de CPA.

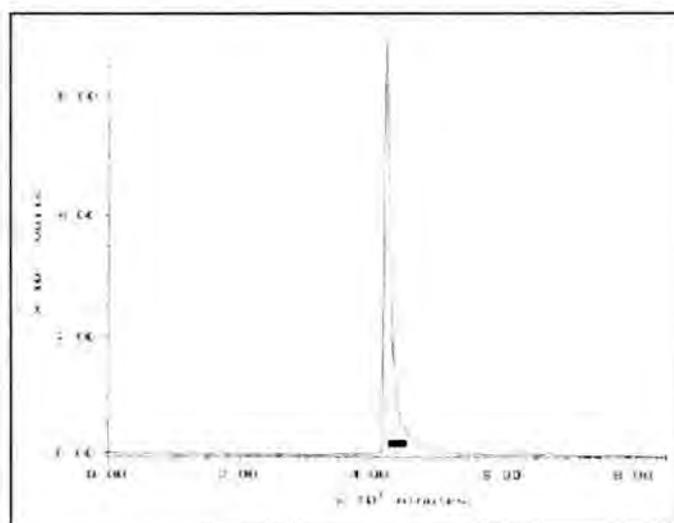


Figura IV.4.: Cromatografía de fase reversa, por HPLC en columna Vydac-C4 de la fracción con actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A de la cromatografía anterior, concentrada mediante columna Sep-Pack C18. La línea continua muestra las lecturas de absorbencia a 280 nm, y el rectángulo la fracción con actividad inhibitoria de CPA.

IV.B. EFECTO DEL PCI SOBRE DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

IV.B.1. EFECTOS DEL PCI SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si la presencia del inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) en el medio de cultivo producía algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de diferentes líneas celulares tumorales. Las razones que llevaron a plantear este objetivo fueron dos. Por un lado, Billings y col. (1989) habían descrito que el PCI, al igual que otros inhibidores de proteasas, es capaz de suprimir la transformación tumoral, inducida por radiación, de células embrionarias de ratón. Por otro lado se disponía de un sistema de expresión de PCI en forma recombinante que nos permitía disponer de cantidades importantes de dicho inhibidor.

Para llevar a cabo el objetivo señalado se estudió el crecimiento celular relativo de diversas líneas celulares en presencia de PCI mediante dos técnicas diferentes: el recuento directo del número de células y la determinación indirecta con sales de tetrazolio.

IV.B.1.a. Crecimiento relativo en presencia de PCI

El ensayo por recuento directo del número de células (Apartado III.C.5.b.1.) consistió en sembrar 3 frascos con células de la línea a estudiar: un control, un frasco con PCI añadido antes de que las células se hubieran podido adherir (pre-adhesión) y un frasco con PCI añadido posteriormente a la adhesión celular (post-adhesión). Se realizaron estos dos tipos de tratamiento con el fin de determinar si el PCI podía afectar a la unión de las células al plástico o a su crecimiento una vez adheridas. El medio utilizado fue DMEM más 10% de FBS. Se realizaron sucesivos cambios de medio, y se mantuvo el PCI en aquellos frascos a los cuales se les había añadido, hasta que uno de los frascos llegó a confluencia (normalmente el control). En este momento se procedió a determinar el número de células de los tres frascos (Apartado III.C.4.c.) por recuento directo en hemocitómetro.

Este tipo de ensayo se realizó con dos líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano moderadamente diferenciadas: MDAPanc-3 y IBF-CP3; y con una línea de insulinooma de hámster, HIT.

Con las líneas MDAPanc-3 y IBF-CP3 se realizaron ensayos de pre y post-adhesión utilizando concentraciones de PCI 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (que habían sido las utilizadas por Billings y col., 1989). Los tres frascos que constituían cada ensayo se mantuvieron como promedio 10 días en cultivo. En el caso de la línea MDAPanc-3 el tiempo de post-adhesión, previo a la adición de PCI al medio de cultivo, fue aproximadamente de 69 horas; mientras que para la línea IBF-CP3 fue aproximadamente de 45 horas.

En el caso la línea de insulinoma de hámster HIT, se realizaron ensayos de post-adhesión utilizando concentraciones de PCI de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$. El tiempo de post-adhesión fue de 24 horas y las células se mantuvieron en cultivo durante 4 días.

Los resultados, expresados como porcentaje de crecimiento celular relativo a los controles (apartado III.C.5.b.1), se presentan en la Tabla IV.2 y la Figura IV.5.

Tabla IV.2.: Porcentaje de crecimiento de las líneas MDAPanc-3, IBF-CP3 y HIT en presencia de PCI.

Línea	Número de ensayos	Tratamiento	Media de porcentaje de crecimiento	Error estándar
MDAPanc-3	3	0 $\mu\text{g/mL}$ PCI	100	9,3
MDAPanc-3	3	5 $\mu\text{g/mL}$ PCI pre-adhesión	74,6	14,4
MDAPanc-3	3	5 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	79,3	13,2
MDAPanc-3	3	10 $\mu\text{g/mL}$ PCI pre-adhesión	76,6	11,3
MDAPanc-3	3	10 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	75,9	16,6
IBF-CP3	3	0 $\mu\text{g/mL}$ PCI	100	8,9
IBF-C 3	3	5 $\mu\text{g/mL}$ PCI pre-adhesión	70,8	27,2
IBF-CP3	3	5 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	74,8	20,9
IBF-CP3	4	10 $\mu\text{g/mL}$ PCI pre-adhesión	77,7	0,17
IBF-CP3	4	10 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	82,1	23,5
HIT	8	0 $\mu\text{g/mL}$ PCI	100	4,9
HIT	8	10 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	57	3,3
HIT	8	50 $\mu\text{g/mL}$ PCI post-adhesión	39,9	3,1

Con las líneas MDAPanc-3 y IBF-CP3 se observó, al añadir el PCI, una porcentaje de crecimiento respecto a células control que osciló entre el 85 y el 70 %, y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de post y pre-adhesión, así como entre las dos concentraciones de PCI utilizadas. Con la línea HIT se observaron porcentajes de crecimiento que oscilaron entre el 40-60% y que disminuyeron de manera directamente proporcional al aumento de la concentración de PCI en el medio.

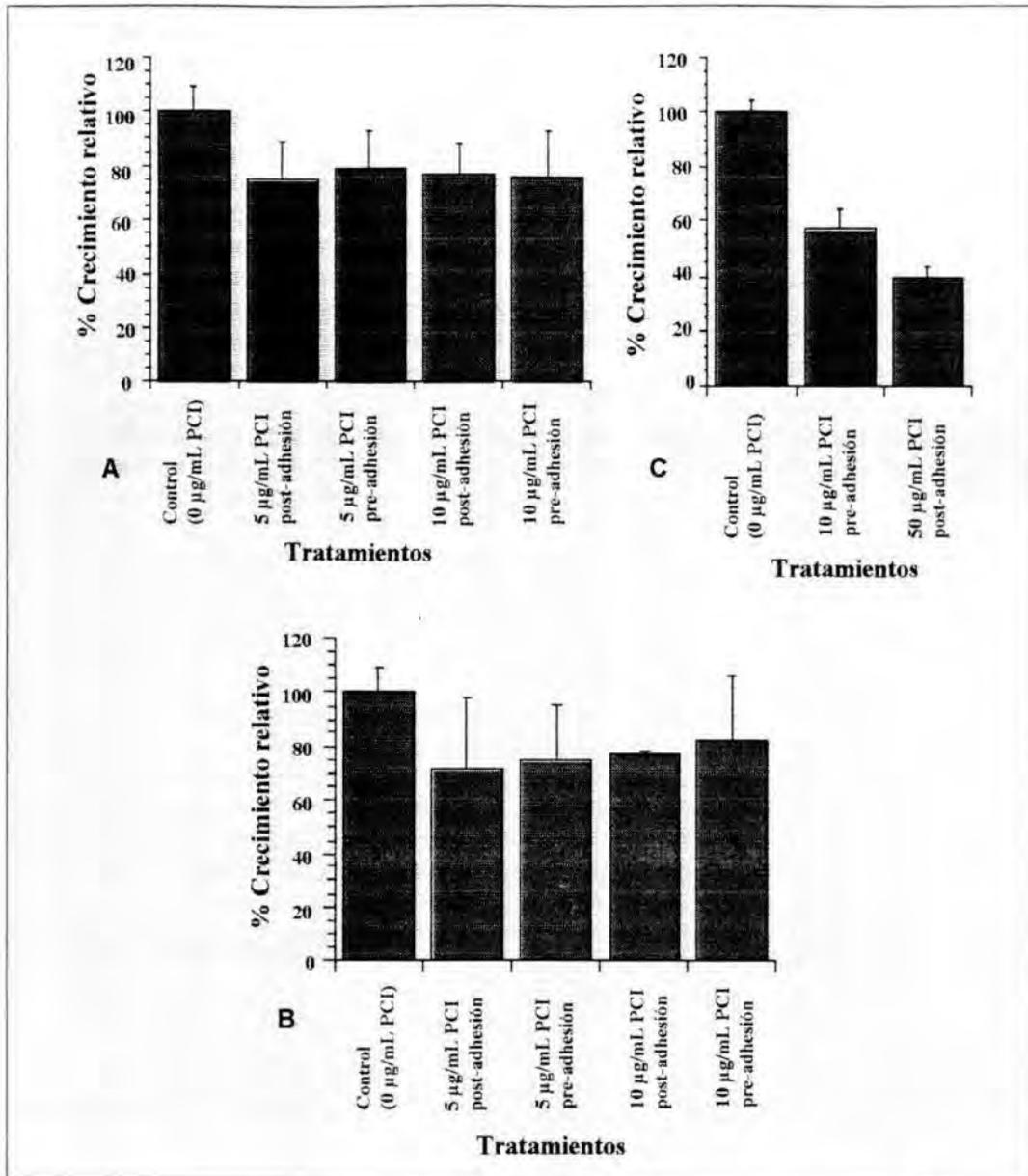


Figura IV.5.: Efecto del PCI sobre el crecimiento de las líneas tumorales MDAPanc-3 (A), IBF-CP3 (B) y HIT (C). Las células se cultivaron en medio DMEM 10% FBS hasta que los controles llegaron a confluencia. Los resultados son la media de entre 3 y 8 experimentos. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar.

Dado que los resultados obtenidos con las líneas MDAPanc-3 y IBF-CP3 presentaban una elevada variabilidad se decidió probar el efecto del PCI en otras líneas celulares, así como utilizar otro tipo de ensayo para la determinación del crecimiento relativo, la determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio.

El ensayo por determinación indirecta del número de células consistió en sembrar, en una placa de 96 pocillos, 6 réplicas por tratamiento. Se utilizó medio DMEM 10% FBS, con PCI en el caso de las células tratadas. Se realizaron sucesivos cambios de medio, manteniendo

el PCI en los pocillos en que se había añadido. Finalmente se estimó el número de células mediante sales de tetrazolio (apartado III.C.5.b.2) después de un número determinado de días.

Este tipo de ensayo se realizó con 2 líneas de adenocarcinoma pancreático humano distintas a las empleadas anteriormente: Capan-1, muy diferenciada, y Panc-1, poco diferenciada. Las concentraciones de inhibidor ensayadas fueron de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones con las que previamente se había observado una clara inhibición del crecimiento de la línea de insulinooma de hámster HIT. Las células se trataron con PCI durante 23 días en el caso de la línea Capan-1 y 10 días en el caso de Panc-1. Se realizaron 3 ensayos diferentes para cada una de las líneas.

Los resultados de la determinación del porcentaje de crecimiento celular relativo a los controles (apartado III.C.5.b.2) de uno de los ensayos realizados (representativo del resto) se presentan en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3.: Porcentajes de crecimiento de las líneas Capan-1 y Panc-1 creciendo en presencia de PCI (relativo a células control).

Línea	Concentración de PCI	Media de porcentaje de crecimiento	Error estándar
Capan-1	0 $\mu\text{g/mL}$	100	9,9
Capan-1	10 $\mu\text{g/mL}$	50	5,8
Capan-1	50 $\mu\text{g/mL}$	44,8	5,2
Panc-1	0 $\mu\text{g/mL}$	100	3,64
Panc-1	10 $\mu\text{g/mL}$	82,22	2,77
Panc-1	50 $\mu\text{g/mL}$	71,14	3,63

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis empleando la *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que para todos los tratamientos las medias fueron diferentes a la media control, con un nivel de significación muy elevado (inferior a 0,005). Por tanto, se podía concluir que el PCI tiene efectos inhibitorios muy significativos sobre el crecimiento de las líneas Capan-1 y Panc-1 cultivadas en medio DMEM+10% FBS.

Los datos se representan gráficamente en la Figura IV.6. Como se puede observar, el crecimiento de las líneas Capan-1 y Panc-1 se vio inhibido de forma muy significativa por la presencia de PCI en el medio de cultivo, a las dos concentraciones ensayadas. En el caso de la línea Capan-1, la inhibición observada fue de alrededor del 50 % y no se observaron diferencias entre las dos concentraciones ensayadas. En Panc-1 la inhibición aumentó de

manera proporcional al aumento de concentración de PCI, alcanzando un valor máximo del 29 %.

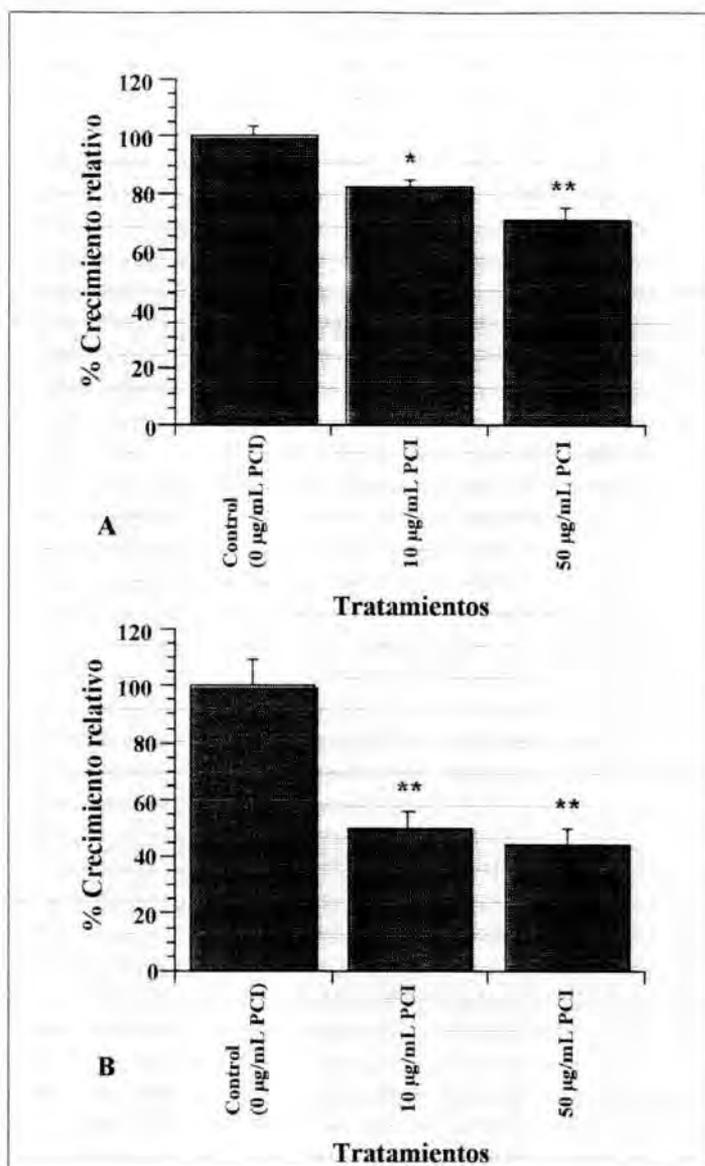


Figura IV.6.: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre el crecimiento de las líneas de adenocarcinoma pancreático Panc-1 (A) y Capan-1 (B). Las células se cultivaron en medio DMEM 10% FBS durante 23 días para la línea Capan-1 y 10 días para la línea Panc-1. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,005$ y ** $p < 0,001$.

Una vez observado que el PCI tenía un efecto inhibitorio del crecimiento en células cultivadas en medio con suero, se estudió si tenía algún efecto sobre células creciendo en medio sin suero, tanto en ausencia como en presencia de factores de crecimiento. Para ello se realizaron ensayos de proliferación por determinación indirecta del número de células (III.C.5.b.5.). Así, se sembraron en una placa de 96 pocillos, 6 réplicas por tratamiento, y se mantuvieron las células en medio DMEM 10% FBS durante 72 h. Después se lavaron las células con PBS y se les añadió medio libre de suero (DMEM + 0,1% BSA). Pasadas 24 h se

lavarón las células nuevamente con PBS y se añadieron los tratamientos en medio libre de suero más selenito sódico y transferrina. Los tratamientos realizados fueron con EGF, insulina, PCI o combinaciones del PCI con uno de los factores de crecimiento. Después de 72 h se estimó el número de células mediante sales de tetrazolio (apartado III.C.5.b.2.).

Este tipo de ensayo se realizó con la línea Capan-1. La concentración de inhibidor ensayada fue de 50 µg/mL, con la que previamente se había observado una clara inhibición del crecimiento de esta misma línea en medio con suero después de 23 días de tratamiento.

Se realizaron cuatro ensayos diferentes partiendo de distintas densidades celulares. Los resultados de uno de ellos, representativo de los demás, se presentan en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4.: Porcentaje de crecimiento de células de la línea Capan-1 en presencia de EGF, insulina y/o PCI (relativo a células control).

Tratamiento	Media de porcentaje de crecimiento	Error estándar
Control	100	16,3
PCI 50 µg/mL	126,7	11,1
EGF 10 ng/mL	223,7	11,4
EGF 10 ng/mL + PCI 50 µg/mL	109,4	19,4
Insulina 5 µg/mL	148,6	10,4
Insulina 5 µg/mL + PCI 50 µg/mL	150,6	14,3

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis empleando la *t* de Student. Como se puede observar en la figura IV.7, tanto el EGF como la insulina tuvieron un efecto estimulador del crecimiento de la línea Capan-1, más pronunciado en el caso del EGF. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Oustry et al (1990). La presencia del PCI en el medio suprimió completamente la estimulación de la proliferación debida al EGF, pero no tuvo ningún efecto significativo sobre la estimulación del crecimiento inducido por la insulina. Dado que el PCI revierte el efecto estimulador del EGF, se podría explicar su acción inhibitoria del crecimiento por la competencia con el EGF, al impedir que la célula disponga de este factor de crecimiento para su división.

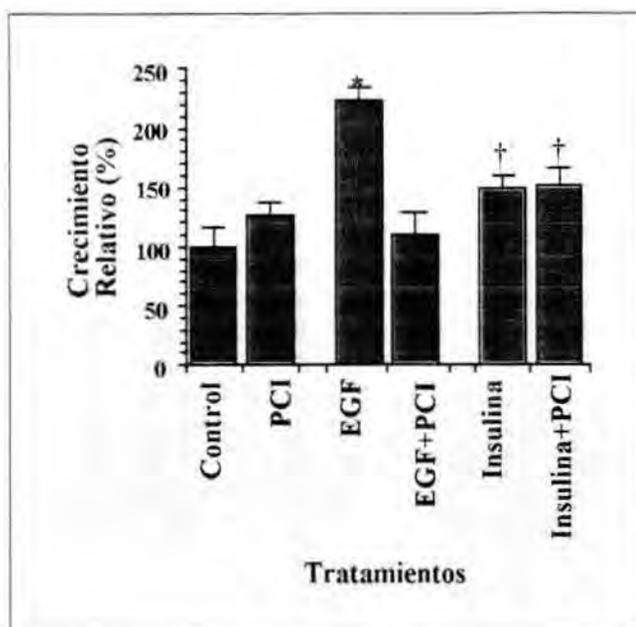


Figura IV.7.: Inhibición por el PCI del efecto estimulador del crecimiento del EGF en células Capan-1 cultivadas en medio sin suero. Los valores mostrados son la media \pm sem de 6 réplicas de cada tratamiento. Las diferencias significativas respecto a los valores del control en test *t* de Student están indicadas † $P < 0,05$, * $P < 0,001$. Los resultados que se muestran son representativos de 4 experimentos diferentes.

IV.B.1.b. Curvas de crecimiento.

Una vez se había determinado que el PCI inhibía la proliferación de diferentes líneas celulares, se procedió a realizar la curva de crecimiento de la línea Capan-1, que era la que presentaba una mayor inhibición en respuesta al PCI. Una curva de crecimiento permite determinar tres parámetros celulares importantes: el tiempo de latencia, el tiempo de duplicación, y la densidad de saturación en monocapa, así como averiguar si dichos parámetros se veían afectados por la presencia de PCI.

El ensayo de determinación de la curva de crecimiento (Apartado III.C.5.b.3.) consistió en sembrar 1×10^5 células en pocillos de 10 cm^2 (45 pocillos para cada tratamiento: control, PCI $1 \mu\text{g/mL}$ y PCI $10 \mu\text{g/mL}$). El medio empleado fue DMEM más 10% FBS. Se realizaron los sucesivos cambios de medio cada 4 días añadiendo PCI fresco en cada cambio. Diariamente se determinó por recuento directo (Apartados III.C.4.b. y III.C.4.c.) el número de células de tres pocillos-réplica de cada tratamiento. El ensayo se prolongó durante 15 días.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura IV.8., que muestra la evolución del crecimiento celular para los 3 tratamientos.

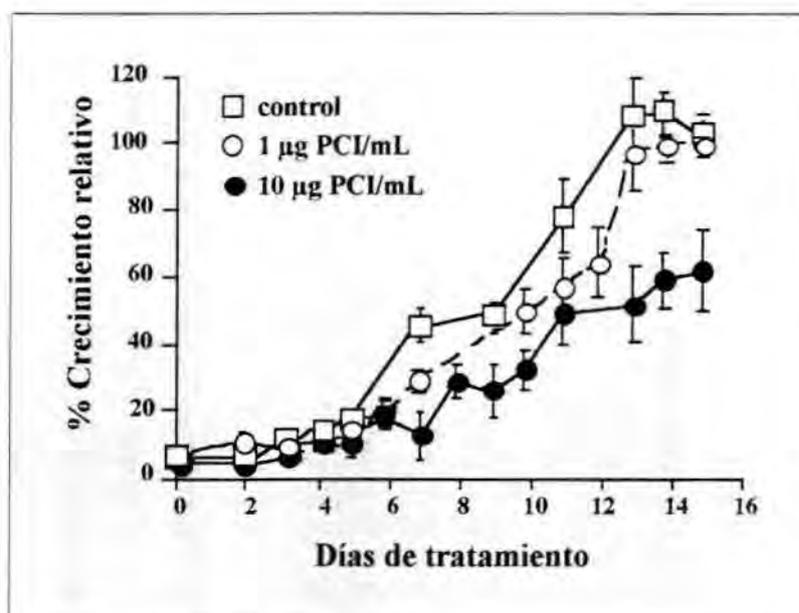


Figura IV.8. Curvas de crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 cultivadas en DMEM suplementado con 10 % FBS: control (círculos vacíos), células tratadas con 1 µg/mL de PCI (cuadrados) y 10 µg/mL de PCI (círculos llenos) añadido al medio de cultivo. Cada punto es la media de tres determinaciones. Las barras muestran el error estándar.

Los resultados obtenidos revelaron que el tiempo de latencia no se vio afectado por el tratamiento con PCI, siendo en todos los casos de 5 días. En cuanto a los tiempos de duplicación (Tabla IV.5.) se observó que las células tratadas con una concentración de 10 µg/mL de PCI presentan un crecimiento significativamente más lento que las control, fenómeno claramente observable a partir de los 12 días. Además, la densidad a la cual alcanzaban la fase estacionaria fue significativamente más baja que en las del control (aproximadamente la mitad). En cuanto a las células tratadas con 1 µg/mL de PCI, crecieron de forma algo más lenta que las control, y alcanzaron la fase estacionaria a una densidad similar a éstas.

Tabla IV.5. Tiempos de duplicación celular de las células Capan-1 tratadas con PCI.

Tratamiento	Tiempo de duplicación (h)
Control (0 µg/mL PCI)	85
1 µg/mL PCI	90
10 µg/mL PCI	130

El hecho de que el efecto del PCI no se observe hasta después de ciertos días de tratamiento está en concordancia con los resultados de los ensayos de proliferación descritos en los apartados anteriores, y se puede concluir que su efecto inhibitorio del crecimiento celular es a largo plazo y no inmediato.

IV.B.1.c. Pretratamiento con PCI: efectos sobre el crecimiento

Los estudios del efecto del PCI sobre el crecimiento celular se completaron con ensayos para determinar el efecto del tratamiento prolongado con dicho inhibidor. Cada ensayo (Apartado III.C.5.b.4.) consistió en partir de un pocillo de una placa de 12 con células control, y un pocillo con células tratadas con 50 µg/mL de PCI, que se mantuvieron en cultivo durante un mínimo de 4 semanas. Los cambios de medio (DMEM + 10%FBS) se realizaron dos veces por semana añadiendo PCI fresco a las células tratadas. Las células se tripsinizaron cada vez que llegaron a confluencia y se sembró 1/10 de las mismas. Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento deseado, las células se sometieron a tratamiento con distintas concentraciones de PCI, o bien a la ausencia del mismo, y se realizaron ensayos de proliferación y curvas de crecimiento por determinación del número de células con sales de tetrazolio.

Este tipo de ensayo se realizó con la línea Capan-1 y la línea de insulinoma iCAII-2 (línea derivada de un ratón transgénico con una construcción del antígeno T del virus de simio 40 y una secuencia reguladora de la anhidrasa carbónica). En el caso de la línea Capan-1 se realizaron tanto ensayos de proliferación como curvas de crecimiento con las células pretratadas con PCI. Con la línea iCAII-2 sólo se llevaron a cabo ensayos de proliferación.

En la Tabla IV.6 se presentan los resultados de la determinación del porcentaje de crecimiento celular de la línea Capan-1. Los porcentajes de las células pretratadas con PCI durante diferentes tiempos se expresan de manera relativa a los controles.

Tabla IV.6.: Porcentaje de crecimiento de células de la línea Capan-1 pretratadas durante diferentes tiempos con PCI y posteriormente cultivadas en presencia o ausencia de PCI.

Días de pretratamiento con 50 µg/mL PCI	Días de tratamiento con PCI	[PCI] (µg/mL) en el tratamiento	Número de réplicas	Media de porcentaje de crecimiento	Error estándar
-	11	0	8	100	2,8
28	11	0	8	48,7	2,7
28	11	0,01	8	43,6	3,9
28	11	1	8	39	4,2
28	11	50	8	42	3,6
-	14	0	8	100	2,6
34	14	0	8	57,1	2,0
34	14	0,01	8	55,4	2,3
34	14	1	8	52,4	3,9
34	14	50	8	56,3	2,0

Los resultados obtenidos en todos los casos fueron muy similares (Figura IV.9). El número final de células en los pocillos donde se sembraron células pretratadas, que se

cultivaron a continuación en ausencia de PCI, fue aproximadamente la mitad al observado en los pocillos con células no pretratadas cultivadas en el mismo medio. En los pocillos en los que se mantuvo el PCI en el medio, el crecimiento de las células pretratadas resultó incluso algo inferior al observado en ausencia de PCI. Por lo tanto, se puede concluir que una vez las células han crecido en presencia de PCI, su crecimiento es más lento (respecto al de células que han crecido en ausencia del inhibidor) y este efecto se mantiene incluso en ausencia de PCI.

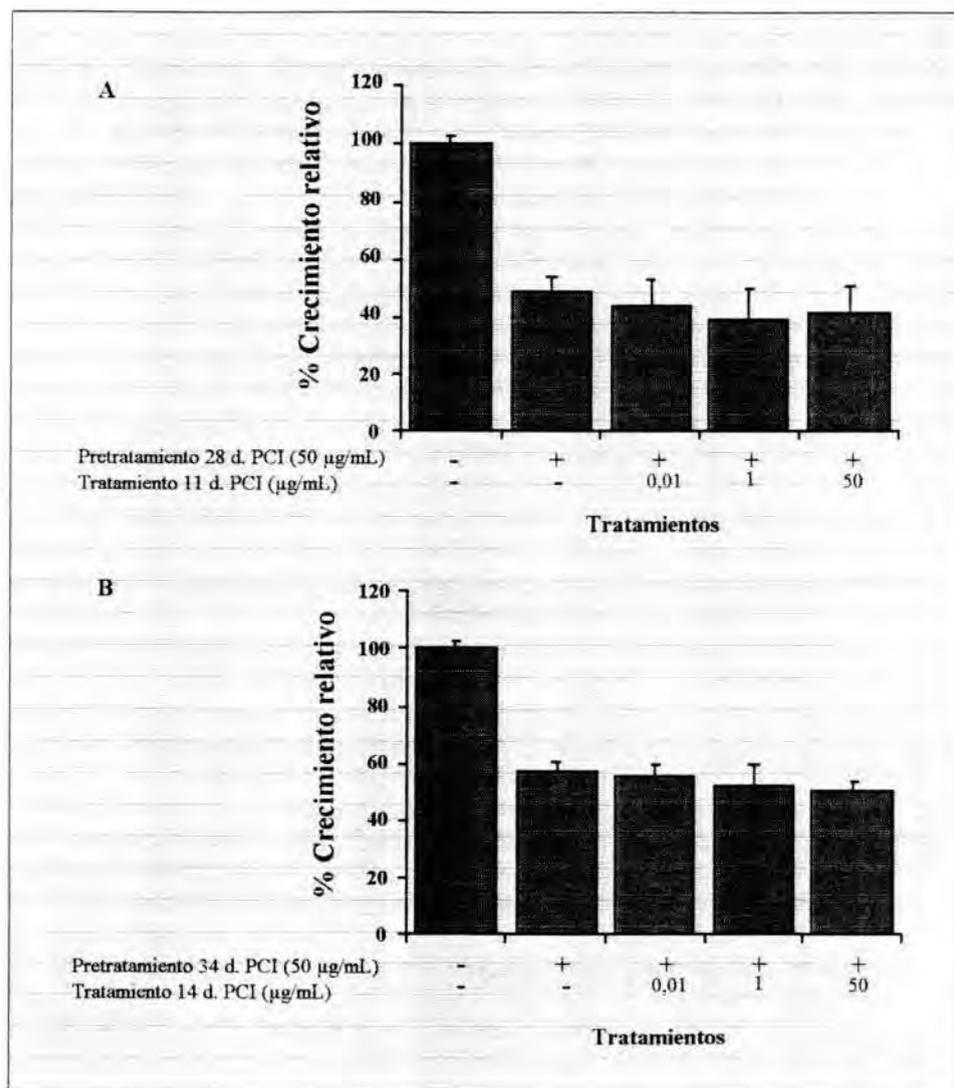


Figura IV.9. : Ensayos de proliferación de la línea Capan-1 pretratada con 50 µg/mL de PCI. El número de células se expresa en relación al de células control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). Se presenta el resultado de dos experimentos: A, pretratamiento 28 días, tratamiento 11 días; B, pretratamiento 30 días, tratamiento 5 días. Las barras indican el error estándar.

Los resultados anteriormente descritos llevaron a realizar una nueva serie de experimentos a fin de obtener una curva de crecimiento de las células Capan-1 pretratadas (durante 43 días) y no pretratadas con PCI, curva que se presenta en la Figura IV.10. Como se puede observar claramente, el crecimiento de las células pretratadas en ausencia de PCI es

mucho más lento que el de las no pretratadas, haciéndose la diferencia claramente significativa a partir de los 13 días de cultivo. Las células pretratadas mantenidas en presencia de PCI presentaron un crecimiento aún más lento. Al igual que se ha descrito para las curvas de crecimiento y las proliferaciones explicadas en los apartados IV.B.1.a y IV.B.1.b., las células pretratadas con PCI sólo presentan un crecimiento más lento, respecto a células control, después de 12 o más días en cultivo, es decir, es un efecto a largo plazo.

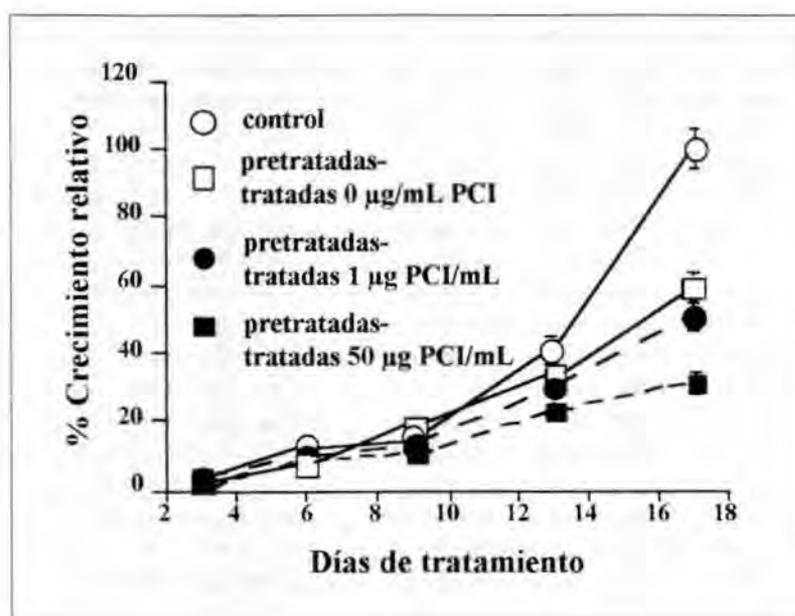


Figura IV.10.: Curva de crecimiento de células Capan-1 pretratadas y no pretratadas con PCI. El pretratamiento duró 6 semanas y en todos los casos fue con 50 µg/mL de PCI. Los tratamientos posteriores con PCI fueron de 0 µg/mL (control, círculos vacíos y pretratadas, cuadrados vacíos), 1 µg/mL (círculos llenos) y 50 µg/mL (cuadrados llenos). El número de células se expresa en relación al número final de células control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). Las barras muestran el error estándar.

La conclusión que se derivó de estos ensayos es que las células cultivadas durante, al menos, 28 días en presencia de PCI (a una concentración de 50 µg/mL) crecen mucho más lentamente que las células control, aunque se les retire el PCI del medio. En otras palabras, el tratamiento con PCI durante al menos 4 semanas parece tener un efecto inhibitorio a largo plazo sobre el crecimiento de las células, efecto que se mantiene aunque la proteína ya no esté presente en el medio.

Los resultados de los ensayos de proliferación de las células de la línea iCAII-2 pretratadas con PCI durante diferentes tiempos se presentan en la Tabla VI.7. Se realizaron

tres ensayos independientes, con tiempos de pretratamiento y tratamiento diferentes. Los pretratamientos fueron de 13, 20 y 30 días y los tratamientos de 7, 8 y 5 días, respectivamente.

Tabla IV.7.: Porcentaje de crecimiento de células de la línea iCAII-2 pretratadas durante diferentes tiempos con PCI y posteriormente cultivadas en presencia o ausencia de PCI.

Días de pretratamiento con 50 µg/mL PCI	Días de tratamiento con PCI	[PCI] (µg/mL) en el tratamiento	Número de réplicas	Media de porcentaje de crecimiento	Error estándar
-	7	0	8	100	8,3
13	7	0	8	51,4	3,3
13	7	0,01	8	65,8	4,2
13	7	1	8	55,2	6,1
13	7	50	8	40,6	3,6
-	8	0	8	100	6,8
20	8	0	8	50,4	8,8
20	8	0,01	8	44,8	6,9
20	8	1	8	50,7	5,3
20	8	50	8	46,8	6,1
30	5	0	8	100	18,3
30	5	0	8	51,4	4,9
30	5	0,01	8	26,1	2,9
30	5	1	8	29,5	4,9
30	5	50	8	31,1	3,2

Al igual que lo que ocurría en el caso de Capan-1, las células iCAII-2 pretratadas con PCI, y cultivadas a continuación en ausencia de la proteína, presentan un crecimiento muy inferior, aproximadamente la mitad, al de las células no pretratadas. Si el PCI se mantiene en el medio de cultivo a una concentración 50 µg/mL, la tasa de crecimiento de las células pretratadas se ve aún más reducida siendo el efecto más importante cuanto más largo ha sido el pretratamiento (Figura IV.11.). Por tanto, el efecto inhibitorio a largo plazo del tratamiento con PCI observado en el caso de Capan-1 se produce también en la línea celular iCAII-2, y su magnitud es muy similar. Aunque a menos días porque las células iCAII-2 se duplican más deprisa.

El efecto inhibitorio a largo plazo del tratamiento con PCI observado en las líneas Capan-1 y iCAII-2, recuerda al observado por Ben-Bassat y col. (1997). Al tratar con el anticuerpo AG 1478 (bloqueante selectivo de la actividad quinasa del receptor de EGF) queratinocitos inmortalizados con el virus de papiloma humano 16 aparece una inhibición del crecimiento del que las células no se recuperaran aunque cese el tratamiento.

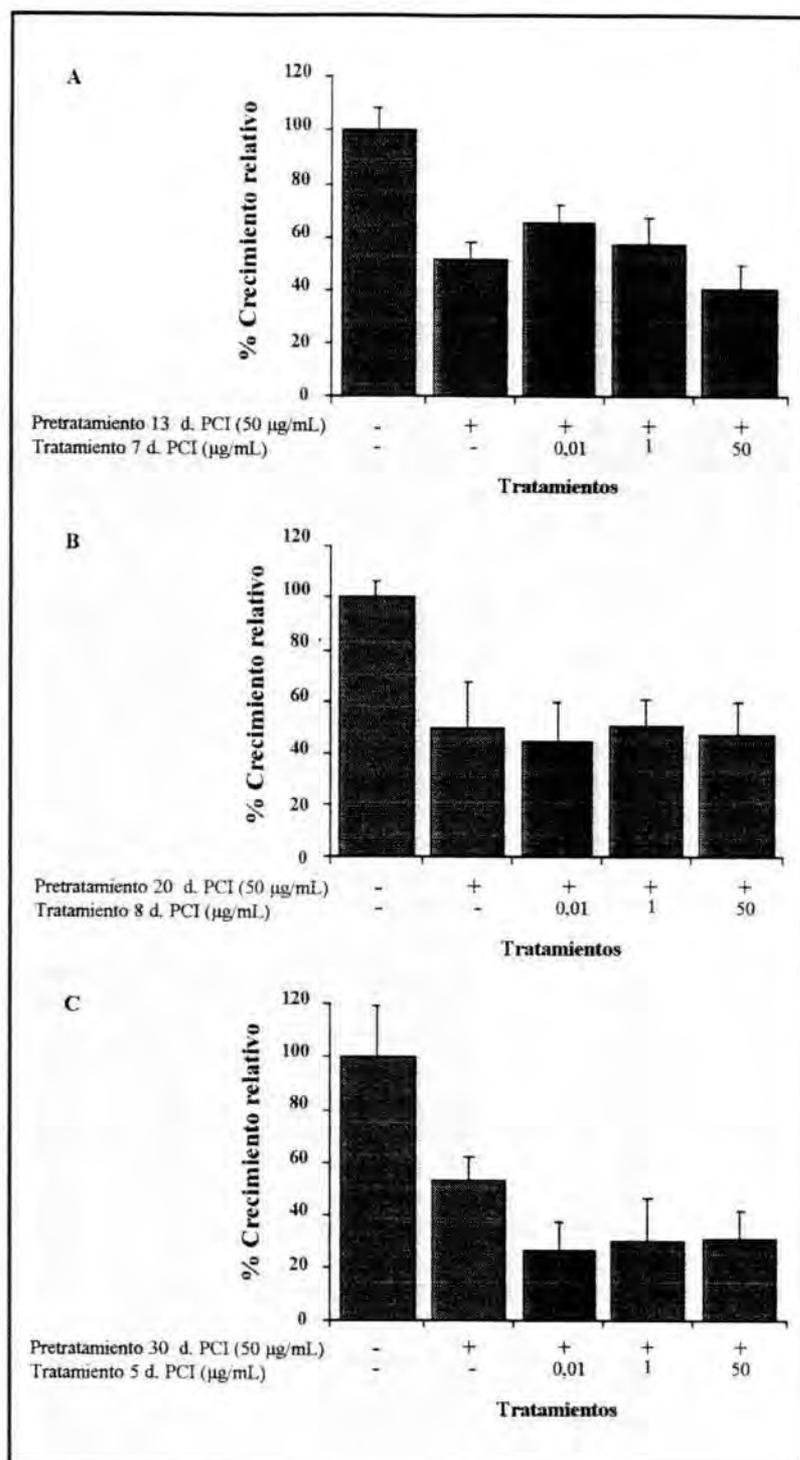


Figura IV.11.: Ensayos de proliferación de la línea iCAII-2 pretratada con 50 µg/mL de PCI. El número de células se expresa en relación al de células control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). Se presenta el resultado de tres experimentos: A, pretratamiento 13 días, tratamiento 7 días; B, pretratamiento 20 días, tratamiento 8 días y C, pretratamiento 30 días, tratamiento 5 días. Las barras indican el error estándar.

IV.B.1.d. Citotoxicidad del PCI

En los experimentos anteriores se había observado que el PCI tiene un efecto inhibitor del crecimiento de diferentes líneas celulares tanto a corto como a largo plazo. Con el fin de establecer si dicho efecto era debido a que el PCI induce citotoxicidad de forma inespecífica, o

si por contra el efecto es específico (originado por la alteración de algunos procesos celulares) se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1.

El ensayo de citotoxicidad (apartado III.C.5.c.1.) consistió en poner en contacto las células con el PCI y seguir su viabilidad y mortalidad durante 24 h. Para ello se sembraron en una placa de 24 pocillos las células de la línea Capan-1 y se dejaron crecer durante 24 h, tiempo suficiente para que estuvieran perfectamente adheridas. Se determinó la autofluorescencia de las células y se inició el ensayo incubándolas con el fluoróforo BCEF-AM, que permite detectar células viables. Una vez determinado el número de células viables iniciales se trataron las células con concentraciones de PCI de 0 a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se les añadió yoduro de propidio, fluoróforo marcador de células muertas. A partir de este momento se siguió la evolución de los dos fluoróforos durante 24 h. Se considera que un producto es citotóxico si a una determinada concentración, en este periodo de tiempo, produce una disminución de viabilidad respecto a las células control (no tratadas con el producto) que conlleva un aumento de la mortalidad.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura IV.12. En esta se representa la variación de la intensidad de la fluorescencia para cada uno de los fluoróforos respecto al tiempo para los diferentes tratamientos con PCI.

Como puede observarse en el caso de la BCEF-AM, que indica viabilidad celular, no hay ninguna diferencia significativa entre el cultivo control y los tratados con PCI. La disminución de intensidad que se observa no es más que la pérdida de fluorescencia por parte del propio fluoróforo a lo largo del tiempo. Y respecto al yoduro de propidio tampoco se observa ninguna diferencia significativa respecto al control, y el ligero aumento de intensidad que se observa es el mismo para el control y los tratamientos, indicando que se trata de una muerte celular espontánea no debida a la presencia del PCI. Así, se puede concluir que el PCI no es citotóxico para la línea Capan-1, resultado que concuerda con el efecto observado en los diferentes ensayos de proliferación. La inhibición del crecimiento no se produce de manera drástica a las pocas horas de iniciado el tratamiento con el PCI, sino que el efecto observado siempre es a largo plazo, después de varios días de tratamiento, y en todos los ensayos implica una velocidad de crecimiento más lenta para las células tratadas con el inhibidor.

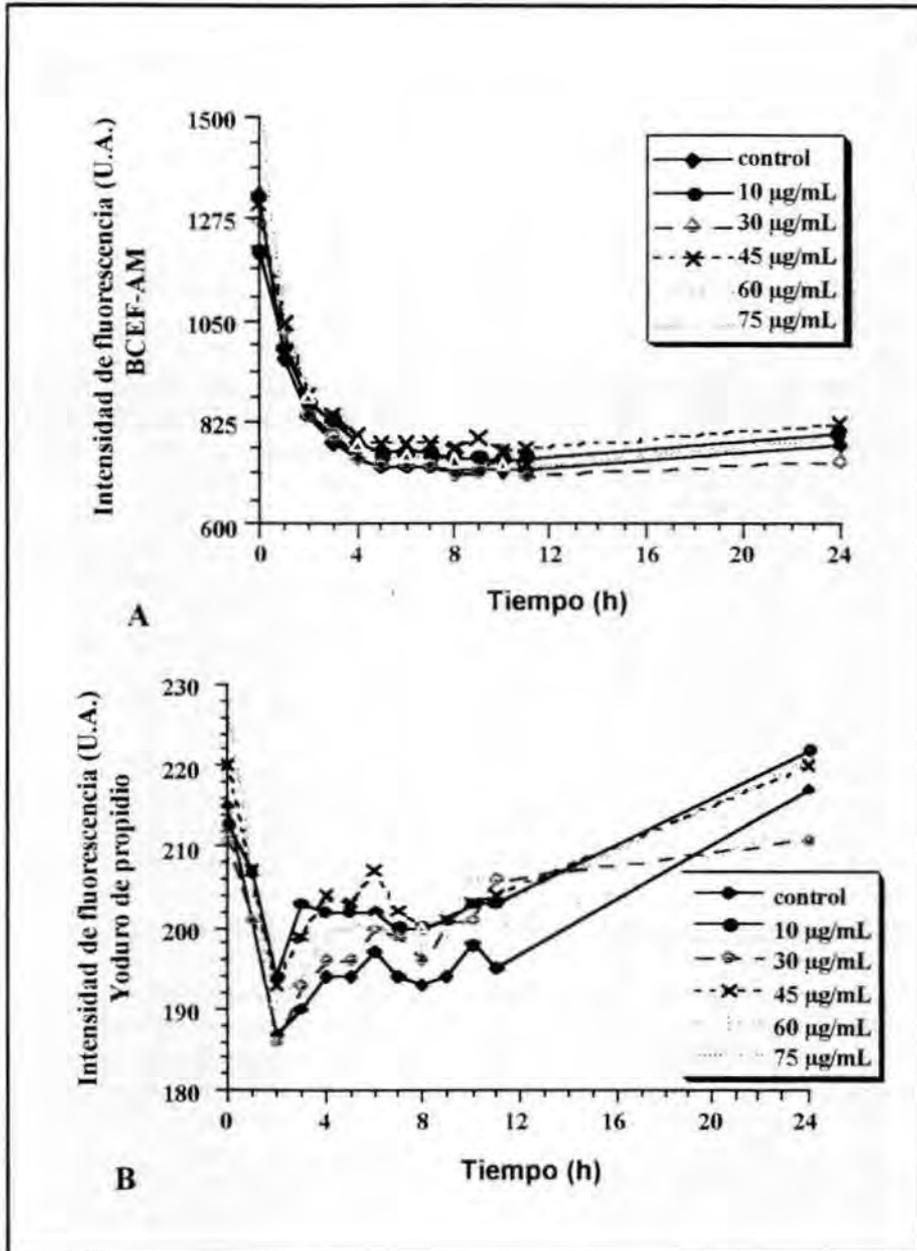


Figura IV.12. : Ensayo de citotoxicidad del PCI sobre la línea Capan-1. Se sembraron 160.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Después de 24 h de cultivo se les añadió el fluoróforo de viabilidad, BCEF-AM, el fluoróforo para ácidos nucleicos, yoduro de propidio, y las dosis de PCI a ensayar: 0, 10, 30, 45, 60 y 75 µg/mL. Se determinó la intensidad de la fluorescencia de los dos fluoróforos durante 24 h: A, BCEF-AM y B, yoduro de propidio (el descenso de intensidad que se observó para este fluoróforo durante las dos primeras horas fue debido a que el medio de cultivo acabado de añadir, sin tamponar por efecto del CO₂ del incubador, interfiere en el valor de fluorescencia del yoduro de propidio). Los valores se determinaron por cuadruplicado y se representa la media.

IV.C. EFECTO DEL PCI EN MODELOS ANIMALES

El segundo objetivo general de esta tesis era el estudio del efecto del PCI sobre el desarrollo de tumores en modelos animales, necesario siempre que se analizan posibles nuevos fármacos. Para ello se emplearon tres modelos animales, uno que permitió determinar si el PCI afecta a la capacidad metastásica de las células tumorales y otros dos que permitieron evaluar si tiene alguna influencia sobre la aparición y desarrollo de tumores *in vivo*.

En todos estos modelos de experimentación se escogió el ratón por su pequeño tamaño, su corto ciclo reproductivo, y dado el elevado número de trabajos que se han realizado con ellos.

IV.C.1. INHIBICIÓN POR EL PCI DE LA APARICIÓN DE METÁSTASIS EN EL MODELO DEL MELANOMA B16F10.

La característica general que identifica a los tumores malignos es su capacidad de diseminación, que conduce a la formación de metástasis. Durante el proceso de invasión, la célula tumoral realiza los pasos siguientes: adhesión a un nuevo tipo celular, proteólisis de la matriz extracelular y emigración. Esta última etapa está regulada, entre otros factores, por factores de crecimiento como el EGF (Stracke y Liotta, 1992).

Dada la importancia de hallar fármacos antimetastásicos, se decidió estudiar si el PCI, además de inhibir la proliferación celular de células tumorales y suprimir el efecto estimulador del crecimiento del EGF, podía tener algún efecto en el establecimiento de metástasis.

Para ello se utilizó un modelo animal de formación de metástasis. Éste consiste en la inoculación de células de la línea de melanoma de ratón B16F10, vía intraesplénica, en ratones singénicos que al cabo de 7 días empiezan a desarrollar metástasis en el hígado.

Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Vidal Vanaclocha de la universidad del País Vasco.

Se emplearon tres grupos de ratones: un grupo de ratones control, un grupo de ratones que posteriormente a la inoculación se trataron con PCI vía intraperitoneal y otro grupo a los que se les inocularon células que habían sido tratadas previamente en cultivo con PCI (Apartado III.G.1). El número de células inoculado fue el mismo en todos los casos. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical 11 días después de la inoculación, y se les extrajo el hígado para contar el número de focos metastásicos presentes.

Dicho recuento reveló que en el grupo control había un promedio de 23 ± 7 focos, en los ratones que fueron tratados con PCI vía intraperitoneal había 27 ± 3 focos, y en los

ratones que fueron inoculados con células pretratadas con PCI el número de focos fue de 4 ± 1 . Había, por tanto, una clara disminución en la capacidad metastásica de las células pretratadas con PCI.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios de proliferación celular, donde se había observado que células pretratadas con PCI crecían más lentamente que las control, aún después de retirar el inhibidor. Por lo tanto, parecería que el PCI modifica alguna característica de la célula tumoral que implica la pérdida de su capacidad metastásica. Puesto que se ha observado que el PCI suprime la acción estimuladora del crecimiento del EGF, podría ser que la inhibición de la capacidad metastásica de las células de melanoma se debiera a una desaparición de receptores de EGF de la membrana de la célula tumoral por endocitosis del receptor al unir ligando (PCI en nuestro caso). Por consiguiente, la célula quedaría parcialmente desensibilizada al EGF por desaparición de los receptores de membrana (*down-regulation*), y al inyectar las células en el animal, el efecto promotor de la metástasis del EGF presente en condiciones fisiológicas sería menor. Otra posible explicación también ligada al EGF es que se ha descrito que la activación del EGF-R puede influir en la interacción de las células con determinados componentes de la matriz. Así, el EGF-R, una vez activado, modula la organización de las subunidades de integrinas (proteínas implicadas en la unión de la célula a la matriz extracelular), lo que puede aumentar la capacidad de las células en algunas etapas de la cascada metastásica (Basson y col., 1992; Khazaie y col., 1993; van der Heyden y col., 1997). Por lo tanto, si el PCI compite con el EGF, se podría producir una menor activación del receptor que podría afectar a la capacidad metastásica de la célula.

IV.C.2. INHIBICIÓN POR EL PCI DE TUMORES IMPLATADOS EN RATONES ATÍMICOS.

Los estudios de crecimiento de células tumorales humanas *in vivo* se realizaron con ratones atímicos a los que se inocularon, por vía ectópica, células de la línea tumoral humana Capan-1. Estos ratones no las rechazan, debido a que tienen su respuesta inmunitaria muy reducida. La ventaja de este modelo sobre los cultivos *in vitro* es que está más cercano a un tumor real, pues las células se desarrollan en forma de tumor sólido, que presenta irrigación y está sometido a los factores fisiológicos.

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra Frazier del M.D. Anderson Cancer Center de Houston.

Una vez el tumor alcanzó un tamaño mínimo de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ se inició un tratamiento diario, también subcutáneo, con diferentes dosis de PCI durante 32 días, con el fin de evaluar la sensibilidad al PCI de los tumores. Las dosis de PCI con que se trataron los tumores fueron de 11, 60 y 120 $\mu\text{g}/\text{día}$.

El efecto del PCI sobre el crecimiento tumoral se determinó por comparación del crecimiento relativo de los tumores de los ratones control respecto al de los ratones tratados con diferentes dosis de PCI (Apartado III.G.2).

Los resultados que se obtuvieron se representan gráficamente en la Figura IV.13. A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis mediante una *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento relativo a cada dosis de PCI con los controles.

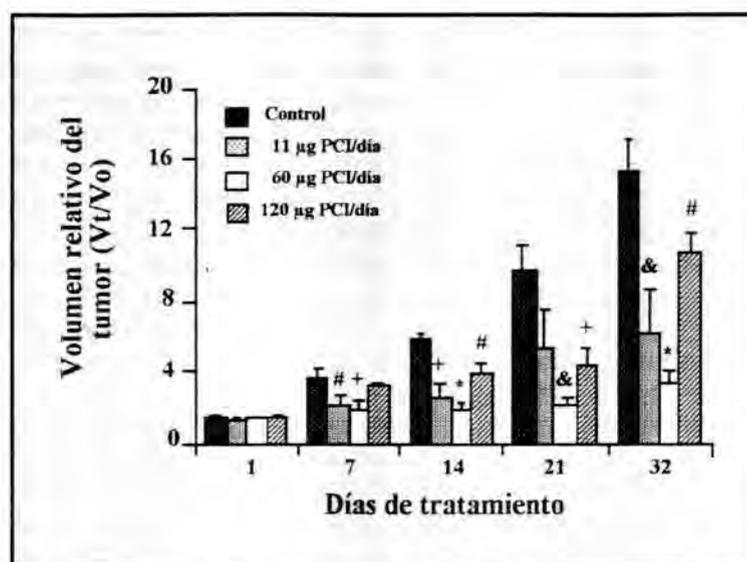


Figura IV.13.: Supresión del crecimiento tumoral de Capan-1 en ratones atímicos. Los tumores inducidos se empezaron a tratar diariamente con varias dosis de PCI disuelto en PBS, 12 días después de la inyección de las células. Los ratones control se trataron con PBS. Cada grupo estaba formado por 5 ratones, y los tumores se midieron semanalmente. Los valores que se muestran corresponden a las medias \pm s.e.m. Los símbolos sobre las barras denotan diferencias significativas respecto al grupo control con # $P < 0,1$, + $P < 0,025$, & $P < 0,01$, * $P < 0,001$.

A partir de los resultados del contraste de hipótesis, se puede concluir que, ya desde el principio del tratamiento, se observaron diferencias en el crecimiento de los tumores tratados respecto a los controles. Estas fueron muy significativas al finalizar el tratamiento para las tres dosis ensayadas. La dosis con un nivel de significación más elevado para el test realizado fue la de 60 µg/día, con un nivel de confianza de más del 99.9%, seguida por la dosis de 11 µg/día con un nivel de confianza de más del 99% y finalmente la dosis de 120 µg/día con un nivel de confianza de más del 90%.

También se calcularon los tiempos de duplicación del tumor para los diferentes tratamientos (Apartado III.G.2). Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Tabla IV.8., donde se expresa la media y el error estándar del tiempo de duplicación para los cinco ratones de cada grupo.

Tabla IV.8.: Tiempos de duplicación de los tumores implantados en ratones atímicos y posteriormente tratados con o sin PCI.

Tratamiento	Tiempo de duplicación (días)	Error estándar
Control	4,32	0,68
11 $\mu\text{g}/\text{día}$ PCI	9,06	1,99
60 $\mu\text{g}/\text{día}$ PCI	19,49	3,02
120 $\mu\text{g}/\text{día}$ PCI	5,78	0,61

A partir de estos datos se realizó el mismo contraste de hipótesis que para los volúmenes relativos. El resultado fue que para las dos dosis en las que había resultado más significativa la variación en volumen relativo, 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 11 $\mu\text{g}/\text{día}$, las medias del tiempo de duplicación fueron significativamente diferentes a la media control, con un nivel de significación muy elevado, concretamente inferior al 0,005 para la dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ e inferior al 0,1 para la dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{día}$. Por lo tanto, se puede concluir que el PCI aumentó significativamente el tiempo de duplicación de los tumores.

Los datos se representan gráficamente en la Figura IV.14. Como se puede observar el tiempo de duplicación del tumor cuando se trató con una dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{día}$ de PCI fue 2 veces superior al de los tumores control, y para la dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ el efecto fue muy superior siendo el tiempo de duplicación 4,5 veces superior al control. Cabe recordar que en las curvas de crecimiento con la línea Capan-1 en presencia de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ también se había observado un aumento del tiempo de duplicación de las células. Para la dosis de 120 $\mu\text{g}/\text{día}$ aunque no se observa una diferencia significativa en cuanto al tiempo de duplicación del tumor, si bien se observan diferencias significativas en el volumen final del mismo. Esto indica que en todos los casos el PCI inhibió el crecimiento de los tumores implantados.

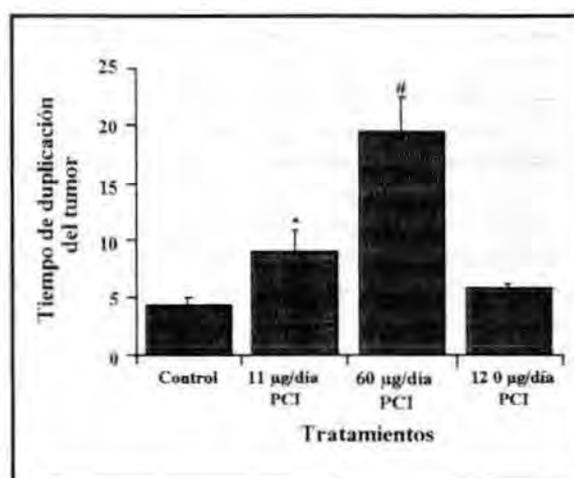


Figura IV.14.: Efecto del PCI sobre el tiempo de duplicación de tumores inducidos en ratones atímicos. Los tiempos de duplicación se calcularon a partir de los volúmenes de los tumores. Los datos representan la media \pm s.e.m., $n=5$. Los símbolos sobre las barras denotan diferencias significativas respecto al grupo control con * $P<0,1$, # $P<0,005$.

En la Tabla IV.9. se presenta un resumen de todos los resultados obtenidos a partir de los ensayos con los ratones atímicos (Pierré y col., 1991). Se puede concluir que el PCI, a una dosis de 60 µg/día, tiene una actividad significativa en la reducción de tumores inducidos por inoculación de células humanas en ratones atímicos, y a una dosis de 11 µg/día tiene una actividad moderada. Por otro lado, no se han observado efectos tóxicos en ninguno de los animales tratados. Y el análisis histológico de los tumores no mostró diferencias morfológicas apreciables entre las células de los tumores de los animales tratados y los controles; todo esto sugiere que la reducción de tamaño de los tumores de los animales tratados no fue debida a efectos citotóxicos o muerte celular masiva producida por el PCI.

Tabla IV.9.: Actividad del PCI en tumores humanos implantados en ratones atímicos.

Línea tumoral	Tipo histológico	administración s.c.				
		Tratamiento Droga	(días) ^a	Dosis (mg/kg/día)	T/C% ^b	SGD ^c
Capan-1	Adenocarcinoma pancreático	PCI	0-32	0,55	39,79	1,09 (+)
				3	21,36	3,51 (+++)
				6	69,4	0,34 (-)

^a El tratamiento se inició 12 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones se trataron diariamente durante 32 días.

^b Los valores de T/C se determinan después de finalizar el tratamiento. $T/C = (\text{media } V_t/V_0 \text{ tratados} / \text{media } V_t/V_0 \text{ control}) \times 100$. $T/C < 50\%$ actividad moderada; $T/C < 25\%$, actividad significativa.

^cSGD= $T_d \text{ tratados} - T_d \text{ control} / T_d \text{ control}$ (SGD, retraso de crecimiento específico; T_d , tiempo de duplicación del tumor). $SGD < 1$ expresado como -; > 1 expresado +; y > 3 expresado como +++

Durante la pauta de tratamiento se observó que, en el proceso de inyección, los tumores de los animales control sangraban a los tres días de iniciado el tratamiento; por contra, los tumores de los animales tratados con cualquiera de las dosis de PCI tardaron 8 días en sangrar. Los tumores control se mantuvieron con una apariencia bastante rojiza durante todo el ensayo, mientras que los tratados con PCI nunca alcanzaron dicha tonalidad. Asimismo, cabe destacar también que los tumores control presentaron siempre una gran consistencia, mantenida durante todo el ensayo, que los tratados con PCI nunca alcanzaron. A medida que avanzaba el tratamiento la piel que rodeaba los tumores tratados fue perdiendo su capacidad de retención de líquido, resultando cada vez más dificultoso el suministro de PCI. Las anteriores observaciones son indicativas de que el tratamiento con PCI podría afectar al proceso de neo-vascularización y de angiogénesis de los tumores. De acuerdo con Folkman (1995) una terapia anti-angiogénica en ratones provoca una disminución de la presión intersticial con la consecuente disminución de la compactación (consistencia) de la masa tumoral.

IV.C.3. ENSAYOS CON RATONES TRANSGÉNICOS

Durante los últimos años se han desarrollado diversas líneas de ratones transgénicos en los cuales aparecen tumores en uno o varios órganos en particular, y durante un intervalo de tiempo determinado. Dichas líneas constituyen modelos *in vivo* muy cercanos a la situación real para un determinado tipo de tumor o tumores. En efecto, en los ratones transgénicos, los tumores se encuentran en condiciones fisiológicas y están sujetos a todos los factores externos que normalmente afectan al crecimiento tumoral *in vivo* incluido el sistema inmune. Además, el tumor se halla localizado en el órgano correspondiente, al contrario de lo que ocurre en los tumores subcutáneos en ratones atímicos. Por lo tanto, constituyen un buen modelo para estudiar tanto la biología de los tumores como la posible utilización de una determinada molécula como agente antitumoral.

Una vez conocido que el PCI reduce considerablemente el crecimiento de tumores inducidos en ratones atímicos (sin resultar tóxico para los animales), se procedió a estudiar el efecto del PCI, como posible agente antitumoral, en una línea de ratones transgénicos que desarrollan carcinomas la iCAII-TAg-2 (apartado III.G.3.a.). Todos los ensayos con ratones atímicos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. M.L. Frazier del M.D. Anderson Cancer Center de Houston.

IV.C.3.a. Caracterización histopatológica de la línea transgénica

La línea transgénica con la que se trabajó, desarrollada en el laboratorio de la Dra. M.L. Frazier del M.D. Anderson Cancer Center de Houston, se obtuvo por microinyección de la región codificadora del antígeno T del virus SV40 (sin el promotor ni el estimulador del virus) unida a dos secuencias del gen de la anhidrasa carbónica II, una de 3,5 Kb localizada inmediatamente 5' respecto el punto de inicio de la traducción del gen y otra de 1,7 Kb situada en dirección 3' del codón de inicio de la traducción que está unida en la orientación opuesta a la encontrada en el gen nativo. La línea así obtenida se denominó iCAII-TAg-2.

El primer paso para poder utilizar una línea transgénica como modelo *in vivo* de crecimiento tumoral es caracterizarla, es decir, una vez se dispone de una generación de animales homocigotos determinar qué tipo de tumores desarrollan y en qué momento aparecen. Por ello, una vez obtenida una generación de ratones homocigotos de la línea iCAII-TAg-2 se procedió a su caracterización. Se observó que los ratones morían prematuramente, la mayoría entre los 3 y 6 meses, siendo la mediana de vida de 130 días (Figura IV.15). Los ratones desarrollaron tumores cerebrales que posteriormente se caracterizaron como carcinomas de plexo coroideo, tumores de páncreas que fueron caracterizados como insulinosomas (carcinomas de islotes de Langerhans productores de insulina), o ambos. Un pequeño porcentaje de animales desarrolló otros tumores que se clasificaron como sarcomas.

La incidencia de los tumores en los ratones transgénicos se determinó sacrificándolos y realizándoles la autopsia cuando estaban moribundos.

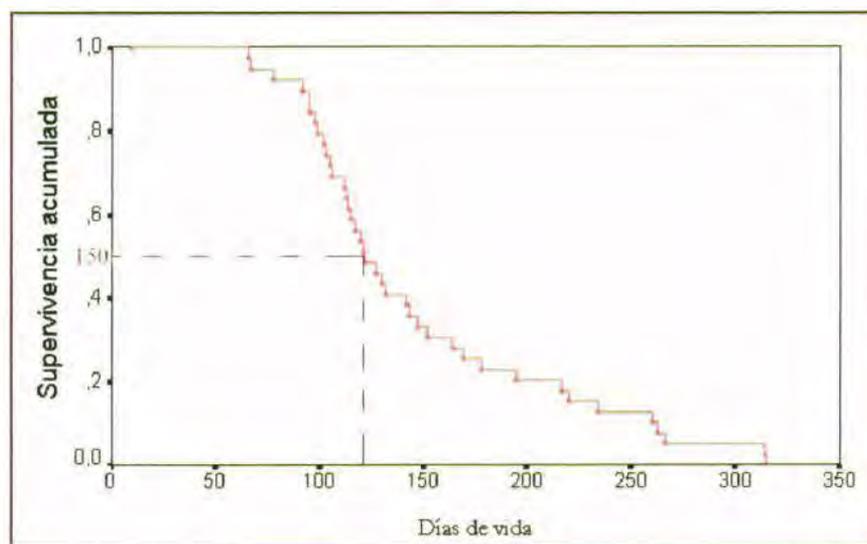


Figura IV.15: Porcentaje de supervivencia de la línea de ratones transgénicos iCAll-TAg-2. Se muestra el porcentaje fraccional de supervivencia de los ratones en función de su edad (n=46). T50 equivale a la mediana del tiempo de supervivencia, en días. Los datos incluyen sólo animales que murieron o aquellos a los que se permitió vivir hasta que estuvieron moribundos.

Un 95% de animales desarrollaron tumores de plexo coroideo, que empezaron a aparecer a una edad de 2 meses. Los insulinomas aparecieron más tarde, a partir de los 3 meses. Alrededor de un 30% de animales desarrollaron insulinomas, y siempre presentaron además tumores de plexo coroideo. Finalmente, un 9% de animales desarrollaron sarcomas a partir de una edad de 4 meses y medio.

Los tumores de plexo coroideo que desarrollaron los ratones se identificaron histológicamente y se caracterizaron por inmunohistoquímica. El plexo coroideo es una membrana epitelial, no neuronal, monoestratificada, que se encuentra en los ventrículos del cerebro. Es el responsable de la elaboración del fluido cerebroespinal (CSF), y está considerado la mayor barrera entre la sangre y el CSF. Los animales que desarrollaron dichos tumores presentaban el cráneo abombado, y se observaban líneas hemorrágicas de sutura bajo la piel. Algunos animales también presentaban síntomas neurológicos, por ejemplo, pérdida del equilibrio y parálisis parcial.

Cuando se realizó la autopsia de los animales y se les extrajo el cerebro, normalmente fue posible localizar una o más masas rojizas de tejido tumoral en los ventrículos cerebrales, que a menudo comprimían alguna parte del cerebro. La examinación histopatológica de los cortes cerebrales, teñidos con hematoxilina-eosina, permitió identificar dichas masas tumorales como carcinomas de plexo coroideo (Figura IV.16.A). Los tumores no presentaron ninguna

predilección por un ventrículo en particular, pero cuando aparecían en el cuarto ventrículo, éste acababa presionando el cerebelo y consecuentemente el animal sufría pérdida del equilibrio y parálisis parcial en un lado del cuerpo. Los carcinomas tenían una arquitectura no papilar bastante sólida, estaban formados por células relativamente uniformes con un núcleo hipercromático, citoplasma pequeño y una pérdida total de morfología celular. Los tumores estaban muy bien vascularizados. No se observó ninguna metástasis de los carcinomas de plexo coroideo en los animales analizados.

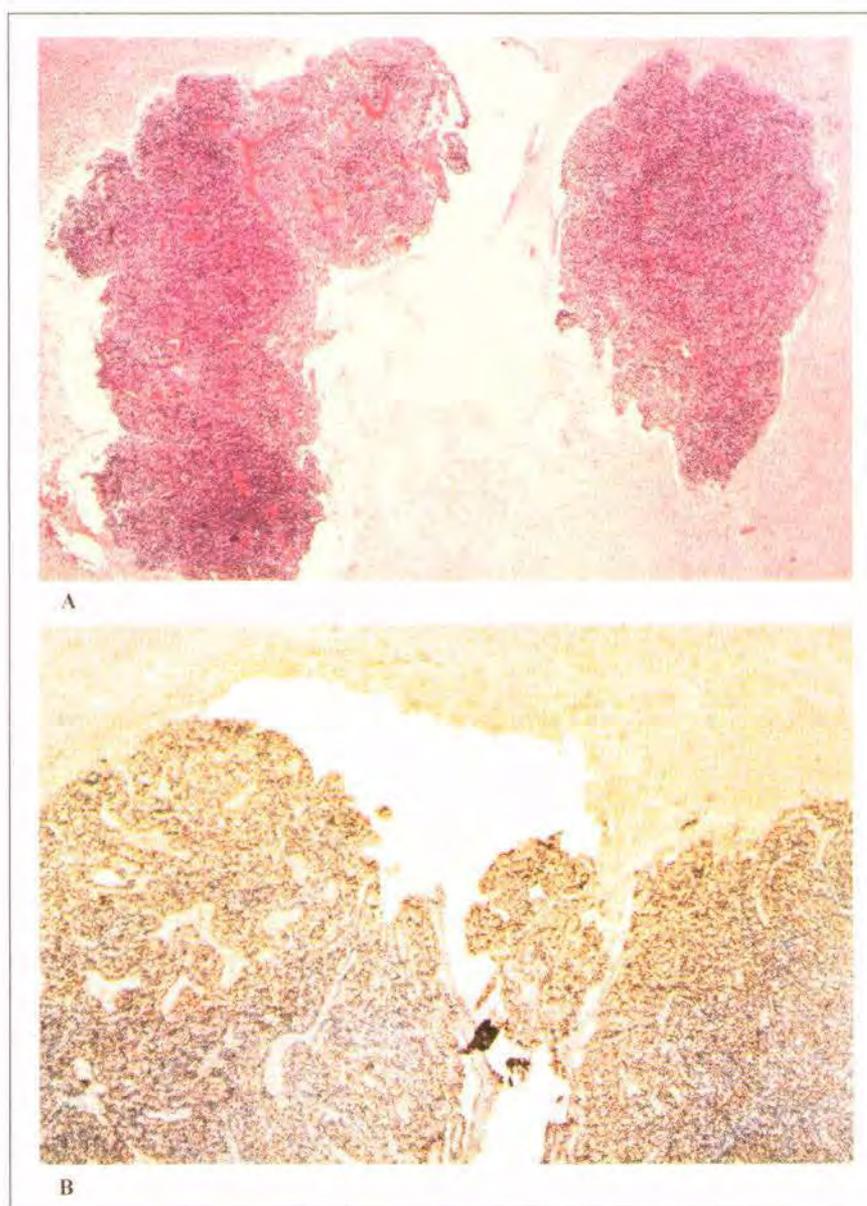


Figura IV.16. : Microfotografías realizadas con microscopio de campo claro de tumores de plexo coroideo (A) Sección de parafina de un tumor de plexo coroideo de un ratón iCAll-TAg-2 de 150 días de edad, teñida con hematoxilina-eosina. Las células normales tienen un núcleo más grande y un citoplasma más abundante comparado con las células neoplásicas), x20. (B) Sección seriada del tumor de plexo coroideo mostrado en (A), teñido por el método de la inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpos contra el antígeno T grande del virus SV40. Todos los núcleos de las células tumorales fueron positivos para este antígeno, mientras que las células del plexo coroideo normal restante son negativas, x40.

Diversas secciones de los cerebros extraídos se caracterizaron por tinción con anticuerpos con la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta (Apartado III.H.1.). Para demostrar que los tumores que presentaban los ratones aparecían debido al transgén que se les había microinyectado, se utilizaron anticuerpos contra el antígeno T del virus SV40. Los tumores de plexo coroideo resultaron positivos para esta tinción (Figura IV.16.B). Se observó la aparición de color en el núcleo de las células tumorales, pero no en los núcleos del tejido cerebral adyacente, particularmente en los restos del epitelio de plexo coroideo normal.

Respecto a los insulinomas, este tipo de tumores se detectó en un 30% de animales, todos con edades iguales o superiores a 3 meses. Después de la autopsia, el examen microscópico del páncreas reveló que algunos animales más jóvenes presentaban islotes hiperplásicos, formados por células endocrinas normales, de tamaño superior al normal. En los animales con insulinomas también aparecían algunos islotes hiperplásicos.

Los cortes de los páncreas teñidos con hematoxilina-eosina mostraron que los insulinomas alcanzaban tamaños de entre 0,55 a 2,1 mm de diámetro. Las células que los formaban eran ovaladas o redondas con un citoplasma eosinófilo, presentaban pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear, y un significativo índice mitótico. El patrón celular era típicamente trabecular como en los islotes normales, pero se podían observar ciertas áreas sólidas (Figura IV.17.A). Ni los islotes hiperplásicos ni los neoplásicos mostraron infiltración linfocitaria.

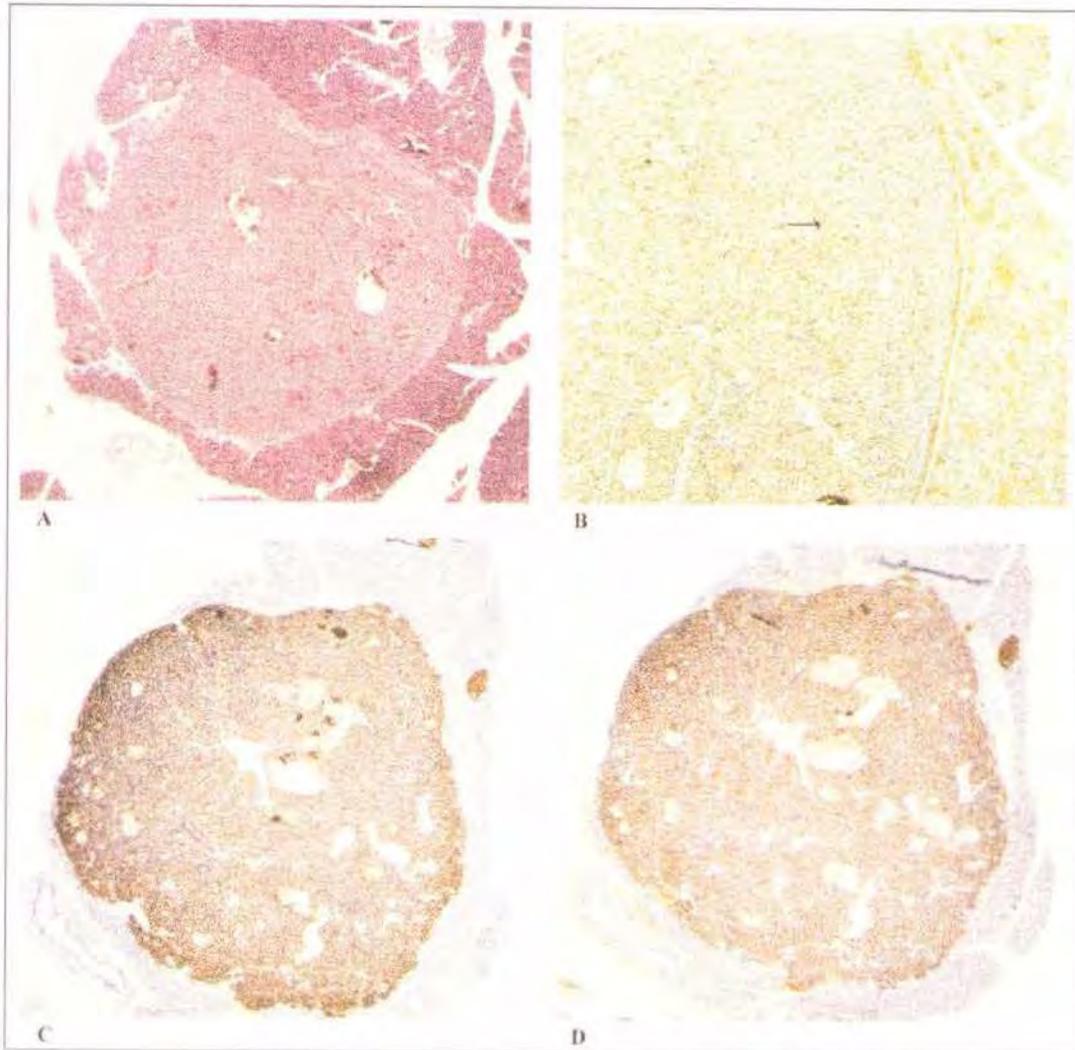


Figura IV.17. (página siguiente): Microfotografías realizadas con microscopio de campo claro de tumores de islotes de páncreas. (A) Sección de parafina de un insulinoma de un ratón iCAlI-TAg-2 de 94 días de edad, teñida con hematoxilina-eosina (Se observa un patrón trabecular, idéntico al de los islotes normales, con ciertas áreas sólidas), x20. (B) Sección seriada del tumor del páncreas mostrado en (A), teñido por el método de la inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpos contra el antígeno T grande del virus SV40. La mayoría de los núcleos de las células tumorales son positivos para este antígeno, mientras que las células de los islotes normales son negativas, x40. (C) y (D), Secciones seriadas del mismo páncreas teñidas, con el método anterior, con anticuerpos contra la insulina y la cromogranina respectivamente (todas las células del tumor son positivas para ambos antígenos, con una tinción más débil a la que presentan los islotes normales), x20.

La caracterización inmunohistoquímica de los páncreas (Apartado III.H.1) demostró que los núcleos de las células tumorales expresan el antígeno T grande del virus SV40 (Figura IV.17.B), mientras que sólo una pequeña fracción de los islotes hiperplásicos presentan tinción positiva para este antígeno, y los islotes normales no presentan tinción. Con el fin de caracterizar los tumores pancreáticos se utilizan dos antígenos diferentes: la cromogranina, que es un marcador de tejido endocrino y neuronal, y la insulina, que es uno de los péptidos secretados por los islotes de Langerhans. Todos los tumores pancreáticos son positivos por inmunohistoquímica para la insulina y la cromogranina, la tinción siempre era más débil a la observada en los islotes normales (Figura IV.17.C y D). Esta tinción positiva para cromogranina e insulina permite afirmar que estos tumores pancreáticos son derivados de islotes y pueden clasificarse como insulinomas.

La línea celular iCAII-2, establecida a partir del insulinoma desarrollado por uno de los ratones de esta línea, también presentó una tinción nuclear muy fuerte para el antígeno T grande del virus SV40 (Figura IV.18.).

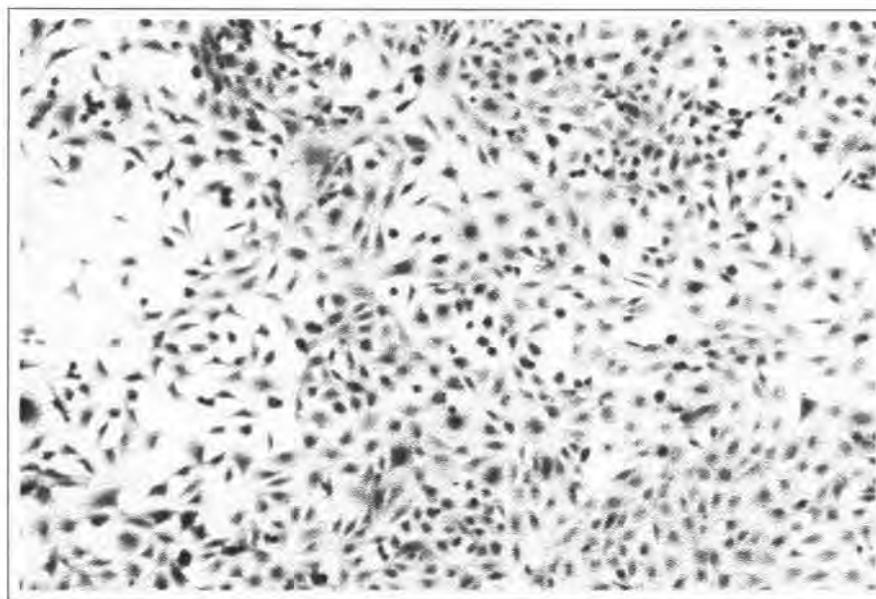


Figura IV.18.: Microfotografía realizada con microscopio de campo claro de células de la línea iCAII-2 teñidas por inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpos contra el antígeno T grande del virus SV40, x40.

Como ya se ha explicado en la introducción (apartados I.C.2.d.2. y I.C.3.c.), las secuencias del antígeno T grande de SV40, utilizadas para la obtención de ratones transgénicos, juegan un papel importante en la determinación de la especificidad tisular de la expresión de dicho antígeno. La región estimuladora de 72-pb parece dirigir la expresión del oncogén vírico hacia el plexo coroideo. Si esta región está ausente, pero la secuencias repetitivas de 21 pb aún están presentes, los tumores de plexo coroideo aparecen raramente, pero los insulinomas se desarrollan muy frecuentemente. Si estas secuencias de 21 pb están

también ausentes, los tumores de plexo coroideo no aparecen nunca o casi nunca en los ratones transgénicos mientras que los insulinomas si lo hacen. La región codificante del TAg parece ser suficientes para dirigir la expresión del oncogén a los islotes de Langerhans cuando el promotor y el estimulador no están presentes.

La línea de ratones transgénicos descrita en esta tesis desarrolla tumores de plexo coroideo con una elevada frecuencia, y también insulinomas. La construcción utilizada consiste en dos secuencias del gen de la anhidrasa carbónica II: una de 1.7 Kb situada en dirección 3' a partir del codón ATG del inicio de la traducción, unida en la orientación opuesta a la encontrada en el gen a una segunda secuencia de 3.5 kb localizada inmediatamente 5' respecto al punto de inicio de la traducción. Estas secuencias reguladoras se ligaron a la secuencia de 2.7 kb que codifica para el antígeno T del SV40, pero que no tiene ni el promotor ni el estimulador del virus. De acuerdo a lo descrito anteriormente, los insulinomas que aparecen en la línea transgénica aparecerían como consecuencia de la expresión del TAg en los islotes de Langerhans dirigida por las secuencias incluidas en la región codificante del TAg. Sin embargo, los tumores de plexo coroideo son probablemente originados por la expresión de TAg dirigida por las secuencias reguladoras de la anhidrasa carbónica II. Su incidencia extremadamente elevada en los ratones transgénicos permite descartar la posibilidad de que su aparición se deba a secuencias reguladoras contenidas en la región del SV40, dado que cuando se usa el gen del TAg sin secuencias repetitivas, los tumores de plexo coroideo aparecen raramente o no aparecen.

Esta hipótesis está apoyada por diferentes evidencias. En primer lugar, la anhidrasa carbónica II es la CA más ampliamente distribuida en el sistema nervioso central. Se expresa en el plexo coroideo, donde juega un papel esencial en el control del balance ácido-base y regula la producción del fluido cerebrospinal. Aunque la CAII está presente en diversos tipos de células gliales, al menos en el caso del pollo, los niveles de expresión más elevados se detectan por hibridación *in situ* en el plexo coroideo y la glía de Bergmann del cerebelo (Rogers y Hunt , 1987). En segundo lugar, la mayoría de tumores de plexo coroideo humanos expresan CAII (Newbould y col., 1995; Parkkila y col., 1995). Y en tercer lugar, otras dos líneas de ratones transgénicos, desarrolladas también en el laboratorio de la Dra. Frazier, con una construcción que sólo difiere de la línea aquí descrita en la ausencia de la secuencia reguladora de la CAII de 1.7 kb, sólo desarrollaron tumores de riñón. Esto demuestra que el gen de SV40 sin estimulador ni promotor es incapaz de inducir la aparición de tumores de plexo coroideo con una frecuencia significativa.

IV.C.3.b. Estudio del efecto del PCI en la supervivencia de los ratones transgénicos

Una vez caracterizada la línea de ratones transgénicos se podían iniciar los ensayos con el PCI. En primer lugar se realizaron ensayos preliminares para determinar cual podía ser la mejor vía de inyección del PCI. Para ello se trabajó con una población homocigota de ratones de la línea iCAII-TAg-2 nacidos en un reducido intervalo de tiempo. Se estudiaron 4 grupos de 7 ratones a los que se administró PBS (grupo control) o PCI disuelto en PBS mediante tres vías diferentes: inyección subcutánea o intraperitoneal, e inmunización del animal contra el PCI. Las dos primeras vías de inyección se escogieron dado que eran ampliamente utilizadas en la bibliografía consultada y la tercera vía de inyección se eligió con el fin de determinar si bajas dosis del inhibidor liberado de manera lenta y continua podían ser eficaces en el tratamiento de los tumores.

Las inyecciones, que fueron diarias en todos los casos salvo en el de los ratones inmunizados, se prolongaron desde que los animales tenían 12 semanas de edad hasta que tuvieron 23. Una vez terminados los tratamientos se determinó el porcentaje de supervivencia para cada uno de ellos. El resultado fue que la inyección del PCI por vía de inmunización resultó ser la más eficaz, con un 85 % de supervivencia respecto a un 57% del grupo control (Tabla IV.10).

Tabla IV.10.: Porcentajes de supervivencia de los ratones de la línea iCAII-TAg-2 tratados, mediante diferentes vías de inyección, con PCI.

Tratamiento	% Supervivencia al fin del tratamiento
Control	57,1
200 µg PCI/ día subcutáneo	57,1
200 µg PCI/ día intraperitoneal	71,4
inmunización (10 µg PCI/dosis)	85

A partir de estos datos preliminares se decidió iniciar un nuevo estudio con un número más elevado de ratones, que se inmunizaron con, o bien PBS (grupo control) o bien PCI, y que se alargó hasta el momento de la muerte de todos los animales estudiados.

Para este estudio se utilizaron 54 ratones transgénicos de la línea iCAII-TAg-2, de 45 a 60 días de edad, procedentes de 7 familias diferentes. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente (equilibrados por sexos y familias) en dos grupos. Tanto el grupo control (tratado con PBS) como el tratado con PCI (10 µg por inyección) recibieron 4 inyecciones

subcutáneas (Apartado III.G.3.b.), una primera de 200 μ L de una mezcla 1:1 de PBS o PCI y adyuvante completo de Freund, y las tres siguientes de 200 μ L de una mezcla 1:1 de PBS o PCI y adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones se dieron según una pauta de inmunización, es decir, se inició el tratamiento con la primera inyección, la segunda se dio a los 7 días, la tercera a los 37 días y la cuarta a los 67 días. La inmunización no se considera completa hasta la tercera inyección y la cuarta inyección sirve para mantener un nivel elevado de anticuerpos en sangre. Los animales se inspeccionaron cada 3 días y cuando estuvieron moribundos se sacrificaron.

Los porcentajes de supervivencia para los dos tratamientos se representan en la figura IV.19. Como se puede observar, los ratones control se empezaron a morir a partir de los 90 días de edad. El 70 % de los ratones control murió antes de los 155 días de edad. La muerte se produjo de manera progresiva durante estos 2 meses. A partir de este punto los ratones murieron de manera más lenta. La mediana de vida de los ratones control fue de 122 días. El 91 % de los ratones desarrollaron tumores de plexo coroideo, el 33 % tumores de plexo coroideo e insulinomas y el 8 % sarcomas.

Los ratones tratados con PCI empezaron a morir a partir de los 70 días. A los 155 días sólo había muerto el 40 % de los animales tratados. La mediana de vida de los ratones tratados con PCI fue de 202 días. El 71 % de los ratones tratados desarrollaron tumores de plexo coroideo, el 35 % insulinomas, el 21% ambos y el 7% sarcomas.

A partir de los datos de supervivencia acumulada se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de funciones de supervivencia, empleando un test de log rank o de Tarone-Ware (Norusis, 1990). Se contrastó la función de supervivencia de los ratones tratados con PCI con la de los ratones control. El resultado fue que para el tratamiento con PCI la función de supervivencia resultó significativamente diferente a la de los controles con un nivel de significación del 0,03. Por tanto, se puede concluir que el PCI alarga significativamente la supervivencia de los ratones transgénicos de la línea iCAII-TAg-2, aproximadamente unos 86 días. En otras palabras, la vida media de un ratón de la cepa C57BL6 es de 24 meses, un ratón transgénico para la construcción pCASV40-i vive como promedio 4,1 meses, y dichos ratones tratados con PCI viven como promedio 6,8 meses. Si consideramos la vida media de un ratón de 2 años y la de un hombre de 70 años, estos 80 días de la vida de un ratón equivalen a 3,9 años de la vida de una persona. Respecto al tipo de tumores que desarrollan los ratones control y los tratados con PCI, se observa que los ratones tratados con el inhibidor presentan una menor incidencia de tumores de plexo coroideo, un 70% frente al 90% de los controles. Además, en el grupo de animales tratados se detectan ratones que sólo presentan insulinomas, mientras que todos los ratones control que desarrollaron insulinoma presentaban también tumores de plexo coroideo. Y dado que el porcentaje de ratones que desarrollan insulinomas

es muy similar entre los dos grupos de ratones, se puede concluir que el PCI parece reducir la incidencia de los tumores de plexo coroideo, y evita incluso su aparición.

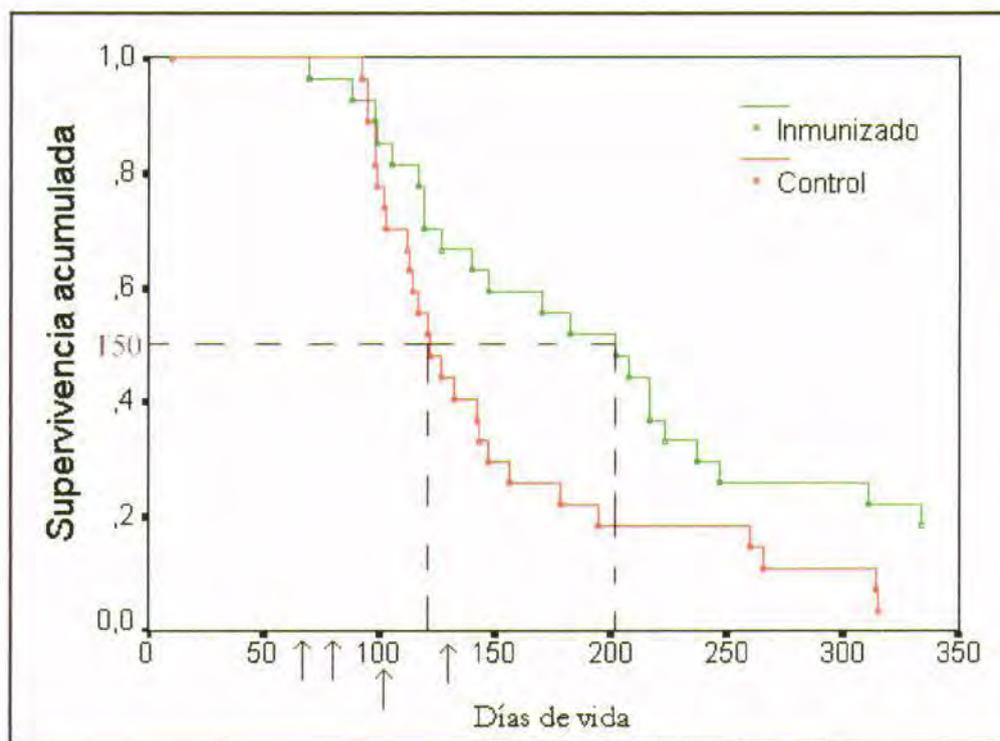


Figura IV.19.: Porcentaje de supervivencia de los ratones transgénicos de la línea iCAII-TAg-2 control (línea roja) y tratados con 10 μ g de PCI por inyección (línea verde). Se muestra el porcentaje acumulado de supervivencia de los ratones en función de su edad (n=27 para cada grupo). T50 equivale a la mediana del tiempo de supervivencia, en días. Los datos incluyen sólo animales que murieron o aquellos a los que se permitió vivir hasta que estuvieron moribundos. Las flechas indican los momentos en que fueron inyectados con PBS o PCI.

Dado que las cantidades de PCI que se inyectan a los ratones son muy pequeñas, sólo 40 μ g totales, se pueden proponer dos posibles mecanismos de acción. El primero sería que al inmunizar los ratones contra el PCI, éste está siendo liberado de manera lenta y progresiva de manera que permite una disponibilidad continua de PCI en dosis bajas. Y el segundo sería que los anticuerpos que los ratones desarrollan contra el PCI fueran los responsables del retraso en el desarrollo de los tumores. Actualmente el grupo está realizando diferentes estudios para dilucidar cual de las dos posibles mecanismos es el responsable.

IV.D. MECANISMO CELULAR DE ACCIÓN DEL PCI

IV.D.1. INCORPORACIÓN DEL PCI POR LAS LÍNEAS CELULARES

En los apartados anteriores se ha descrito que el PCI tiene un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes líneas celulares tumorales en cultivo, sobre el desarrollo de tumores inducidos en ratones atímicos, sobre la aparición de metástasis en hígado de ratones y sobre el desarrollo de tumores de plexo coroideo en ratones transgénicos. Con el fin de investigar el mecanismo celular responsable de todos estos efectos, se han realizado estudios de internalización del PCI mediante la detección de éste en el medio de cultivo o empleando fluorescencia. También se ha estudiado si el efecto inhibitorio sobre el crecimiento las líneas celulares tumorales podía ser debido a una alteración de las fases del ciclo celular. Además, se ha analizado si la inhibición del crecimiento va acompañada de un alteración de la expresión génica de la p53 y la tripsina.

IV.D.1.a. Determinación de la desaparición del PCI añadido al medio de cultivo de la línea Capan-1

Uno de los ensayos que se realizaron para averiguar si el PCI era internalizado por las células sobre las que tenía un efecto inhibitorio (lo que podía implicar la existencia de un receptor para el inhibidor) fue la adición de PCI al medio de cultivo de las células y el seguimiento de su concentración a lo largo del tiempo en dicho medio.

El ensayo consistió en sembrar tres frascos de cultivo con células de la línea Capan-1 que se cultivaron hasta que, por observación microscópica, se vio que habían alcanzado un 75% de confluencia. En ese momento se retiró el medio y se sustituyó por nuevo DMEM+10%FBS (frasco control), por el mismo medio con 50 µg/mL de PCI (frasco 50 µg/mL) y por medio con 200 µg/mL de PCI (frasco 200 µg/mL). Los tres frascos se cultivaron durante 24 horas más. De cada uno se extrajeron muestras de 100 µL de medio de cultivo cada media hora. En cada una de ellas se determinó la concentración de PCI presente mediante dos métodos (Apartados III.B.1.b.2. y III.B.1.b.3.): ensayos de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A y ELISA. En tales ensayos se usaron como blancos las muestras obtenidas del frasco control a los mismos tiempos. Uno de los ELISAs que se realizaron con las muestras provenientes del frasco 200 µg/mL se llevó a cabo con unas condiciones especiales en el primer paso (fijación de los antígenos), en concreto empleando una concentración de 0,5 M NaCl.

Los resultados obtenidos en el caso del frasco 50 µg/mL se muestran en la Figura IV.20. Las concentraciones de PCI en el medio de cultivo calculadas a partir de los ensayos de actividad inhibitoria y a partir del ELISA son, en general, bastante coincidentes. Las

discrepancias entre ambos métodos son seguramente debidas a los errores e imprecisiones propios de los mismos. Como se puede observar en la Figura IV.20., el PCI es claramente internalizado por las células y su concentración en el medio de cultivo desciende de forma acusada alrededor de la 1h 30 min, y después, de forma aún más marcada, entre las 3 y las 6 h. A partir de este momento, parecen observarse ciclos de aparición y desaparición del PCI del medio de cultivo cada 3 a 5 h, aproximadamente.

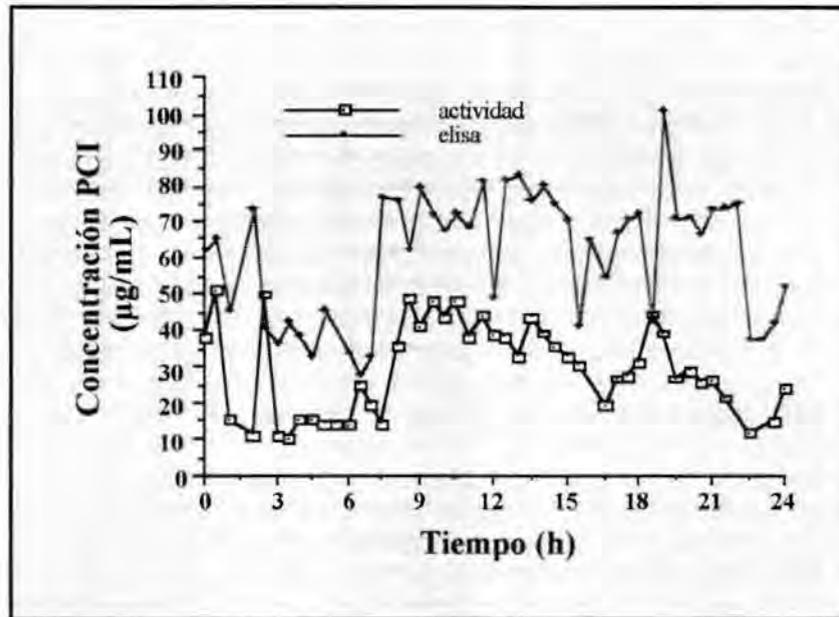


Figura IV.20.: Seguimiento de la concentración de PCI añadido al medio de cultivo de la línea Capan-1. Se sembraron 5×10^5 células en un frasco de 25 cm^2 . Cuando las células estuvieron al 75 % de confluencia se retiró el medio y se añadió medio fresco más 50 µg/mL de PCI. Se siguió la presencia de PCI en el medio durante 24 h. Cada punto corresponde a medidas cada media hora. La concentración de PCI se determinó por actividad inhibitoria de la carboxipeptidasa A (cuadrados) y por ELISA con anticuerpos contra el PCI (rombos).

En el caso de células incubadas con 200 µg/mL se observó, como en el caso anterior, repetidos ciclos de desaparición y reaparición de PCI en el medio de cultivo. Es muy destacable el hecho de que, al contrario que en el caso anterior, se observó una clara diferencia entre los resultados obtenidos a partir de los ensayos de actividad y del ELISA. Las concentraciones de PCI calculadas a partir de esta última técnica resultaron ser de cinco a diez veces menores, y dicha diferencia no puede ser adjudicada a los errores inherentes a ambos métodos. Para explicar estas discrepancias se elaboró una explicación basada en el hecho de que los ensayos de actividad se realizan en condiciones de alta fuerza iónica ($0,5 \text{ M NaCl}$), lo que no ocurre en el caso del ELISA. En efecto, es posible que el PCI presente en el medio de cultivo se halle unido a proteínas, restos de membrana, etc, y que tal unión se rompa en las condiciones de alta fuerza iónica del ensayo de actividad. En cambio, en el caso del ELISA, esto no ocurriría, y tales hipotéticas proteínas o restos de membrana bloquearían epítomos del PCI, por lo cual la concentración que se detectaría del mismo sería claramente inferior. Esta

hipótesis se vio apoyada al realizar un ELISA donde la incubación de las muestras (primer paso del ELISA) se hizo en condiciones de alta fuerza iónica (0,5 M NaCl), idéntica a la que se emplea en los ensayos de actividad. El resultado del ELISA fue que se detectaron concentraciones de PCI en los medios de cultivo muy superiores a las determinadas en el ELISA anterior, y muy similares a las concentraciones halladas en ensayos de actividad.

Estos ciclos de aparición y desaparición del medio de cultivo podrían ser debidos al reciclaje y degradación lisosomal de un posible receptor al cual se uniese el PCI (Sorkin y Waters, 1993). Esta aparición en el medio de cultivo del ligando reciclado disociado se ha observado también por ejemplo en el caso del EGF (Korc y Magun, 1985; Masui y col., 1993; French y col., 1995).

Para comprobar si el PCI se había internalizado via una metalocarboxipeptidasa de membrana, dado que es un inhibidor de carboxipeptidasas, o via otro receptor, se purificó el PCI del medio de cultivo después de 24 h de haberse añadido a las células y se sometió a espectrometría de masas según el método de Chait y Kent (1992).

El resultado fue que la masa molecular del PCI no estaba alterada, lo que demostró que no se había producido degradación lisosomal del inhibidor, posiblemente debido a que el PCI es muy resistente a la proteólisis (Ryan y col., 1974). Por lo tanto, este hallazgo no resultó sorprendente y permitió descartar la posibilidad de unión a una metalocarboxipeptidasa de membrana, ya que el último residuo del inhibidor es rápidamente cortado cuando se une a esta clase de enzimas (Hass y Ryan, 1981).

IV.D.1.b. Estudios de internalización del PCI marcado mediante fluorescencia

El otro ensayo que se realizó para averiguar si el PCI era internalizado por las células sobre las que tenía un efecto inhibitorio fue el marcado del inhibidor con un fluoróforo y la observación al microscopio de su incorporación por las células. Este ensayo se realizó con las líneas Capan-1 y Panc-1.

El compuesto fluorescente elegido para marcar el PCI fue el RITC, puesto que se ha descrito que esta molécula marca al PCI con una estabilidad mayor que otros fluoróforos (Billings y col., 1989). El RITC reacciona con los grupos amino de las lisinas y N-terminal. En los dos casos el lugar de reacción está lejos de la región del PCI de unión con la carboxipeptidasa, lo que permite determinar su concentración mediante ensayos de inhibición de actividad carboxipeptidasa A. La cantidad de RITC enlazado covalentemente con el PCI puede evaluarse espectrofotométricamente.

IV.D.1.b.1. Mercado del PCI con RITC

Los resultados típicos obtenidos al marcar el PCI con RITC fueron que aproximadamente cada mol de PCI unió 0,66 moles de RITC. Como el PCI tiene 3 lugares de unión de RITC (grupos amino libres), se puede afirmar que la probabilidad de que uno esté marcado es de 0,22. De esto se dedujo que el 43 % de las moléculas de PCI de las preparaciones de inhibidor no estarían marcadas, y del 57 % restante, el 40 % estaría marcada en un solo lugar y el 13% en más de uno.

IV.D.1.b.2. Internalización del RITC-PCI por las células tumorales

Antes de iniciar los estudios de incorporación de RITC-PCI a las líneas celulares, se realizaron controles (Apartado III.D.3) que permitieron comprobar que:

- a- Las células no internalizan RITC libre.
- b- El RITC-PCI no se une inespecíficamente a la superficie de las cámaras de cultivo.
- c- Las células de las líneas ensayadas no presentan fluorescencia intrínseca a la longitud de onda a la que la presenta el RITC.

En los estudios de incorporación de RITC-PCI por células Capan-1 se observó, como resultado general, que tales células presentaban una intensa fluorescencia al microscopio, revelando que internalizaban cantidades significativas de PCI marcado. La fluorescencia se visualizaba en todo el interior del citoplasma, pero con una clara acumulación alrededor del núcleo (localización perinuclear). Dicha localización perinuclear aparecía ya en células expuestas al RITC-PCI durante sólo 1 minuto e indicaba que su internalización había sido vía un receptor. Todo esto se puede observar en la Figura IV.21., donde se presenta una microfotografía de contraste de fases de las células y una de fluorescencia que muestra el tipo de internalización que presentaba el PCI por las células Capan-1.

El tiempo de exposición necesario para poder fotografiar las células da idea de la intensidad del marcado y con ello de la cantidad de PCI captado por las mismas. Así, a mayor intensidad se necesita menos tiempo de exposición. Con carácter general, las células incubadas a igual concentración de PCI presentaban mayor intensidad de marcado cuanto más tiempo habían estado en contacto con el mismo. Sin embargo hay que indicar que, para una misma muestra, había diferencias en la intensidad de la fluorescencia entre distintas células. Al comparar las microfotografías de fluorescencia con las de campo claro, se podía apreciar que las células con mayor intensidad de marcado presentaban un núcleo disgregado, no esférico, y que a veces resultaba difícil de ver.

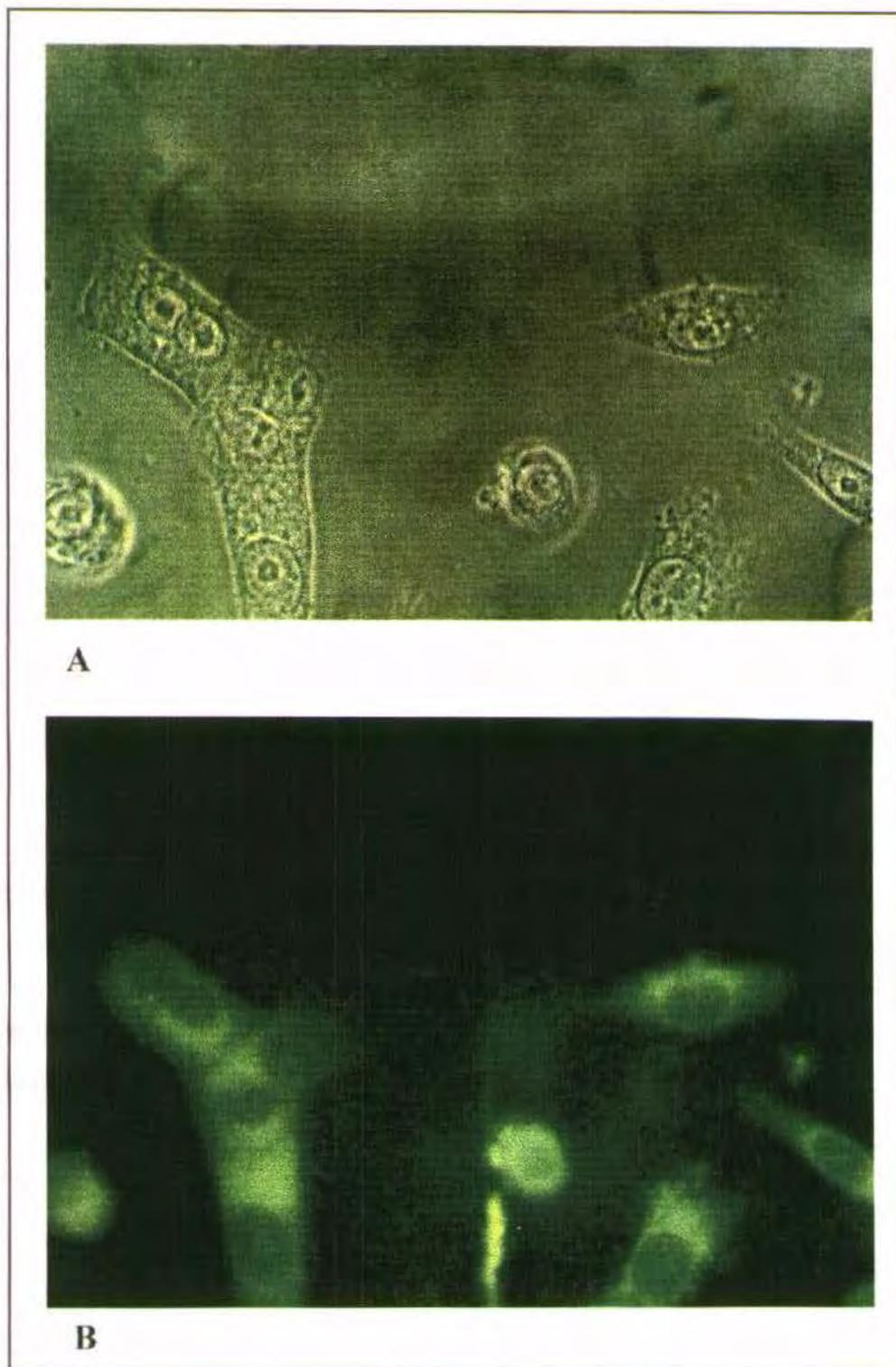


Figura IV.21.: Microfotografía de la incorporación de RITC-PCI por células de la línea Capan-1 creciendo exponencialmente en medio completo suplementado con FBS al 10%. **(A)** Imagen realizada con microscopio de contraste de fases, células incubadas con [RITC-PCI]= 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 h, x400. **(B)** Imagen realizada con microscopio de fluorescencia de las células de la fotografía (A), x400.

En el caso de la línea Panc-1, el marcado de las células era también perinuclear. Con carácter general, para los mismos tiempos de incubación y concentración de RITC-PCI el marcado en el caso de Panc-1 era bastante menos intenso que en Capan-1 (se requerían tiempos de exposición algo superiores para obtener una microfotografía). De aquí se deduce que la cantidad de PCI internalizado por las células de la línea Panc-1 es bastante menor que por las Capan-1.

IV.D.2. ALTERACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR EN LA LÍNEA CAPAN-1 INDUCIDA POR EL PCI

Para estudiar el mecanismo celular de acción del PCI se procedió a analizar si el tratamiento de las células de la línea Capan-1 con dicho inhibidor origina alguna variación en la distribución de las fases del ciclo que pudiera explicar su efecto sobre el crecimiento celular.

Para ello se trataron células que estaban creciendo exponencialmente con 50 µg/mL de PCI durante 2 a 12 días (Apartado III.C.5.c.2.). Paralelamente se crecieron células control. Una vez finalizado el tratamiento, se recogieron tanto las células flotantes como las adheridas al fondo del frasco. Las células así obtenidas se prepararon para el citómetro de flujo, fijándolas en etanol 70 % y tiñiéndolas con yoduro de propidio. Después, se realizó el recuento por citometría de flujo del número de células en cada una de las fases del ciclo excitándolas con un láser de 488 nm.

Los resultados no revelaron ningún cambio en la distribución de las fases del ciclo en las células Capan-1 tratadas con 50 µg PCI/mL durante tiempos inferiores a 7 días respecto a las células control. Sólo después de 12 días de tratamiento con PCI se observó un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas (la población sub G_0), así como un pequeño incremento del porcentaje de células en la fase G_0/G_1 . Estos resultados se presentan en la Figura IV.22.

Estos resultados indican que el incremento en el porcentaje de células apoptóticas podría ser uno de los mecanismos responsables del efecto inhibitorio del PCI sobre el crecimiento de las células tumorales Capan-1.

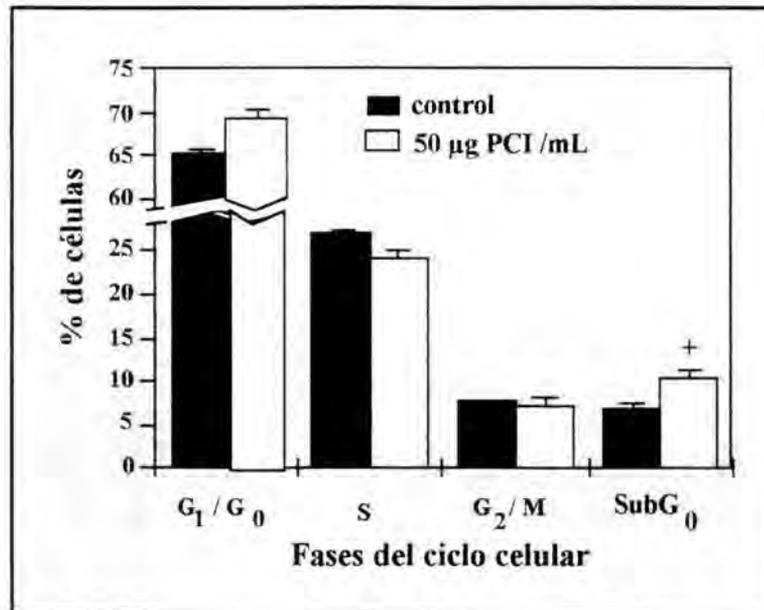


Figura IV.22. Distribución de las fases del ciclo de la células Capan-1 tratadas con 50 µg/mL de PCI durante 12 días. Se representa el porcentaje del contenido total de DNA para cada fase del ciclo celular en las células control (barras negras) y en las células tratadas (barras blancas). Los resultados son la media de tres experimentos. Se representa el error estándar. + Denota diferencias significativas respecto al control con una $P < 0,025$ para un test t de Student.

IV.D.3. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA p53 Y LA TRIPSINA PROVOCADA POR EL PCI

Dado que se había observado que el PCI producía un aumento significativo de las células apoptóticas (Figura IV.22.) se estudió si afectaba a la expresión génica de la p53. Este es un factor de transcripción que controla el estado del DNA genómico y el ciclo celular, entre otras funciones (Bates y Vousden, 1996). Si el DNA está dañado, la p53 induce su reparación, y si está excesivamente dañado dispara la muerte celular programada o apoptosis.

A su vez, como se había observado que el PCI inhibía la capacidad metastásica de las células B16F10, se estudió la expresión génica de la tripsina en presencia de inhibidor. La tripsina es un marcador de células pancreáticas de tipo acinar que no expresan todas las células tumorales. Se cree que su presencia se encuentra asociada al poder metastásico y/o invasivo de las células tumorales (Fernández y col., 1994).

Para llevar a cabo estos estudios de expresión génica, se trataron células Capan-1 con 1 ó 10 µg/mL de PCI durante 12 días. A continuación, el RNA total extraído a partir de dichas células o de células control (no tratadas) se analizó por electroforesis en geles de agarosa con urea y ácido cítrico. En la Figura IV.23. se muestra uno de estos geles. Se observan claramente las bandas correspondientes a los RNA ribosómicos 28S, 18S y 5S; en ninguno de los casos se aprecia degradación significativa de las muestras.

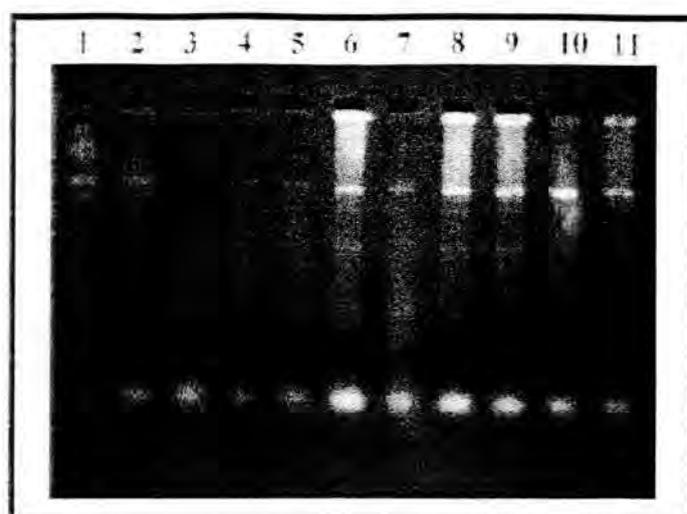


Figura IV.23.: Análisis en geles de agarosa con urea y ácido cítrico de los RNA totales correspondientes a: 1-4: células Capan-1 control, 5-8: células Capan-1 tratadas con 1 µg/mL de PCI, 9-11: células Capan-1 tratadas con 10 µg/mL PCI.

Se aisló RNA poli (A+) a partir de estos RNA totales y se cargaron 20 µg por bolsillo en un gel de agarosa con formaldehído. Posteriormente se transfirió el mRNA a filtros y se procedió a su hibridación con sondas para la p53, tripsina y β2-microglobulina. Éste último es un gen constitutivo que se utilizó como control de carga de muestra en el gel.

Se realizaron 3 experimentos independientes. Cada filtro se hibridó dos veces con diferentes sondas. Las bandas se normalizaron respecto a la de la β2-microglobulina y se cuantificaron con un contador β.

Los resultados de las hibridaciones se presentan en la Figura IV.24., y en la Tabla IV.11 se pueden observar la intensidad de las bandas en ausencia y en presencia de PCI en el contador beta.

Tabla IV.11.: Cuentas beta de los Northern de las células Capan-1, cultivadas en presencia o ausencia de PCI, hibridados con las sondas de p53, tripsina y β2-microglobulina.

Tratamiento	p53	Tripsina	β2-microglobulina
Control	138	511	955
1 µg/mL PCI	882	396	2183
10 µg/mL PCI	1111	432	6287

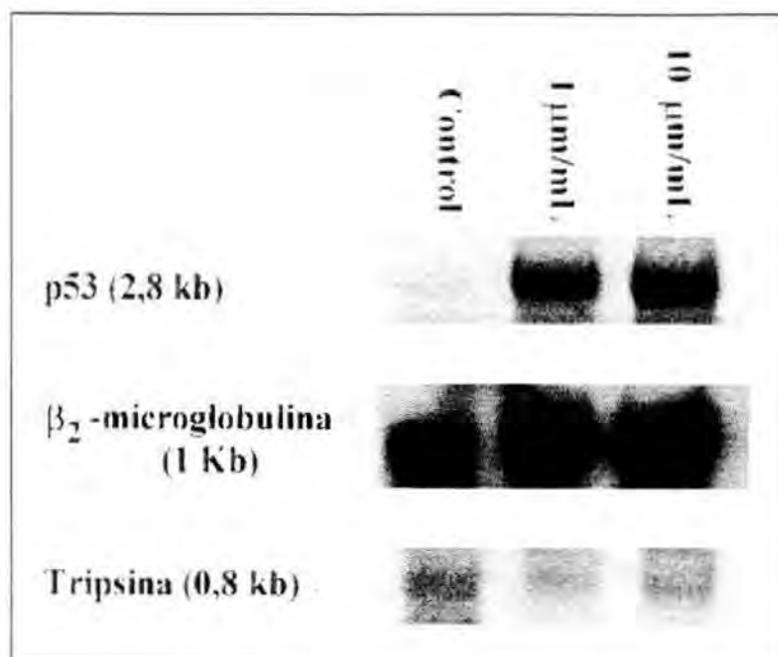


Figura IV.24.: Análisis por transferencia tipo Northern de RNA poli (A+) de la línea Capan-1 (de izquierda a derecha): control, tratada con PCI 1 y 10 µg/mL. El mRNA se separó por electroforesis en geles de agarosa y formaldehído al 6%. Los filtros se hibridaron con sonda para p53 humana, tripsina de rata y β_2 -microglobulina humana marcadas con ^{32}P .

Si se asume que las cuentas correspondientes a la β_2 -microglobulina son una indicación de la cantidad total de RNA poli (A+), se pueden estandarizar los datos como porcentaje de cuentas de la banda respecto a las cuentas de la β_2 -microglobulina, dando un valor que depende de la abundancia del mRNA específico respecto al total de mRNA. Los resultados se presentan en la Tabla IV.12.

Tabla IV.12.: Cuentas beta de una sonda, para cada tratamiento, respecto a las de la sonda de la β_2 -microglobulina.

Tratamiento	p53/ β_2	Tripsina/ β_2
Control	0,1445	0,5351
1 µg/mL PCI	0,4040	0,1814
10 µg/mL PCI	0,1767	0,0687

Partiendo de estos datos se puede evaluar cuantas veces es más abundante (o menos) un mRNA en las células tratadas respecto a las control. Así, en la Tabla IV.13. se presentan los resultados obtenidos del cociente entre el número de cuentas estandarizado para un tratamiento y el número de cuentas de las células control.

Tabla IV.13.: Cuantificación de la mayor o menor expresión de p53 y tripsina en células tratadas con diferentes concentraciones de PCI, respecto a células control

Tratamiento	p53	Tripsina*
1 µg/mL PCI	2,8	2,9
10 µg/mL PCI	1,2	7,8

* En el caso de la sonda de tripsina al ser el número de cuentas de las células tratadas inferior al número de cuentas de las células control, se ha obtenido el cociente inverso (control/tratamiento) y el número resultante indica las veces que está inhibida la expresión del mRNA para dicha proteína

En resumen, al tratar las células con una concentración 1 µg/mL de PCI aumentó 2,8 veces el nivel de expresión del mRNA de la p53, y disminuyó 2,9 veces el de la tripsina. Y para el tratamiento con 10 µg/mL aumentó 1,2 la expresión de la p53 y disminuyó 7,8 veces la de la tripsina. Este aumento de la expresión del mRNA de la p53 no se correlacionó con un aumento de la cantidad de proteína, dado que no se detectaron diferencias en cuanto a cantidad de proteína p53 en ensayos de inmunotransferencia tipo western.

Estos resultados indicaron que el tratamiento con PCI provocaba un aumento de la expresión del mRNA para la p53. Hasta la fecha, tal aumento se ha descrito en situaciones de estrés celular, como radiaciones ultravioleta y gamma, calor, falta de suero o factores de crecimiento en el medio de cultivo de las células, o presencia de algún carcinógeno (Bates y Vousden, 1996). Una sobreexpresión de p53 provoca, bien una inducción de apoptosis, bien una parada en G₁. Tal y como se comentó en el apartado IV.D.2, se había observado un incremento significativo de apoptosis, y un ligero aumento del número de células de Capan-1 en G₁ al ser tratadas con PCI. Dicha línea celular presenta una p53 mutada (Barton y col., 1991; Berrozpe y col., 1994). El hecho de que la proteína p53 esté mutada podría explicar que el aumento de células apoptóticas, así como el de células en G₁, no sea muy elevado, dado que la proteína mutada no responde igual que la proteína salvaje a las situaciones de estrés.

El tratamiento con PCI también provocó una gran disminución en la expresión de tripsina, típica proteína de estirpe acinar. Koivunen y col. (1991) han descrito que el isoenzima del tripsinógeno denominado TAT-2, producido por células tumorales, contribuye, entre otras proteínas, a mediar la degradación de la matriz extracelular. Por lo tanto, se ha implicado al TAT-2 como uno de los componentes de la cascada de proteasas que la célula utiliza para la migración a través de las barreras tisulares. Dado que el PCI provoca la disminución de la expresión de la tripsina, ésta se puede relacionar con la capacidad del inhibidor de reducir la formación de metástasis (apartado IV.C.1).

IV.E. COMPARACIÓN POR MÉTODOS COMPUTACIONALES DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DEL PCI Y DIVERSAS NOTINAS

El PCI y varios factores de crecimiento de mamíferos, ω -toxinas y otras proteínas comparten un esqueleto de tres puentes disulfuro denominado nudo-T (McDonald y Hendrickson, 1993; Isaacs, 1995; Sun, 1995; Ling y Nussinov, 1995). Para profundizar en el posible mecanismo responsable de los efectos del PCI sobre el crecimiento celular, se estudió la posible homología estructural del inhibidor con otras proteínas con nudos-T (notinas).

Estos estudios se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioinformática del Institut de Biologia Fonamental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Para ello se realizó un análisis computacional utilizando el programa denominado "KNOT-MATCH" (Mas et al, 1998) que permite establecer, de forma automática, la similitud topológica de los puentes disulfuro de las proteínas cuya estructura cristalográfica está depositada en el banco de datos de estructuras cristalográficas de proteínas (PDB).

El programa clasificó a las proteínas en 6 grupos. Uno de estos grupos contenía factores de crecimiento y otras proteínas con nudos-T como el PCI. Las posiciones de los puentes disulfuro en el PCI resultaron ser muy similares a las del EGF (Figura IV.25.), TGF- α y heregulina. Además, la conformación de 2 bucles del PCI (residuos 18-24 y particularmente el 27-34) y una parte de la cola del PCI (33-37) eran muy similares y se podían superponer con una buena desviación raiz cuadrática media (RMSD) con los bucles 14-20, 22-29, y la cola C-terminal (42-46) del EGF. Así, el esqueleto de carbonos alfa del bucle del PCI 27-34 mostró un RMSD de 0,79 Å con el del bucle 22-29 del EGF. Cuando las estructuras del EGF y el PCI se superpusieron de acuerdo con la topología de los puentes disulfuro, algunos aminoácidos del EGF importantes para la unión a su receptor (Groenen y col. 1994, Campion y Niyogi, 1994) correspondieron con aminoácidos del PCI de unas características físico químicas similares. Por ejemplo, 6 de los más importantes residuos para la unión EGF/EGF-R, Ser²⁵, Leu²⁶, Thr³⁰, Tyr³⁷, Arg⁴¹ y Trp⁵⁰, corresponden respectivamente a la Ser³⁰, Ala³¹, Thr³³, Trp²², Lys¹⁰ y Phe²³ del PCI.

Todo lo explicado anteriormente corrobora que el PCI se parece lo suficiente al EGF y TGF- α como para poder interactuar con su receptor. Esto se ha procedido a comprobarlo en los apartados subsiguientes.

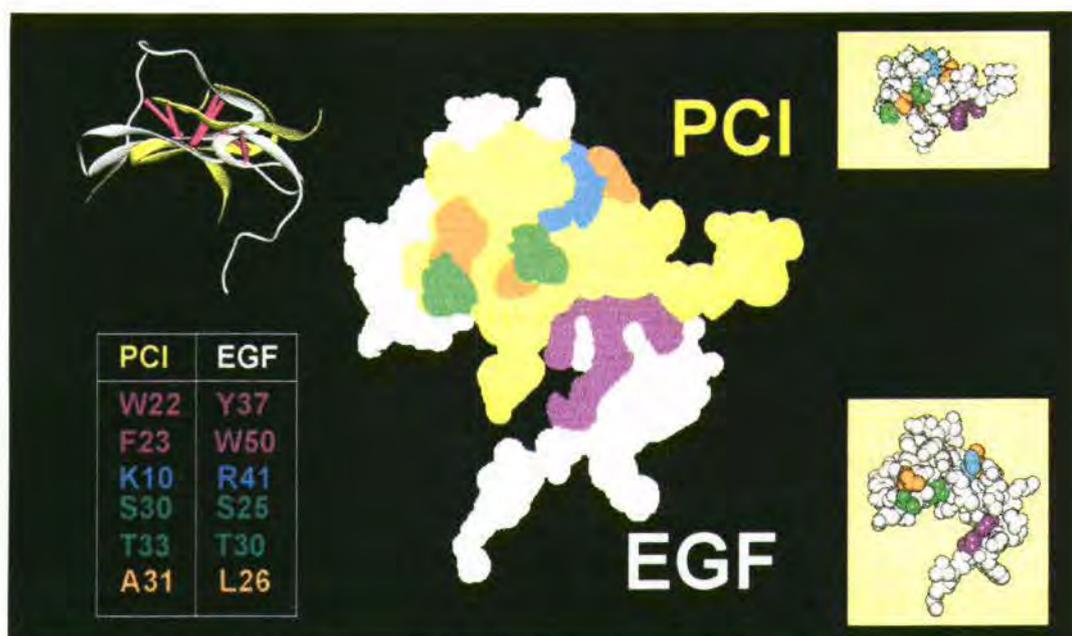


Figura IV.25.: Superposición de las estructuras tridimensionales del PCI y el EGF utilizando el programa Knot-match. Arriba a la izquierda: Representación en cinta de las cadenas de carbonos- α del PCI (rojo) y el EGF (amarillo) superpuestos. Arriba a la derecha: Representación de Van der Waals de las estructuras tridimensionales del PCI y el EGF. Las cadenas laterales de los residuos que coinciden después de la superposición por puentes disulfuro de las dos proteínas están coloreadas según el siguiente código: *marrón*, hidrofóbico no aromático; *azul*, básico; *verde*, polar no cargado; *violeta*, aromático. En el centro: representación de Van der Waals de la superposición de las estructuras tridimensionales del PCI (amarillo) y el EGF (blanco) con el mismo código de colores que en la representación de la derecha. La tabla muestra los residuos que coinciden después de la superposición.

IV.F. MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DEL PCI

Los resultados expuestos han demostrado que el efecto inhibitorio del PCI sobre el crecimiento tumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*, va acompañado de los siguientes fenómenos celulares: internalización y aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas (la población sub G_0), y en menor medida, de células en fase G_0/G_1 . Por su parte, el análisis computacional ha demostrado que el PCI presenta similitudes estructurales, así como posiciones conservadas, con el EGF y el TGF- α humanos. Estos datos sugieren que el PCI podría actuar como un antagonista del EGF/TGF- α , de forma que competiría con estos factores de crecimiento por la unión al receptor de EGF (EGF-R) e inhibiría su activación. Este podría ser el mecanismo molecular responsable del efecto inhibitorio del crecimiento tumoral del PCI, ya que la estimulación del EGF-R por el EGF o el TGF- α parece ser necesaria para la proliferación de una gran variedad de líneas celulares tumorales y carcinomas (Derynck, 1988; Dean y col., 1994; Levitzki, 1996). Evidentemente, la internalización del PCI se podría dar gracias a su unión a este receptor.

Todo esto llevó a realizar una serie de experimentos con el fin de determinar cual es el mecanismo molecular de acción del PCI, para poner a prueba la hipótesis de que el PCI puede actuar como un antagonista del EGF/TGF- α , competir con estos factores de crecimiento por la unión al EGFR e inhibir su activación.

IV.F.1. ESTUDIOS DE LA UNIÓN DEL PCI AL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF-R)

El EGF-R es un receptor de membrana tipo RTK de la familia erbB con actividad tirosina quinasa. Durante su activación se producen una serie de acontecimientos moleculares que se pueden estudiar empleando técnicas específicas:

Acontecimiento molecular	Técnica de estudio
Unión del ligando (EGF o TGF- α)	Ensayos de unión competitiva de ligando
Dimerización del receptor	Ensayos de entrecruzamiento químico seguida de inmunotransferencia
Activación de la actividad quinasa	Ensayos de actividad quinasa con complejos inmunes
Transfosforilación de residuos de Tyr	Ensayos de inmunoprecipitación del receptor, inmunotransferencia y detección de Tyr fosforiladas

Se emplearon las cuatro técnicas citadas para determinar si el PCI actúa como un antagonista del EGF capaz de bloquear los acontecimientos moleculares que acompañan a la activación del receptor.

IV.F.2.a. Competición del PCI con el EGF por la unión al EGF-R

Para confirmar la hipótesis de que el PCI puede actuar como antagonista del EGF, y dado que el primer fenómeno molecular en la activación de un receptor es la unión de su ligando, se determinó si el PCI se unía al EGF-R mediante ensayos de unión competitiva. Este tipo de ensayo se realizó con la línea Capan-1, que presenta 2 subclases de EGF-R, uno de alta afinidad (K_d 0,25 nM) y baja capacidad para el EGF (10-20% del total de receptores), y otro de baja afinidad (K_d 1,78 nM) y alta capacidad para el mismo (Oustry y col., 1990). En primer lugar se realizó una competencia entre ^{125}I -EGF y EGF no marcado (o frío) para confirmar los resultados descritos por Oustry y col.. Después se llevaron a cabo ensayos de competencia entre el ^{125}I -EGF y el PCI, para determinar si el PCI competía con el EGF por la unión a su receptor.

En los ensayos de unión competitiva entre el ^{125}I -EGF y EGF no marcado o PCI (Apartado III.F.1.) se sembraron placas de 24 pocillos con células Capan-1 que se mantuvieron

en cultivo durante 48 h en medio DMEM 10 %FBS. Veinticuatro horas antes del ensayo se sustituyó este medio por medio sin suero. Después se incubaron las células con ^{125}I -EGF y EGF a 4°C durante 5 horas. A la vez se determinó la unión no específica en presencia de un exceso de competidor no marcado, que se restó a la radiactividad total unida para cada una de las concentraciones de competidor no marcado ensayadas, para así obtener el valor de unión específica.

Los resultados que se obtuvieron para la competencia entre el ^{125}I -EGF y EGF se presentan en la Tabla IV.14. A partir de estos datos se determinó el porcentaje de unión específica (P), donde el 100% es la cantidad de unión específica en ausencia de competidor (B_0). Se aplicó la fórmula siguiente para determinar dicho porcentaje:

$$P = \frac{B \times 100}{B_0}$$

donde B es la cantidad de unión específica en presencia de una concentración determinada de competidor.

Tabla IV.14.: Competencia del EGF frente al ^{125}I -EGF, para los receptores de EGF de la línea Capan-1.

[EGF] nM	log [EGF] M	Unión específica (cpm)	Desviación estándar	Porcentaje de unión específica
0,00001	-12	1896,2	94,9	99,9
0,005	-11,3	1641,5	85,0	86,57
0,01	-11	1224,8	86,9	64,59
0,1	-10	844,50	171,9	44,53
1	-9	395,5	43,27	20,33
10	-8	56	10	2,95

En la Figura IV.26. se observa que al representar el log [EGF] en función del porcentaje de unión específica no resultó una línea recta. Este resultado indicaba que el EGF se unía a dos tipos de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad.

Con el fin de comprobar el tipo de unión se realizó una representación de pseudo-Hill o de Logit-log (Pratt y Taylor, 1990). Se utilizaron los datos de porcentaje de unión específica para calcular el $\log(P/[100-P])$, que se representó en función del logaritmo de la concentración de competidor. La pendiente de la recta resultante se denomina coeficiente de pseudo-Hill. Si este coeficiente es igual a -1 indica que el competidor se está uniendo a un solo tipo de receptor, y si el coeficiente es diferente de -1 indica que se puede realizar un ajuste de los datos para un tipo de competición con dos receptores.

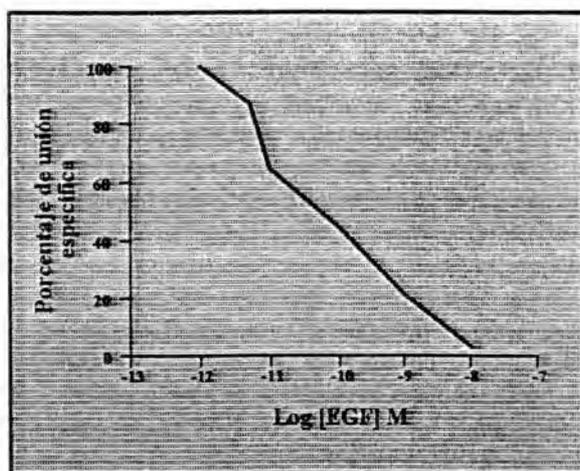


Figura IV.26.: Competencia del EGF frío frente al ^{125}I -EGF. Se representó el logaritmo de la concentración de competidor frente al porcentaje de unión específica. Células de la línea Capan-1 incubadas con concentraciones crecientes de EGF en presencia de 350 pM de ^{125}I -EGF durante 5 h a 4°C.

En la Tabla IV.15. se pueden observar los valores de Logit-log obtenidos a partir de los datos originales, y en la Figura IV.27. se muestra la representación de pseudo-Hill.

Tabla IV.15.: Valores para la representación de Logit-log

Log [EGF] M	Log (P/ [100-P])
-12	2,99
-11,3	0,809212
-11	0,2610825
-10	-0,095292
-9	-0,579147
-8	-1,516677

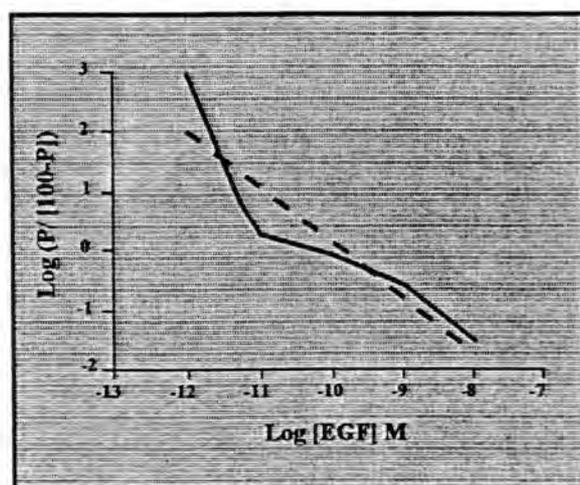


Figura IV.27.: Representación de Logit-log (pseudo-Hill) de unión competitiva EGF/ ^{125}I -EGF. El porcentaje de unión específica P del competidor, EGF, se usó para calcular el log (P/[100-P]), el cual se representó en función del logaritmo de las concentraciones de competidor. Los valores representados son los de la tabla IV.15.

La ecuación de la recta resultante del gráfico fue la siguiente:

$$y = -9,0949 - 0,92058x$$

con un coeficiente de regresión de $r = 0,90804$, resultando que la pendiente de la recta era diferente de -1 y, por lo tanto, se podía considerar que el EGF se estaba uniendo a dos tipos diferentes de receptores, lo cual permitió llevar a cabo un ajuste de los datos para una competición con dos lugares de unión, para lo que se utilizó el programa Graphpad Inplot4. Se realizó un ajuste no lineal para competencia por dos lugares de unión. En la Figura IV.28. se representa el logaritmo de la concentración de competidor frente a los valores de Logit-log.

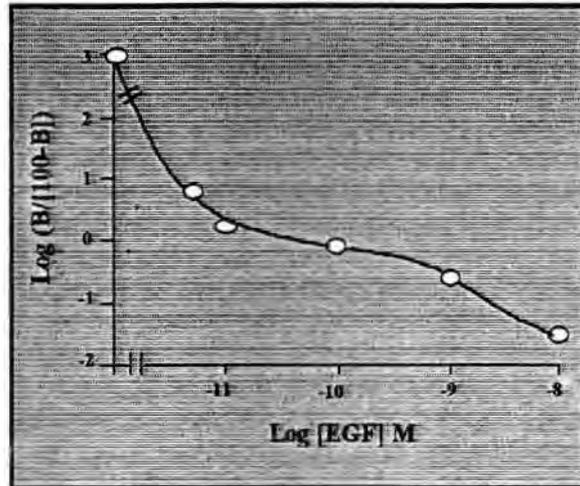


Figura IV.28.: Representación de Logit-log de curvas de competencia del EGF frío frente al ^{125}I -EGF para la línea Capan-1. Los puntos se ajustan con el programa "Graphpad Inplot4" a un tipo de competencia a dos lugares de unión diferentes. Cada valor se determinó por triplicado y en la gráfica se representó el valor medio. (B es el porcentaje de unión específica).

Del ajuste anterior se determinó el valor de IC_{50} para los dos lugares de unión, es decir, la concentración de competidor que inhibe el 50% de la unión específica. Asimismo se calculó el porcentaje de abundancia en la célula de los dos tipos de lugares de unión. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Tabla IV.16.: IC_{50} y porcentaje de abundancia de los dos tipos de receptor para el EGF en la línea Capan-1

Lugar de unión	IC_{50}	% receptores
Alta afinidad	0,6 pM	82,3
Baja Afinidad	2,82 nM	17,8

Una vez caracterizados los tipos de receptor de EGF que presentaban las células de la línea Capan-1, que coincidieron con los descritos por Oustry (1990), se procedió a realizar un estudio de competencia entre el PCI y el ^{125}I -EGF, con el fin comprobar si el PCI compite por los mismos receptores que el EGF. Dicho estudio se llevó a cabo de forma similar a la descrita

para el ^{125}I -EGF y EGF, y a partir del ensayo se determinó la radiactividad unida para cada una de las concentraciones de PCI ensayadas.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IV.17. A partir de estos datos originales se determinó el porcentaje de unión (P).

Tabla IV.17: Competencia del PCI frente al ^{125}I -EGF, para los receptores de EGF de la línea Capan-1.

[PCI] nM	log [PCI] M	Unión específica (cpm)	Desviación estándar	Porcentaje de unión específica
1	-9	1597	100	99
2,32	-8,63	1503,5	130	94,14
23,2	-7,63	1307	117	83,78
232,8	-6,63	1250	212	80,13
2328,2	-5,83	621,5	21,9	39,38
11641	-4,93	582,6	86,19	37,35
46566	-4,33	543,33	88,75	34,83

En la Figura IV.29, se representan los resultados recogidos en la Tabla VI.17. Se observa que al representar el log [PCI] frente al porcentaje de unión a los receptores de EGF en células Capan-1 no se obtiene una línea recta. Esto parece indicar que el PCI se une a los dos tipos de receptores, al de alta y al de baja afinidad.

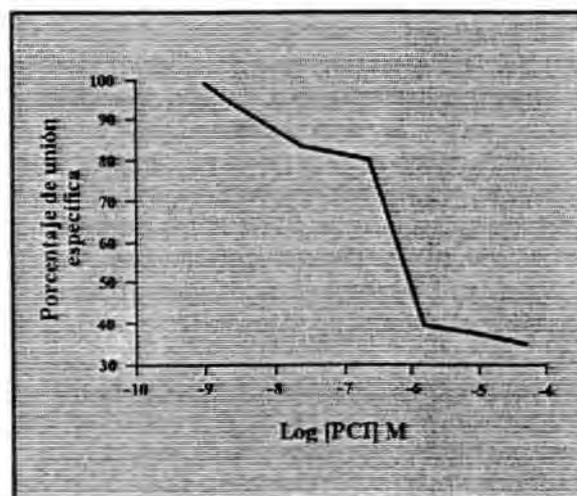


Figura IV.29.: Competencia del PCI frente al ^{125}I -EGF. Se representa el logaritmo de la concentración de inhibidor frente al porcentaje de unión específica. Células de la línea Capan-1 incubadas con concentraciones crecientes de PCI en presencia de 350 pM de ^{125}I -EGF durante 5 h a 4°C.

En este caso también se llevó a cabo una representación de pseudo-Hill o Logit-log, para calcular el coeficiente de pseudo-Hill, y comprobar si el PCI se unía a los dos receptores para

EGF que presentan las células de Capan-1. En la Tabla IV.18. se pueden observar los valores de Logit-log obtenidos a partir de los datos originales, y en la Figura IV.30. se puede observar la representación de pseudo-Hill.

Tabla IV.18. : Valores para la representación de Logit-log

Log [PCI] M	Log (P/ [100-P])
-9	1,99
-8,63	1,205
-7,63	0,713
-6,63	0,605
-5,83	-0,1873
-4,93	-0,2246
-4,33	-0,272

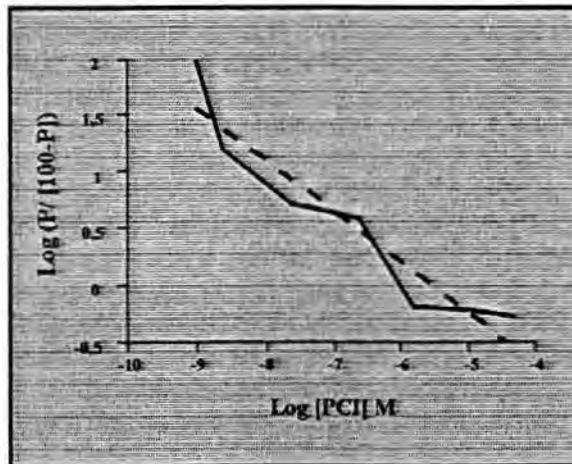


Figura IV.30.: Representación de Logit-log (pseudo-Hill) de unión competitiva PCI/¹²⁵I-EGF. El porcentaje de unión específica P del competidor, PCI, se usó para calcular el log (P/[100-P]), el cual se representó en función del logaritmo de las concentraciones de competidor. Los valores representados son los de la tabla IV.18.

La ecuación de la recta resultante del gráfico fue la siguiente:

$$y = -2,4589 - 0,44789x$$

con un coeficiente de regresión de $r = 0,94546$. La pendiente de la recta obtenida fue diferente de -1 y, por lo tanto, se dedujo que el PCI se está uniendo a dos tipos diferentes de receptores y que era correcto hacer el ajuste de los datos para una competición con dos lugares de unión.

Seguidamente se realizó una representación (mediante el programa Graphpad Inplot 4) con un ajuste no lineal para analizar la competencia por dos lugares de unión, como se había hecho para el EGF, representando el logaritmo de la concentración de competidor frente a los valores de Logit-log (Figura IV.31).

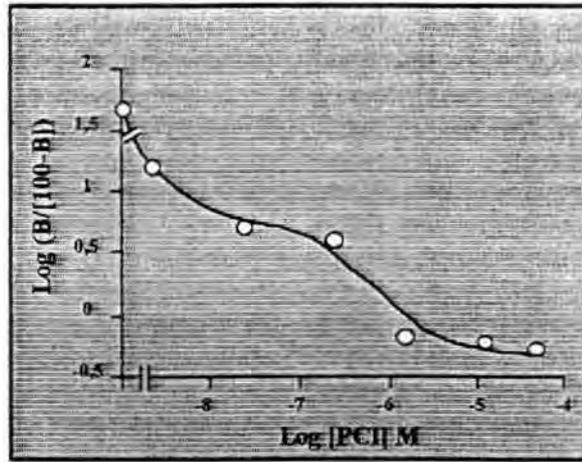


Figura IV.31.: Representación de Logit-log de curvas de competencia del PCI frente al ^{125}I -EGF para la línea Capan-1. Los puntos se ajustaron con el programa "Graphpad Inplot4" a un tipo de competencia a dos lugares de unión diferentes. Cada valor se determinó por triplicado y en la gráfica se representó el valor medio. (B es el porcentaje de unión específica).

Del ajuste anterior se determinó el porcentaje de cada tipo de lugares de unión y el valor de IC_{50} de ambos para el PCI. Los resultados se presentan en la Tabla IV.19.

Tabla IV.19.: IC_{50} y porcentaje de abundancia de los dos tipos de receptor para el PCI en la línea Capan-1

Lugar de unión	IC_{50}	% receptores
Alta afinidad	98.7 pM	90
Baja Afinidad	0,579 μM	10

Así pues, los resultados descritos demuestran que el PCI compite con el EGF por la unión a los dos tipos de receptores para dicho factor de crecimiento, de baja y de alta afinidad, que presentan las células de la línea Capan-1. El desplazamiento de EGF por PCI se produjo mayoritariamente en el receptor de alta afinidad, siendo la afinidad del PCI a dicho receptor unas 165 veces inferior a la del EGF.

IV.F.1.b. Inhibición por el PCI de la dimerización del EGF-R inducida por el EGF

Una vez se sabía que el PCI se unía al receptor de EGF, se estudió si inhibía la siguiente etapa en la activación del receptor, es decir, su dimerización. Para ello se utilizó la línea de carcinoma epidermoide A431, que se caracteriza por tener una elevada cantidad de EGF-R (2×10^6 moléculas por célula, Weber y col., 1984), lo que facilita su detección.

Se obtuvieron lisados celulares de la línea A431 (Apartado III.F.3.a.), en los que se indujo la dimerización del EGF-R con EGF, en presencia o ausencia de PCI. A continuación se

añadió un entrecruzador químico (glutaraldehído) y las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% con SDS y se electrotransfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se inmunorevelaron con anticuerpos contra el EGF-R.

La estabilización química de los dímeros de receptor inducidos por la unión del EGF permite, una vez realizada la electroforesis de las muestras y posterior electrotransferencia, la detección de 2 bandas diferentes, una de 170 KDa que corresponde al monómero del EGF-R y una de 340 KDa que corresponde al dímero.

En primer lugar se realizaron ensayos con diferentes cantidades de lisado celular y diferentes concentraciones de EGF para determinar cuales eran las condiciones óptimas para la formación de los dímeros. Se observó que cuando se usaba 1 μg de lisado celular, con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF había una formación apreciable de dímero y con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la mayoría del receptor estaba dimerizado. Y si se utilizaban 10 μg de extracto celular con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF el receptor ya estaba mayoritariamente como dímero. Así se decidió que para ensayos posteriores se trabajaría con 10 μg de lisado celular y se induciría la dimerización con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF. Como se verá en posteriores apartados esta concentración es mucho más alta que la que se necesita para observar la estimulación de la actividad quinasa del receptor o la transfosforilación de los residuos de Tyr del propio receptor, esto se debe a que los ensayos de dimerización se realizan *in vitro*, es decir, se trabaja con el receptor extraído de las células altamente concentrado, y por este motivo se requieren grandes cantidades de EGF.

A continuación se estudiaron los efectos del PCI sobre la dimerización del EGF-R inducida por EGF. En estos ensayos se emplearon concentraciones relativamente elevadas de PCI, ya que se mantuvieron las proporciones con las que se había observado que el PCI revertía el efecto estimulador del EGF en los ensayos de proliferación (EGF:PCI, 1:5000). Y con el fin de descartar la posibilidad de que una inhibición de la dimerización del EGF-R producida por el PCI pudiera ser inespecífica (es decir, debida a la presencia de una alta concentración de proteína total) se realizaron controles en los que en lugar de PCI se añadió insulina o BSA a la misma concentración.

Los resultados de los estudios de dimerización del EGF-R en presencia o ausencia de PCI se muestran en la Figura IV.32. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes y se obtuvieron los mismos resultados. Se observó que ni la insulina a concentraciones 1 ó 7 mg/mL ni la BSA a concentraciones 1 ó 5 mg/mL eran capaces de inhibir la dimerización del EGF-R inducida por 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF (Figura IV.32.A.), mientras que el PCI a una concentración de 5 mg/mL producía una inhibición total de la dimerización inducida por el EGF. Concentraciones inferiores de PCI (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 mg/mL) también tenían un cierto efecto inhibitorio de la dimerización (Figura IV.32.B). Por lo tanto, se puede concluir que el

PCI es un antagonista del EGF que inhibe la dimerización del EGF-R inducida por dicho factor de crecimiento.

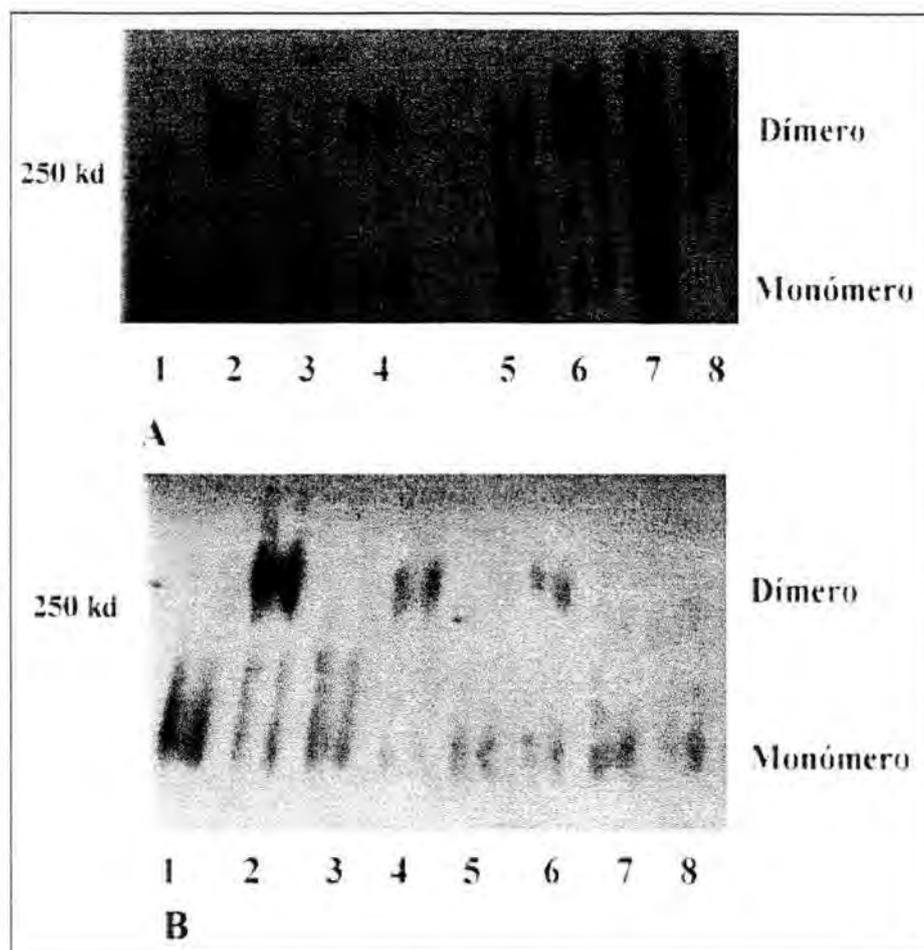


Figura IV.32. : Análisis por transferencia tipo Western de la dimerización del EGF-R inducida por el EGF en presencia o ausencia de PCI.

A, Lisados celulares de A431 incubados con: 1. Insulina 1 mg/mL, 2. Insulina 1 mg/mL + EGF 1 μ g/mL, 3. Insulina 7 mg/mL, 4. Insulina 7 mg/mL + EGF 1 μ g/mL, 5. BSA 1 mg/mL, 6. BSA 1mg/mL + EGF 1 μ g/mL, 7. BSA 5 mg/mL, 8. BSA 5 mg/mL + EGF 1 μ g/mL.

B, Lisados celulares de A431 incubados con: 1. Tampón, 2. EGF 1 μ g/mL, 3. PCI 100 μ g/mL, 4. EGF 1 μ g/mL + PCI 100 μ g/mL, 5. PCI 1 mg/mL, 6. EGF 1 μ g/mL + PCI 1 mg/mL, 7. PCI 5 mg/mL, 8. EGF 1 μ g/mL + PCI 5 mg/mL.

Los lisados se entrecruzaron químicamente durante 1 min con 60 mM glutaraldehído. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

IV.F.1.c. Efecto inhibitorio del PCI sobre la inducción por EGF de la actividad quinasa del EGF-R

La siguiente etapa en la activación del EGF-R, después de la dimerización, es la estimulación de su actividad quinasa. Por ello se procedió a analizar si el PCI podía inhibir la actividad quinasa del receptor, tanto en estado basal como bajo estimulación por EGF. Estos ensayos se realizaron con las líneas celulares A431 y Capan-1.

Los ensayos de detección de actividad quinasa se realizaron como se describe en el Apartado III.F.4.c. Básicamente el protocolo empleado fue el siguiente: las células se lisaron, se inmunoprecipitó el EGF-R de los extractos celulares con anticuerpos contra el mismo y los complejos inmunes se precipitaron con pansorbina (células de *Staphylococcus aureus* muertas por calor que presentan una elevada densidad de proteína A en su superficie, la proteína A interacciona con una alta afinidad con la región Fc de las IgGs). La actividad quinasa del receptor inmunoprecipitado se midió incubando los complejos con [γ - 32 P]ATP durante 10 min. Finalmente, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacríamida-SDS al 8% seguida de autorradiografía. Las bandas se cuantificaron mediante un contador beta.

En primer lugar se realizaron ensayos para determinar la influencia del PCI en el nivel de actividad quinasa basal (en ausencia de EGF) del EGF-R. Para ello, se incubaron las células de las líneas A431 y Capan-1 con diferentes concentraciones de PCI durante 10 min, y a continuación se llevó a cabo el ensayo de detección de la actividad quinasa. Los resultados obtenidos para la fosforilación basal de la línea A431 se presentan en la Tabla IV.20. Como se puede observar, se llevaron a cabo 5 experimentos independientes. Se consideró como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI.

Tabla IV.20.: Actividad quinasa basal del receptor de EGF de las células A431, previo tratamiento de éstas con PCI durante 10 min.

Incubación con PCI (μg/mL)	Actividad quinasa del EGF-R (%)
0	100
1	68
50	80
50	78
50	61

Como se puede observar el PCI provocó una disminución clara de la actividad quinasa basal del receptor de EGF de las células A431. Esta inhibición de la actividad basal del receptor osciló entre el 20 y el 40%.

En el caso de Capan-1 sólo se ensayó una concentración de PCI en tres experimentos independientes. Los resultados de actividad quinasa basal se presentan en la Tabla IV.21. Al igual que para A431 se consideró como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI. En este caso la inhibición de la actividad basal osciló entre un 10 y un 30%.

Tabla VI.21.: Actividad quinasa basal del receptor de EGF de las células Capan-1, previo tratamiento de éstas con PCI durante 10 min.

Incubación con PCI ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad quinasa del EGF-R (%)
0	100
50	88
50	90
50	70

A continuación se llevaron a cabo ensayos de detección de actividad quinasa del EGF-R en células estimuladas con EGF (Apartado III.F.4.c.) para determinar cual era la concentración de factor de crecimiento que inducía un grado de activación apreciable de la actividad quinasa. En estos ensayos se usaron células que se mantuvieron privadas de suero durante 24 h. y que se trataron con distintas concentraciones de EGF durante 10 min. Como se puede observar en la Figura IV.33.A, en el caso de la línea Capan-1 una concentración entre 1 y 10 ng/mL era suficiente para observar una estimulación significativa de la actividad quinasa del receptor. Y para la línea A431 la estimulación con 1 ng/mL de EGF fue suficiente para detectar un incremento observable de la incorporación de fósforo radiactivo por el EGF-R. (Figura IV.33.B). En este caso al tratarse de ensayos *in vivo* en los que se estimula a la célula entera en cultivo, las concentraciones de EGF que se requieren para producir la activación del EGF-R son del orden de 1000 veces inferiores, a las necesarias para observar la dimerización del receptor en ensayos en los que se emplean extractos celulares.

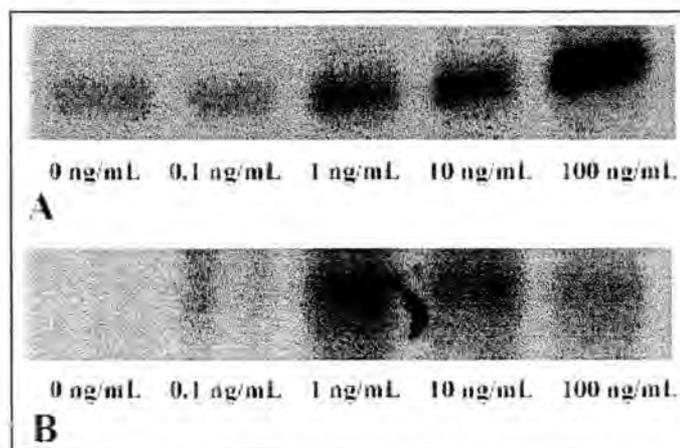


Figura IV.33.: Análisis por ensayos de actividad quinasa con complejos inmunes (ICKA) de la activación del EGF-R inducida por el EGF en las líneas Capan-1(A) y A431 (B). Células de las líneas Capan-1 y A431 privadas de suero se estimularon con diferentes concentraciones de EGF durante 10 min y posteriormente se midió la incorporación de fósforo radiactivo.

Una vez determinada la mínima concentración de EGF necesaria para activar de forma significativa a su receptor en las dos líneas celulares en estudio, se realizaron ensayos para determinar si el PCI era capaz de inhibir dicha activación. Estos ensayos se llevaron a cabo con células que también se mantuvieron privadas de suero durante 24 h, y que posteriormente se trataron con diferentes concentraciones de PCI durante 10 min e inmediatamente se estimularon con EGF (5 ng/mL para Capan-1 y 1 ng/mL para A431) durante otros 10 min. Para cada línea se realizaron tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en el caso de la línea Capan-1 se presentan en la Tabla IV.22. y la Figura IV.34.A. Nuevamente se consideró como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI o EGF.

Tabla IV.22.: Actividad quinasa del receptor de EGF después del tratamiento de las células Capan-1 con PCI, durante 10 min, y posteriormente con EGF, 10 min más.

Muestra	Actividad quinasa del receptor (%)
Control	100
50 µg/mL PCI	70
5 ng/mL EGF	240
5 ng/mL EGF+ 1 µg/mL PCI	180
5 ng/mL EGF + 10 µg/mL PCI	170
5 ng/mL EGF + 50 µg/mL PCI	120

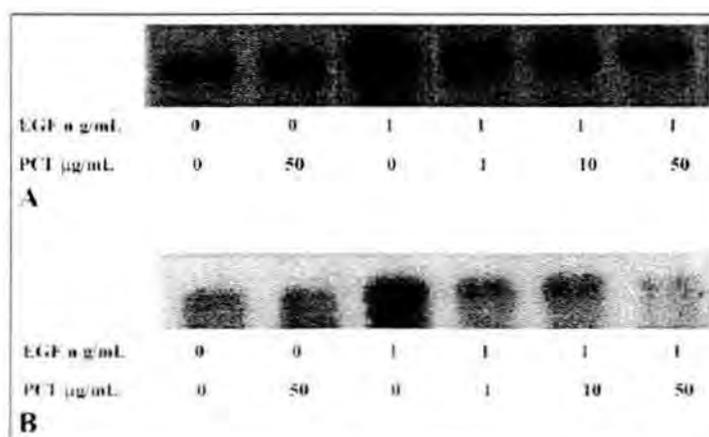


Figura IV.34.: Inhibición por el PCI de la activación del EGF-R inducida por el EGF en las líneas Capan-1(A) y A431 (B). Células de las líneas Capan-1 y A431 privadas de suero fueron tratadas con diferentes concentraciones de PCI durante 10 min y inmediatamente estimuladas con EGF durante 10 min. La activación del receptor se midió mediante ensayos de actividad quinasa con complejos inmunes.

Como se puede observar, el PCI no tan solo inhibe la actividad quinasa basal del EGF-R, sino que provoca la disminución de la actividad quinasa inducida por el EGF. Esta inhibición de la actividad quinasa inducida por EGF se incrementó al aumentar la dosis de PCI, y fue de un 50% en el caso de la concentración de PCI de 50 $\mu\text{g/mL}$.

El mismo tipo de ensayo se realizó con la línea A431, es decir, se estudió la estimulación de la actividad quinasa del receptor de EGF inducida por el propio EGF y el efecto que tenía el PCI. Los resultados se presentan en la Tabla IV.23 y la figura IV.34.B. Nuevamente se tomó como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI o EGF.

Tabla IV.23.: Actividad quinasa del EGF-R después del tratamiento de las células A431 con PCI, durante 10 min, y posteriormente con EGF, 10 min más.

Muestra	Actividad quinasa del EGF-R (%)
Control	100
Tratada con 50 $\mu\text{g/mL}$ PCI	77
Tratada con 1 ng/mL EGF	200
Tratada con 1 ng/mL EGF + 1 $\mu\text{g/mL}$ PCI	126
Tratada con 1 ng/mL EGF + 10 $\mu\text{g/mL}$ PCI	108
Tratada con 1 ng/mL EGF + 50 $\mu\text{g/mL}$ PCI	53

En las células A431, el PCI produjo el mismo efecto que en el caso de la línea Capan-1, pero en este caso el efecto inhibitorio de la actividad quinasa del receptor fue mucho más marcado, pues para la dosis de PCI más alta, 50 $\mu\text{g/mL}$, dicha actividad quedó reducida a la mitad de la actividad basal. Por lo tanto podemos concluir que el PCI es un antagonista del EGF, que inhibe su efecto estimulador de la actividad quinasa del EGF-R.

IV.F.1.d. Inhibición debida al PCI de la transfosforilación del EGF-R inducida por el EGF

El último paso en la activación del EGF-R es la transfosforilación en residuos de tirosinas, es decir, la fosforilación de tirosinas específicas de la molécula de receptor por parte de la molécula de receptor inmediatamente adyacente. Los experimentos descritos hasta el momento demostraron que el PCI compite con el EGF por la unión a su receptor e inhibe la dimerización y la actividad quinasa del EGF-R inducida por el EGF. Por lo tanto, sólo faltaba comprobar que el PCI también bloquea la transfosforilación del EGF-R inducida por su ligando para poder concluir que el PCI tiene un efecto inhibitorio sobre todos los pasos de la activación del EGF-R por el EGF.

La transfosforilación del EGF-R puede estudiarse utilizando ensayos de detección por inmunotransferencia de tirosinas fosforiladas (Apartado III.F.4.d). En estos ensayos se usaron células de las líneas Capan-1 y A431 que se mantuvieron privadas de suero durante 24 h. Posteriormente se trataron con diferentes concentraciones de PCI durante 10 min e inmediatamente se estimularon con EGF (5 ng/mL para Capan-1 y 1 ng/mL para A431) durante otros 10 min sin retirar el PCI. Posteriormente se lisaron las células, se inmunoprecipitó el EGF-R de los extractos celulares y se analizaron los inmunoprecipitados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8 % seguida de electrotransferencia a membranas de PVDF. Las membranas se inmunorevelaron con anticuerpos contra tirosinas fosforiladas. Los grados relativos de fosforilación del EGF-R se cuantificaron por densitometría. Para cada una de las líneas se realizaron tres experimentos independientes.

En este caso, se trabaja con concentraciones de EGF equivalentes a la de los ICKAs dado que también se trata de un ensayo *in vivo*.

En la Tabla IV.24. y la Figura IV.35.A. se presentan los resultados para uno de los ensayos de la línea Capan-1 representativo del resto. Se estudió la transfosforilación del receptor de EGF inducida por el propio EGF, y el efecto que tenía el PCI cuando se incubaba conjuntamente con el EGF. Se consideró como 100 % el grado de fosforilación en ausencia de PCI o EGF y se comparó con éste el grado de fosforilación de las células tratadas con EGF sólo o con PCI.

Tabla IV.24.: Grado de fosforilación del EGF-R de las células Capan-1, después del tratamiento con PCI, durante 10 min, y posteriormente con EGF, 10 min más.

Muestra	Grado de fosforilación
Control	100
Tratada con 50 µg/mL PCI	327
Tratada con 5 ng/mL EGF	697
Tratada con 5 ng/mL EGF + 1 µg/mL PCI	722
Tratada con 5 ng/mL EGF + 10 µg/mL PCI	856
Tratada con 5 ng/mL EGF + 50 µg/mL PCI	443

Como se puede apreciar, se observó una disminución del 36% de la transfosforilación del EGF-R inducida por el EGF con la concentración de PCI de 50 µg/mL, mientras que concentraciones inferiores de PCI no tuvieron efectos significativos sobre los niveles de transfosforilación del receptor.

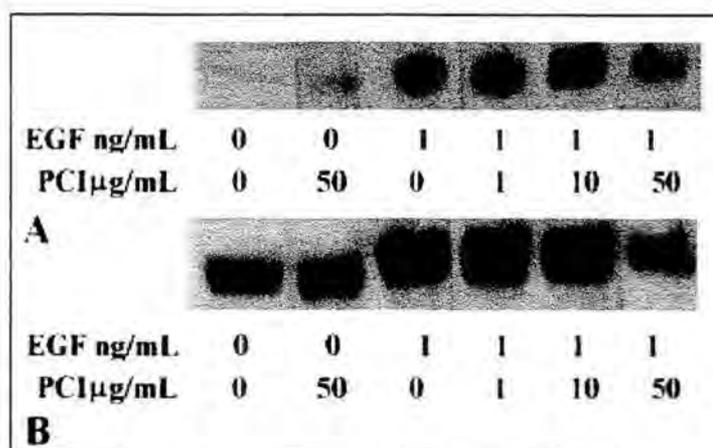


Figura IV.35.: Inhibición por el PCI de la transfosforilación del EGF-R inducida por el EGF en las líneas Capan-1(A) y A431 (B). Células de las líneas Capan-1 y A431 privadas de suero fueron tratadas con diferentes concentraciones de PCI durante 10 min y inmediatamente estimuladas con EGF durante 10 min. La transfosforilación del receptor se midió mediante inmunoprecipitación del receptor, seguida de transferencia tipo western y relevado con anticuerpos antifosfotirosina.

El mismo tipo de ensayo se realizó con la línea A431. Los resultados se presentan en la Tabla IV.25. y la figura IV.35.B. Nuevamente se tomó como 100% el grado de fosforilación en ausencia de PCI o EGF y se comparó con éste el grado de fosforilación de las células tratadas con EGF sólo o con PCI.

Tabla IV.25 : Grado de fosforilación del EGF-R de las células A431, después del tratamiento con PCI, durante 10 min, y posteriormente con EGF, 10 min más.

Muestra	Grado de fosforilación
Control	100
Tratada con 50 $\mu\text{g/mL}$ PCI	327
Tratada con 5 ng/mL EGF	697
Tratada con 5 ng/mL EGF + 1 $\mu\text{g/mL}$ PCI	722
Tratada con 5 ng/mL EGF + 10 $\mu\text{g/mL}$ PCI	876
Tratada con 5 ng/mL EGF + 50 $\mu\text{g/mL}$ PCI	443

Para las células A431, el PCI produjo el mismo efecto que en el caso de la línea Capan-1, pero en este caso el efecto inhibitorio de la transfosforilación del receptor se observó a concentraciones de PCI inferiores, 10 $\mu\text{g/mL}$, y la inhibición producida fue algo inferior, alrededor del 25%. Así pues, se podía concluir que el PCI actúa de antagonista del EGF, pues inhibe los cuatro pasos de la activación del EGF-R por dicho factor de crecimiento.

VI.G. DISCUSIÓN GENERAL

Actualmente se están realizando muchos esfuerzos para encontrar nuevas moléculas que interfieran en las vías de transducción de la señal con el objeto de emplearlas en el tratamiento de tumores y otras enfermedades caracterizadas por una proliferación celular excesiva (Levitzki, 1996). Entre dichas moléculas se incluyen antagonistas de factores de crecimiento que se unan a sus receptores sin activarlos (Baselga y Mendelsohn, 1994; Groenen y col., 1994; Zumkeller y Schofield, 1995). Dichos antagonistas presentan un interés tanto teórico como clínico, porque pueden permitir un mejor conocimiento de las interacciones responsables de la unión de los factores de crecimiento a sus receptores, así como su uso como nuevas drogas antitumorales y para otras disfunciones como la psoriasis (Levitzki, 1996).

El EGF-R es uno de los receptores de factores de crecimiento más estudiado debido a su importancia en el desarrollo y funcionalidad de los tejidos epiteliales, así como de los carcinomas, donde a menudo está sobreexpresado. El EGF y el TGF- α se unen a este receptor, cuya activación es necesaria para la proliferación de numerosos tipos celulares y células tumorales (Weiss y col., 1997). Muchos de los tumores que sobreexpresan el EGF-R producen de forma simultánea alguno de sus ligandos, generalmente el TGF- α , que actúa de forma autocrina. Este bucle autocrino proporciona a las células tumorales una ventaja proliferativa y se correlaciona con un aumento de su potencial invasivo y metastásico (Khazaie y col., 1993).

Pese a la importancia del EGF-R, hasta el momento no se había descubierto ningún antagonista del EGF ni del TGF- α humanos. En el presente trabajo se demuestra que el PCI es el primer análogo antagonista del EGF humano que se describe. Además, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células tumorales, probablemente debido a que el nivel de activación del EGF-R se reduce. A continuación se discuten los resultados del presente trabajo que han permitido llegar a esta conclusión.

Los experimentos de unión competitiva al receptor de EGF-R han demostrado que el PCI compite con el EGF por la unión a su receptor. La afinidad del receptor de EGF por el PCI es mucho menor que por el EGF, como era de esperar. La internalización del PCI por las células se debe, probablemente, a la endocitosis del EGF-R una vez el PCI se ha unido al mismo. Algunas evidencias indirectas apoyan esta hipótesis. Primero, después de su internalización, el PCI se localiza alrededor del núcleo, como el EGF (Fish y col., 1993). Segundo, el PCI no es alterado por las células, lo que descarta la posibilidad de que el PCI se una a una metalocarboxipeptidasa de membrana, dado que cuando el inhibidor se une a este tipo de enzimas su último residuo es rápidamente cortado (Hass y Ryan, 1981). Tercero, el PCI experimenta varios ciclos de aparición y desaparición del medio de cultivo, lo que puede deberse al reciclado y degradación lisosomal del receptor (Masui et al, 1993). En el caso del

EGF, se ha observado que si añade dicho factor de crecimiento 10 veces en exceso respecto a la cantidad de receptores presentes en la superficie celular, la mayoría del EGF se consume en 2 horas. Este consumo resulta ser muy superior al número de EGF-Rs regulado negativamente o degradado, por lo que debe existir un reciclaje del EGF-R. Además, el EGF internalizado sufre un procesamiento limitado en los lisosomas, y tanto el EGF intacto como las especies procesadas se liberan de nuevo al medio de cultivo y pueden volver a unirse al EGF-R (Korc y Magun, 1985; French, 1995). Por lo tanto, la aparición y desaparición del PCI del medio de cultivo podría explicarse por su unión al EGF-R y posterior reciclado, una vez internalizado, de forma idéntica a la observada para el propio EGF.

El PCI no sólo se une al EGF-R, sino que también inhibe la activación del receptor inducida por el EGF. Los experimentos realizados en medios libres de suero con las células Capan-1 y A431 han demostrado que la unión del PCI no activa significativamente al EGF-R, y que dicha proteína inhibe la dimerización del receptor, el incremento de actividad quinasa y la transfosforilación en residuos de tirosina inducidos por el EGF (Figuras IV.32.; IV.34.; IV.35.). En células libres de suero, el nivel de activación del EGF-R es muy bajo, y aumenta muy significativamente después de la adición de EGF. Por contra, en células creciendo en presencia de FBS, se ha observado un nivel de activación del EGF-R significativo, probablemente debido a la presencia de factores de crecimiento en el suero capaces de activar al receptor. En estas condiciones, la adición de EGF no tiene ningún efecto en los niveles de activación del EGF-R, mientras que el PCI reduce la actividad quinasa del receptor de manera significativa, lo que sugiere que el inhibidor compite con los factores de crecimiento presentes en el suero por la unión al EGF-R.

Al comparar, mediante métodos computacionales, las estructuras tridimensionales del PCI y de otras proteínas del grupo de las notinas, se ha puesto de manifiesto que el PCI presenta similitudes estructurales con el EGF que pueden explicar su actividad antagonista. El PCI y el EGF son proteínas pequeñas con 3 puentes disulfuro dispuestos en el espacio de manera especial formando el denominado nudo de cisteínas (Figura IV.36.). El grupo ha desarrollado un programa de ordenador para superponer proteínas mediante la alineación estructural de sus puentes disulfuro. Cuando se aplica dicho programa al PCI y otros factores de crecimiento tales como el EGF, TGF- α y heregulina, se observa que 2 bucles del inhibidor y parte de su cola C-terminal se superponen con los bucles correspondientes de los factores de crecimiento. También algunos de los aminoácidos del EGF implicados en la unión al receptor coinciden en el espacio con residuos del PCI con características físico-químicas similares (Groenen y col., 1994; Campion y Niyogi, 1994).

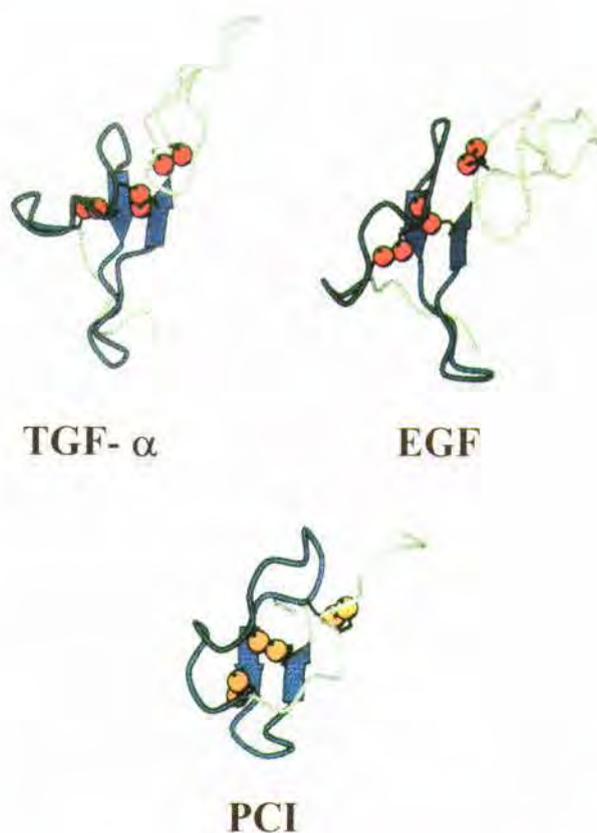


Figura IV.36. : Ejemplos de proteínas con plegamiento tipo nudo de cisteínas: TGF- α , EGF y PCI (Tomado de Lin y Nussinov, 1995).

En los diferentes ensayos de proliferación se ha demostrado el efecto inhibitor del PCI sobre el crecimiento de líneas de adenocarcinoma pancreático humano con diferentes grados de diferenciación, y de insulinomas de hámster y ratón. Los valores de inhibición han oscilado entre el 15 y el 60%, a concentraciones del inhibidor entre 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, y han aparecido a partir de los 8 días de tratamiento. En el caso de las células Capan-1 cultivadas en medio con suero, el efecto del PCI aparece a partir de los 10 días de cultivo, y sólo si se emplean concentraciones de inhibidor iguales o superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$. En células creciendo en medio con suero, el PCI probablemente compite con los factores de crecimiento capaces de unirse al EGF-R presentes en el suero y con el TGF- α producido por las propias células Capan-1. Apoya esta hipótesis la observación de que, en células cultivadas en presencia de suero, el PCI reduce el nivel de fosforilación del EGF-R.

La inhibición del crecimiento de Capan-1 por el PCI se correlaciona con los resultados obtenidos en los análisis del ciclo celular, que indican que después de 12 días de tratamiento con PCI, el porcentaje de células apoptóticas se incrementa significativamente respecto al control. También se observa un pequeño aumento del número de células en fase G1. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por Wu et al (1995), que utilizaron anticuerpos monoclonales contra el EGF-R que inhiben la unión del EGF, y observaron que en algunas líneas celulares dichos anticuerpos inducen parada en G1 o apoptosis. También concuerdan con la observación de que un inhibidor selectivo de la actividad quinasa del EGF-R, el CP-338,774, inhibe el crecimiento de las células de cáncer de colon humanas DiFi al inducir apoptosis y parada del ciclo celular en G1 (Moyer y col., 1997). Así pues, moléculas que, como el PCI, inhiben la activación del EGF-R, también afectan al ciclo celular e inhiben el crecimiento.

Los análisis de expresión génica han revelado que los niveles de mRNA de p53 son superiores en células Capan-1 tratadas con PCI durante 12 días, aunque no se han observado diferencias significativas en los niveles de proteína. Por lo tanto, no está del todo claro que el incremento en la expresión del gen de la p53 sea el responsable de los cambios inducidos por el PCI en el ciclo celular. Estos cambios podrían ser debidos a la estimulación de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (que no han sido objeto de estudio en esta tesis), tal y como se ha observado en el caso de los anticuerpos anti EGF-R (Wu y col., 1996). Con todo, diversos estudios indican que la falta de factores de crecimiento puede provocar un aumento de los niveles totales de p53 debido, al menos en parte, a la estabilización de la proteína, que normalmente se degrada rápidamente (Bates y Vousden, 1996). También se ha observado que el tratamiento de células A431 con EGF induce una disminución de la expresión de p53 (Gulli y col., 1996). El PCI, al competir con el EGF por la unión a su receptor, impediría la acción del EGF. La célula puede suplir dicha carencia gracias a la presencia de un bucle autocrino de TGF- α o anfiregulina (como los que se han descrito para la línea Capan-1). Pero la presencia continuada de PCI en el medio reduciría la unión de ligandos al EGF-R y las células Capan-1 podrían responder sobreexpresando la p53, lo que explicaría la elevación de los niveles de su mensajero.

En el caso de la línea Panc-1, se ha descrito que no responde al EGF, a pesar de tener receptores para dicho factor de crecimiento. Parece ser que la falta de estimulación es debida a una saturación de los receptores de EGF por el TGF- α producido por dicha línea (Watanabe y col., 1996). Dicho bucle autocrino mantiene el crecimiento de las células a un ritmo elevado. El PCI también inhibe el crecimiento de esta línea, aunque en menor grado que el observado para la línea Capan-1. Dicha inhibición concuerda con los resultados obtenidos por Wagner y col. (1996) cuando utilizaron anticuerpos antiTGF- α o expresaron un EGF-R truncado en dicha línea. En ambos casos se observó una inhibición parcial del crecimiento de Panc-1, asociada a un descenso en el nivel de fosforilación del EGF-R. Por otro lado, se ha descrito que diferentes tirfostinas (inhibidores de proteína quinasas) tienen un efecto citostático y reversible sobre el crecimiento de Panc-1, posiblemente vía EGF-R (Gillespie y col., 1993). Por lo tanto, es probable que en la línea Panc-1, al igual que en la línea Capan-1, el PCI inhiba el crecimiento

debido a que se une al EGF-R sin activarlo y bloquea así la unión de sus ligandos. Posiblemente, el hecho de que en Panc-1 el bucle autocrino de TGF- α sea más potente que en Capan-1, hace que la inhibición observada sea inferior.

Los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación con células Capan-1, cultivadas en medio libre de suero, indican que el efecto antiproliferativo del PCI se debe, probablemente, al hecho de que actúa como un antagonista del EGF. El EGF añadido a células Capan-1 en medio libre de suero estimula la proliferación, pero este efecto desaparece si simultáneamente se administra PCI a las células. Este resultado concuerda con los que se obtienen cuando se estudia la activación del EGF-R. Sin embargo, el efecto estimulador de la insulina en las células Capan-1 no se ve afectado por la presencia de PCI. El inhibidor es, por tanto, capaz de suprimir específicamente el efecto proliferativo del EGF en células Capan-1.

Cuando las células Capan-1 o iCAII-2 se hacen crecer en presencia de PCI durante, al menos, 3 semanas y después se cultivan en medio nuevo, el crecimiento de las células, incluso en ausencia de PCI, resulta significativamente inferior al de las células control. Si el pretratamiento con PCI produce una regulación negativa del EGF-R ("down regulation"), como indican resultados obtenidos por el grupo (M.A. Molina y M. Sitjà comunicación personal), las bajas cantidades de EGF-R podrían ser las responsables de la reducción en el crecimiento de las células tratadas. Este efecto a largo plazo concuerda con el observado por Ben-Bassat y col. (1997). En este caso, al tratar queratinocitos inmortalizados con el virus de papiloma humano 16 con el anticuerpo AG 1478 (bloqueante selectivo de la actividad quinasa del receptor de EGF), aparece una inhibición del crecimiento del que las células no se recuperan aunque cese el tratamiento.

En el presente trabajo se han utilizado diferentes modelos *in vivo* para el estudio del efecto del PCI sobre el crecimiento tumoral. En el caso de ratones singénicos para la línea de melanoma B16, se ha observado que el pretratamiento *in vitro* de las células con PCI provoca que, una vez inoculadas en el bazo de ratones singénicos, den lugar a un número más reducido de metástasis hepáticas. Una posible explicación podría deducirse del hecho de que la estimulación de la actividad quinasa del EGF-R induce una serie de efectos pleiotrópicos que abarcan desde la mitosis hasta el movimiento celular (Ullrich y Schlessinger, 1990). Por ejemplo, la activación del EGF-R por el EGF produce alteraciones en el contenido de actina-F y la organización del citoesqueleto que, en general, se correlacionan con un potencial metastásico alterado (van der Heyden y col., 1997). Dado que las células de melanoma con menor capacidad metastásica se pretrataron durante 4 días con PCI, esta capacidad metastásica alterada puede ser debida a que el PCI haya producido una regulación negativa del EGF-R, y con ello una reducción de la capacidad de respuesta de las células al EGF presente en el entorno fisiológico. Un efecto inhibitorio de la metástasis, inducido por una regulación negativa

del EGF-R, se ha observado en un modelo experimental de metástasis en pulmón, al tratar los ratones con anticuerpos anti EGF-R (Aboud-Pirak y col. 1988). Por otro lado, en estudios *in vitro* con la línea Capan-1, se ha observado que el PCI reduce 7,8 veces la expresión del mRNA de tripsina. Esta reducción de la expresión de la tripsina aporta otra posible explicación al efecto del inhibidor sobre la formación de metástasis, pues Koivunen y col.(1991) han descrito que el TAT-2, un isoenzima del tripsinógeno, es uno de los componentes de la cascada de proteasas que la célula utiliza para la migración a través de las barreras tisulares. Así, si la célula ve reducida su capacidad de degradar la matriz extracelular, consecuentemente su capacidad invasiva y metastásica será menor.

El segundo modelo animal utilizado en el presente trabajo han sido ratones atímicos inoculados subcutáneamente con células de adenocarcinoma pancreático humano (de la línea Capan-1), que producen tumores ectópicos. Al inyectar el PCI directamente en los tumores se ha observado una inhibición de su crecimiento que no es dependiente de la dosis, pues la concentración de PCI más elevada provoca una reducción del tamaño del tumor inferior a la producida por las otras dos dosis utilizadas. A dichas dosis, el PCI ha tenido un efecto citostático sobre el crecimiento tumoral, pues en cortes histológicos de los mismos no se ha observado una elevada tasa de apoptosis. Dado que los experimentos *in vitro* han indicado que el PCI actúa como un antagonista del EGF, dicha inhibición del crecimiento tumoral podría ser debida a la unión del PCI a los EGF-Rs de manera que el EGF o TGF- α , presentes en el entorno fisiológico o producidos en forma autocrina, que estimulan el crecimiento del tumor, verían bloqueado su lugar de unión y, por tanto, el efecto estimulador de dichos factores de crecimiento se vería reducido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la utilización de anticuerpos anti-EGF-R para el tratamiento de tumores inducidos en ratones atímicos. En dichos estudios se propone que la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-EGF-R se debe a la interrupción del bucle autocrino-paracrino EGF-R/TGF- α que estimula el desarrollo del tumor (Fan y col., 1993; Schnurch y col., 1994; Tosi y col., 1995). La observación macroscópica de que los tumores tratados con PCI presentan una menor irrigación y consistencia indican que el PCI puede haber afectado al proceso de neovascularización y angiogénesis de los tumores.

El tercer modelo animal con el que se ha trabajado es una línea de ratones transgénicos portadores de una fusión entre secuencias reguladoras del gen de la CAII y las secuencias codificantes del antígeno vírico SV40. En dichos ratones se ha caracterizado la aparición de tumores de plexo coroideo a una edad temprana, 2 meses, y el codesarrollo de insulinomas en un tercio de los mismos a partir de los 3 meses. La vida media de los animales es de 120 días. Se ha estudiado la supervivencia de los ratones inmunizados con PCI, pues ensayos preliminares indicaron que esta parecía ser la mejor vía de administración. La inmunización con PCI alarga la vida media de los ratones de forma significativa, hasta 200 días (un 37%), y se ha

observado que, mientras que en los ratones control siempre se da el codesarrollo de tumores de plexo coroideo y insulinomas, algunos de los ratones tratados con el inhibidor sólo han presentado insulinomas. El efecto del PCI podría ser debido a que enlentece el crecimiento de tumores ya presentes en el animal cuando se inició el tratamiento, produce la remisión de pequeños tumores o retrasa la aparición de tumores. Dado que el PCI se ha administrado a los animales de acuerdo con un protocolo de inmunización, se pueden formular varias hipótesis sobre cual puede haber sido su mecanismo de acción. Por un lado, el propio PCI, tal y como se ha demostrado *in vitro*, puede unirse al EGF-R impidiendo el funcionamiento del bucle autocrino-paracrino con TGF- α /EGF, lo que podría estar favorecido por el hecho de que al inmunizar al animal la liberación del PCI se produce de manera progresiva y, por lo tanto, se evita que el exceso de inhibidor sea eliminado rápidamente por el organismo. Al igual que se ha hipotetizado en el caso de los tumores inducidos en ratones atímicos, además el PCI puede haber contrarrestado el efecto de algún factor angiogénico impidiendo que el tumor creciera rápidamente. Un tercer mecanismo de acción podría venir dado por los anticuerpos contra el PCI producidos por el propio animal. Dichos anticuerpos podrían reconocer alguna molécula muy importante para el crecimiento del tumor y que, por experimentos realizados por el grupo, no es ni el EGF ni el TGF- α . A su vez, dichos anticuerpos podrían provocar una respuesta inmunitaria asociada a células "Killer" contra las células tumorales. En la actualidad el grupo está intentando determinar si los anticuerpos anti PCI reconocen alguna molécula de células derivadas de dichos tumores.

En la última década se ha descrito que algunos inhibidores de proteasas tienen propiedades anticancerígenas (Kennedy, 1994), pero los mecanismos responsables no se conocen con exactitud. En el presente trabajo se ofrece una explicación para la actividad supresora del crecimiento tumoral del PCI, que actúa como un antagonista de un factor de crecimiento. El efecto del PCI sobre el crecimiento tumoral parece, pues, atribuible a su especial topología y no a su actividad inhibitoria de proteasas. Diversos inhibidores de proteasas con propiedades antitumorales tienen el plegamiento de nudo de cisteínas, y nuestro trabajo sugiere que también podrían actuar como antagonista de factores de crecimiento. Recientemente, Gueven et al (1998) han observado que la presencia de BBI (un inhibidor de proteasas de soja que también tiene una estructura de nudo de cisteínas) reduce el nivel de fosforilación del EGF-R en células en cultivo y tiene un efecto protector contra la transformación tumoral inducida por radiación.

Recientemente, se ha descrito un ligando inhibitorio, denominado Argos, para el receptor homólogo al EGF-R en *Drosophila* (Schweitzer, 1995). Dicha proteína presenta similitudes estructurales con los ligandos del EGF-R, y así posee un dominio EGF con un bucle-B de 20 aminoácidos en lugar de 10, y además posee una inusual agrupación de residuos cargados (Figura IV.37.). Con el fin de determinar las regiones de dicha proteína importantes para su mecanismo de inhibición, que permitan el diseño de inhibidores del EGF-R de mamíferos, se están realizando proteínas quiméricas de Argos con el ligando natural del EGF-R de *Drosophila*, denominado Spitz. Hasta el momento, se ha determinado que las regiones de la proteína que flanquean al dominio EGF son importantes para su función, y que dentro del dominio EGF el bucle-B es necesario para la misma, mientras que el bucle-C no (Figura IV.37.). También se han estudiado mutantes del EGF humano obtenidos al sustituir alguno de sus aminoácidos por los correspondientes al Argos, y se observado que se pueden realizar ciertas sustituciones no conservativas en el bucle-B del EGF humano sin afectar a su capacidad para unirse y activar al EGF-R (Van de Poll y col., 1997; Howes y col., 1998). A pesar de estos esfuerzos aún no se ha logrado diseñar un antagonista del EGF humano a partir del Argos.

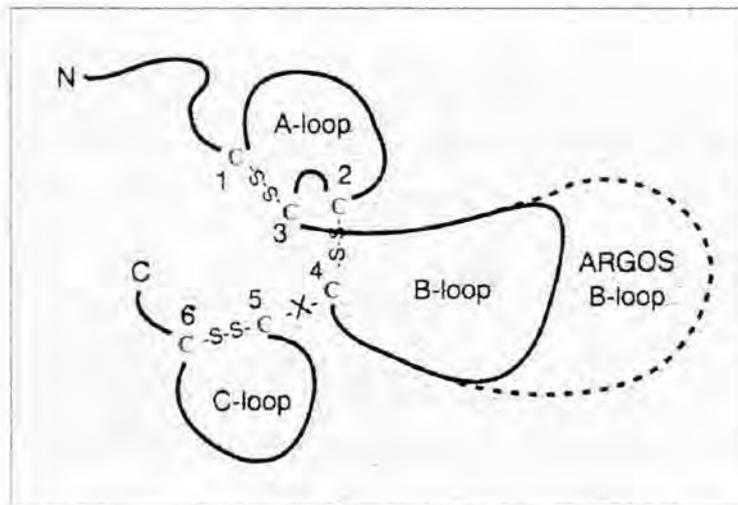


Figura IV.37. : El dominio EGF del Argos comprende 6 cisteínas característicamente distribuidas en el espacio, y que dan lugar a la formación de 3 bucles, como resultado de la distribución de los puentes disulfuro. El bucle entre las cisteínas 3 y 4, bucle B, es más largo en el Argos que en el EGF (Tomado de Wasserman y Freeman, 1997).

Diversas propiedades hacen del PCI un buen candidato a agente terapéutico. En primer lugar, inhibe el desarrollo de tumores de adenocarcinoma pancreático humanos en ratones atímicos sin provocar ningún efecto tóxico aparente, al menos a las dosis utilizadas en este trabajo. Este hecho es de especial interés dado que en la actualidad aún no existen tratamiento efectivos para el cáncer de páncreas. Además, administrado a bajas dosis, el PCI ha aumentado la vida media de ratones transgénicos que desarrollan dos tipos de tumores, de plexo coroideo

e insulinomas, sin tampoco producir efectos tóxicos aparentes. En segundo lugar, el PCI es una proteína pequeña muy resistente a la desnaturalización y degradación proteolítica. En tercer lugar, el PCI ha tenido un efecto inhibitorio del crecimiento a largo plazo en líneas de adenocarcinoma pancreático, que se ha mantenido incluso cuando el PCI se ha eliminado del medio de cultivo. En la actualidad existen otras terapias que también tienen como diana el EGF-R. Por ejemplo, se han producido anticuerpos monoclonales contra el EGF-R humano (Wu y col., 1995; Fan y Mendelsohn, 1998) y se ha descrito la utilización de vectores retroviricos antisentido u oligonucleótidos antisentido, contra el TGF- α o la AR, para inhibir el crecimiento y transformación de diferentes líneas celulares (Normanno y col., 1998). El PCI presenta algunas ventajas frente a estas terapias. Es una molécula fácil de obtener y purificar, con un coste reducido, mientras que los anticuerpos anti-EGF-R tienen un coste elevado que se ve aumentado por la necesidad de humanizarlos para evitar que el organismo produzca anticuerpos que anulen su acción. En el caso de los vectores retroviricos u oligonucleótidos antisentido, el principal problema que se plantea es como lograr su administración sólo en el tejido adecuado, y una vez conseguido lograr que el número de células transfectado sea elevado. Incluso una transfección eficiente no es garantía de una buena expresión, debido al problema del "silenciador" de genes. Es necesario desarrollar promotores más potentes que dirijan la expresión de manera específica al tejido o al tumor. Además, la integración aleatoria del vector de DNA puede provocar la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores (Verman y Somia, 1997).

En resumen, se han descrito las propiedades antitumorales del PCI, una proteína pequeña con tres puentes disulfuro dispuestos en forma de nudo de cisteínas, y se ha demostrado que es el primer análogo antagonista del EGF humano que se describe. El PCI tiene interés tanto teórico como clínico, y abre el camino para el posible modelado de antagonistas del EGF tipo PCI con propiedades mejoradas. El hecho de que la mayoría de carcinomas sobreexpresen el EGF-R hacen del PCI un compuesto líder. En la actualidad están en estudio sus efectos sobre los cánceres más comunes (pulmón, próstata, mama y colon), todos ellos carcinomas, y ya se dispone de resultados esperanzadores respecto al cáncer de mama (M. Sitjà comunicación personal). A su vez, se puede pensar en una terapia combinada, consistente en la administración de PCI unido a agentes quimioterapéuticos (como el cisplatino) (proyecto que se está desarrollando el grupo en colaboración con el grupo de los Drs. A. Llobet y M.A. Martínez del Departamento de Químicas de la UdG), que vehicule la entrada del agente quimioterapéutico en las células cancerosas gracias a la unión del PCI al EGF-R sobreexpresado en el tumor.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El PCI, a concentraciones entre 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, inhibe el crecimiento *in vitro* de varias líneas tumorales pancreáticas humanas y de hámster, con porcentajes de inhibición que oscilan entre el 15 y el 60% y que aparecen a partir de los 8 días de tratamiento. Este efecto inhibitorio no es citotóxico, sino citostático. El inhibidor produce un ligero aumento del porcentaje de células en G_1 y un incremento significativo de la apoptosis.
2. El tratamiento prolongado con PCI, a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, tiene un efecto inhibitorio a largo plazo sobre el crecimiento de líneas tumorales pancreáticas humanas y de ratón. Este efecto se mantiene aunque el inhibidor se retire del medio de cultivo.
3. El PCI es internalizado por las células tumorales estudiadas, y experimenta ciclos de aparición y desaparición del medio de cultivo de una duración entre 3 y 5 h. Dentro de la célula su localización es perinuclear.
4. El tratamiento durante 12 días de células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, con PCI, a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, produce un aumento de 2,9 veces de la expresión del mRNA de la p53 y una inhibición de 7,8 veces de la expresión del mRNA de tripsina.
5. El pretratamiento de células de melanoma de ratón con PCI durante 4 días, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, provoca que al inocularlas en ratones singénicos se desarrollen un número de metástasis inferior al producido por células control.
6. El PCI inhibe el crecimiento *in vivo* de tumores desarrollados en ratones atímicos por inyección subcutánea de células de adenocarcinoma pancreático humano, cuando se inyecta directamente sobre los tumores a concentraciones de 11, 60 y 120 $\mu\text{g/día}$.
7. La línea de ratones transgénicos, iCAITAg-2, obtenida por microinyección de un fragmento de DNA formado por dos secuencias reguladoras de la anhidrasa carbónica II ligadas a la región codificadora para el antígeno T grande de SV40 (TAg), desarrolla tumores de plexo coroideo con una frecuencia del 95% e insulinomas con una frecuencia del 33 %. La vida media de los ratones es de 130 días.
8. El PCI, administrado mediante un tratamiento de inmunización, alarga 80 días la vida media de los ratones transgénicos de la línea iCAITAg-2 (un 37%) y reduce la incidencia de los tumores de plexo coroideo.

9. EL PCI, a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibe la proliferación celular inducida por el EGF, mientras que no tiene ningún efecto sobre la estimulación del crecimiento inducida por la insulina.

10. El PCI compite con el EGF por la unión al EGF-R y dicho receptor tiene una IC_{50} 165 veces inferior a la del EGF.

11. El PCI inhibe los acontecimientos moleculares que se producen durante la activación del EGF-R inducida por el EGF, es decir, la dimerización, actividad quinasa y transfosforilación del EGF-R. También inhibe la actividad quinasa basal del EGF-R, con valores de inhibición entre el 20 y el 40 %.

12. El PCI tiene un esqueleto de puentes disulfuro especial denominado nudo de cisteínas, que está también presente en diversos factores de crecimiento, incluidos el EGF y el TGF- α . El PCI muestra similitudes estructurales con estos dos factores de crecimiento.

12+1. El PCI actúa como un análogo antagonista del EGF, el primero que se describe.

Bibliografia

- Aaronson, S.A. **Growth factors and cancer.** *Science.* 1991; 254: 1146-1153.
- About-Pirak, E.; Hurwitz, E.; Pirak, M.E.; Bellot, F.; Schlessinger, J.; Sela, M. **Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1988; 80: 1605-1611.
- Agarwal, M.L.; Taylor, W.R.; Chernov, M.V.; Chernova, O.B.; Stark, G.R. **The p53 network.** *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1-4.
- Ager, S.P.; Hass, G.M. **Affinity chromatography of pancreatic carboxypeptidases using a carboxipeptidase inhibitor from potatoes as ligand.** *Anal. Biochem.* 1977; 83: 285-295.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. **The cell-division cycle.** In M., Robertson; R., Adams; S.M, Cobert; D., Goertzen (eds), *Molecular biology of the cell* (3rd Edition). New York: Garland Publishing, Inc., 1994: 863-910.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. **Cancer.** In M., Robertson; R., Adams; S.M, Cobert; D., Goertzen (eds), *Molecular biology of the cell* (3rd Edition). New York: Garland Publishing, Inc., 1994: 863-910.
- Almoguera, C.; Shibata, D.; Forrester, K.; Martin, J.; Perucho, M. **Most humans carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes.** *Cell.* 1988; 53: 549-554.
- Alwine, J.C.; Kemp, D.J.; Stark, G.R. **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 5350-5354.
- Anderson, I.C.; Shipp, M.A.; Docherty, A.J.P.; Teicher, B.A. **Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma.** *Cancer Res.* 1996; 56: 715-718.
- Andrén-Sandberg, A.; Bäckman, P.L.; Anderson, R. **Results of adjuvant therapy in resected pancreatic cancer.** *Int. J. Pancr.* 1997; 21: 31-38.
- Ang, L.C.; Taylor, A.R.; Bergin, D.; Kaufmann, J.C.E. **An immunohistochemical study of papillary tumors in the central nervous system.** *Cancer.* 1990; 65: 2712-2719.
- Anzano, M.A.; Roberts, A.B.; Smith, M.J.; Sporn, M.B.; De Larco, J.E. **Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and β transforming growth factors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 6264-6268.
- Asfari, M.; Janjic, D.; Meda, P.; Li, G.; Halban, P.A.; Wollheim, C.B. **Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines.** *Endocrinology.* 1992; 130: 167-178.
- Audisio, R.A.; Veronesi, P.; Maisonneuve, P.; Chiappa, A.; Andreoni, B.; Bombardieri, E.; Geraghty, J.G. **Clinical relevance of serological markers in the detection and follow-up of pancreatic adenocarcinoma.** *Surgical oncology.* 1996; 5: 49-63.

- Baass, P.C.; Di Guglielmo, G.M.; Authier, F.; Posner, B.I.; Bergeron, J.J.M. **Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases.** Trends Cell Biol. 1995; 5: 465-470.
- Barton, C.M.; Staddon, S.L.; Hughes, C.M.; Hall, P.A.; O'Sullivan, C.; Kloppel, G.; Theis, B.; Russell, R.C.; Neoptolemos, J.; Williamson, R.C.; Lane, D.P.; Lemoine, N.R. **Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer.** British J. Cancer. 1991; 64: 1076-1082.
- Basbaum, C.B.; Werb, Z. **Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface.** Current Opinion in Cell Biology. 1996, 8: 731-738.
- Baselga, J., Mendelsohn, J. **Receptor blockade with monoclonal antibodies as anti-cancer therapy.** Pharmac. Ther. 1994; 64: 127-154.
- Basson, M.D.; Modlin, I.M.; Madri, J.A. **Human enterocyte (caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor.** J. Clin. Invest. 1992; 90: 15-23.
- Bates S.; Vousden K.H. **p53 in signalling checkpoint arrest or apoptosis.** Curr. Opin. Genet. Dev. 1996; 6: 12-18.
- Beauchamp, R.D.; Lyons, R.M.; Yang, E.Y.; Coffey, R.J.; Moses, H.L. **Expression of and response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines.** Pancreas. 1990; 5: 369-380.
- Bell, R.H.; Memoli, V.A.; Longnecker, D.S. **Hyperplasia and tumors of the islets of Langerham in mice bearing an elastase I-SV40 T-antigen fusion gene.** Carcinogenesis. 1990; 11: 1393-1398.
- Ben-Bassat, H.; Rosenbaum-Mitrani, S.; Hartzstark, Z.; Shlomain, Z.; Kleinberger-Doron, N.; Gazit, A.; Plowman, G.; Levitzki, R.; Tsvieli, R.; Levitzki, A. **Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase and of Cyclin-dependent Kinase 2 Activation Induce Growth Arrest, Differentiation, and Apoptosis of Human Papilloma virus 16-immortalized Human Keratinocytes.** Cancer Research. 1997; 57: 3741-3750.
- Bergsagel, D.J.; Finegold, M.J.; Butel, J.S.; Kupsy, W.J.; Garcea R.L. **DNA sequences similar to those of simian virus-40 in ependymomas and choroid plexus tumors of the childhood.** N. E. J. Med. 1992; 326: 988-993.
- Berrozpe, G.; Schaeffer, J.; Peinado, M.A.; Real, F.X.; Perucho, M. **Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer.** Int. J. Cancer. 1994; 58: 185-191.
- Bieligk, S.; Jaffe, B.M. **Islet cells tumors of the pancreas.** Surgical clinics of north america. 1995; 75: 1025-1040.

- Billings, P.C.; Morrow, I.R.; Ryan, C.A.; Kennedy, A.C. **Inhibition of radiation-induced transformation of C3H/10T1/2 cells by carboxypeptidase inhibitor I and inhibitor II from potatoes.** *Carcinogenesis*. 1989; *10*: 687-691.
- Bockman, D.E. **Cells of origin of pancreatic cancer: experimental animal tumors related to human pancreas.** *Cancer*. 1981; *47*: 1528-34.
- Bradford, M.M. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 1976; *72*: 248-254.
- Bramhall, S.R. **The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer.** *Int. J. Pancreatol.* 1997; *21*: 1-12.
- Bresser, J.; Gillespie, D. **Quantitative binding of covalently closed circular DNA to nitrocellulose in NaI.** *Anal. Biochem.* 1983, *129*: 357-364.
- Brinster, R.L.; Chen, H.Y.; Messing, A.; van Dyke, T.; Levine, A.J.; Palmiter, R.D. **Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumor.** *Cell*. 1984; *37*: 367-379.
- Caldas, C.; Hahn, S.A.; Da Costa, L.T.; Redston, M.S.; Schutte, M.; Seymor, A.B.; Weinstein, C.L.; Hruban, R.H.; Yeo, C.J.; Kern, S.E. **Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (mts1) gene in pancreatic adenocarcinoma.** *Nature Genet.* 1994; *8*: 27-32.
- Campbell, I.D.; Baron, M.; Cooke R.M.; Dudgeon, T.J.; Fallon, A.; Harvey, T.S.; Tappin, M.J. **Structure function relationship in epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor alpha (TGF- α).** *Biochemical Pharmacology*. 1990; *40*: 35-40.
- Campion, S.R.; Niyogi, S.K. **Interaction of epidermal growth factor with its receptor.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1994; *49*: 355-380.
- Canalis, E.; McCarthy, T.; Centrella, M. **Growth factors and the regulation of bone remodeling.** *J. Clin. Invest.* 1988, *81*: 277-281.
- Canals, F. **Signal transmission by epidermal growth factor receptor: coincidence of activation and dimerization .** *Biochemistry*. 1992; *31*: 4493-4501.
- Cancer Facts & Figures- 1990 . Atlanta, GA: American Cancer Society, Inc. 1990.
- Carlin, C.R.; Knowles, B.B. **Biosynthesis of the epidermal growth factor receptor in human epidermoid carcinoma-derived A431 cells.** *J. Biol. Chem.* 1984; *259*: 7902-7908.
- Carpenter, G.; Cohen, S. **Epidermal growth factor.** *Annu. Rev. Biochem.* 1979, *48*: 193-216.

- Carpenter, G.; Zendejui, J.G. **Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins.** *Exp. Cell. Res.* 1986; *164*: 1-10.
- Casadaban, M.J.; Cohen, S.N. **Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*.** *J. Mol. Biol.* 1980; *138*: 179-207.
- Casey, G.; Yamanaka, Y.; Friess, H.; Kobrin, M.S.; López, M.E.; Büchler, M.; Beger, H.G.; Korc, M. **p53 mutations are common in pancreatic cancer are absent in chronic pancreatitis.** *Cancer Lett.* 1993; *69*: 151-160.
- Cerny, W.L.; Mangold, K.A.; Scarpelli, D.G. **Activation of k-ras in transplantable pancreatic ductal adenocarcinomas of Syrian gold hamsters.** *Carcinogenesis.* 1990; *11*: 2075-2079.
- Chait, B.T.; Kent, S.B. **Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins.** *Science.* 1992; *257*: 1885-1894.
- Chamberlin, S.G.; Sargood, K.J.; Richter A.; Mellor, J.M.; Anderson D.W.; Richards N.G.J.; Turner, D.L.; Sharma, R.P.; Alexander, P.; Davies, D.E. **Constrained peptide analogues of transforming growth factor alpha residues [21-32] are mitogenically active: use of proline mimetics to enhance biological potency.** *J. Biol. Chem.* 1995; *270*: 21062-21067.
- Chen, W-T. **Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumor invasion.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1992; *4*: 802-809.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. **Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal. Biochem.* 1987; *162*: 156-159.
- Clawson, G.A. **Protease inhibitors and carcinogenesis: a review.** *Environmental carcinogenesis.* 1996; *14*: 597-608.
- Cleaver, J.E. **It was a very good year for DNA repair.** *Cell.* 1994; *76*: 1-4.
- Clore, G.M.; Gronenberg, A.M.; Nilges, M.; Rysan, C.A. **Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using Nuclear Magnetic Resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics.** *Biochemistry.* 1987; *26*: 8012-8023.
- Cohen, S. **Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal.** *J. Biol. Chem.* 1962; *237*: 1555-1562.
- Comi, R.J.; Gorden, P.; Doppman, J.L. **Insulinoma.** In J.D., Gardner; M.A., Reber; E., Lebenthal; E.P., DiMagno; G.A., Scheele (eds.). *The pancreas: biology, pathobiology and disease.* (Second Edition). New York: Raven Press Ltd., 1993:979-996.
- Cortés, C.; Saiz, C.; Giménez, F.J.; Sabater, A.; Calatayud, A. **Correlación ecológica de hábitos de consumo en España y mortalidad por cáncer de páncreas.** *Oncología.* 1992; *15*: 190-197.

- Cross, M.; Dexter, T.M. **Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis.** *Cell.* 1991; *64*: 271-280.
- Cubilla, A. L.; Fitzgerald, P. J. **Cancer of the pancreas (nonendocrine): a suggested morphologic classification.** *Semin. Oncol.* 1978; *6*: 285-97.
- Czernichow, P.; Lerebours, E.; Hecketsweiler, Colin, R. **Épidémiologie temporo-spatiale du cancer du pancréas. Étude de mortalité internationale et française.** *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1985; *9*: 767-775.
- Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. **Cell-to-cell signalling: hormones and receptors.** In J. Darnell, H. Lodish, D., Baltimore (eds.), *Molecular cell Biology* (2nd Edition). New York: Scientific American Books, 1990: 709-762.
- Davies, D.E.; Chamberlin, S.G. **Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas.** *Biochemical Pharmacology.* 1996; *51*: 1101-1110.
- Dean, C.; Modjtahedi, H.; Eccles, S.; Box, G.; Styles, J. **Immunotherapy with antibodies to the EGF receptor.** *Int. J. Cancer.* 1994; *85*: 103-107.
- DeClerck, Y.A.; Imren, S. **Protease Inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer.** *European J. Cancer.* 1994. *30A* : 2170-2180.
- Deng, C.; Zhang, P.; Harper, J.W.; Elledge, S.J.; Leder, P. **Mice lacking p21C1P1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control.** *Cell.* 1995; *82*: 675-684.
- Derynck, R.; Goeddel, D.V.; Ullrich, A.; Gutterman, J.U.; Williams, R.D.; Bringman, T.S.; Berger, W.H. **Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors.** *Cancer Res.* 1987; *47*: 707-712.
- Derynck, R. **Transforming growth factor alpha.** *Cell.* 1988; *54*: 593-595.
- Ding, S.F.; Habib, N.A.; Delhanty, J.A.; Bowles, L.; Greco, L.; Wood, C.; Williamson, R.C.; Dooley, J.S. **Loss of heterozygosity on chromosomes 1 and 11 in carcinoma of the pancreas.** *Br. J. Cancer.* 1992; *65*: 809-812.
- Dissin, J.; Mills, L.R.; Main, D.L.; Black, O.; Webster, P.D. **Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats.** *Br. J. Cancer.* 1992; *65*: 809-812.
- Divgi, C.R.; Welt, S.; Kris, M.; Real, F.X.; Yeh, S.D.; Gralla, R.; Merchant, B.; Schweighart, S.; Unger, M.; Larson, S.M. et al. **Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; *83*: 97-104.
- Earp, H.S.; Dawson, T.L.; Xiong, L.; Hong, Y. **Heterodimerization and functional interaccion between EGF receptor family members: a new signalling paradigm with implications for breast cancer research.** *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; *35*: 115-132.

- Ebert, M.; Yokoyama, M.; Kobrin, M.S.; Friess, H.; López, M.E.; Buchler M. W.; Johnson, G.R.; Korc, M. **Induction and expresion of amphiregulin in human pancreatic cancer.** *Cancer Res.* 1994; *54*: 3959-3962.
- Ekbom, A.; McLaughlin, J.K.; Larkssen, M-M.; Karlsson, B.M.; Nyren, O.; Gridley, G.; Adami, H.O.; Fraumeni J.F. **Pancreatitis and pancreatic cancer: a population-based study.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; *86*: 625-627.
- Emllet, D.R.; Moscatello, D.K.; Ludlow, L.B.; Wong, A.J. **Subsets of epidermal growth factor receptors during activation and endocytosis.** *J. Biol. Chem.* 1997; *272*: 8594-8601.
- Estival, A.; Clrec, P.; Nicole, V.; Tam, J.P; Clemente, F. **Decreased expression of transforming growth factor α during differentiation of human pancreatic cancer cells.** *Gastroentorology.* 1992; *103*: 1851-1859.
- Ettinghausen, S.E.; Schwartzenruber, D.J.; Sindelar, W.F. **Evolving strategies for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas.** *J. Clin. Gastroenterol.* 1995; *21*: 48-60.
- Evans, J.D.; Bramhall, S.R.; Carmichael, J.; Daniel, F.; Imrie, C.; Johnson, C.D.; Neoptolemos, J.P.; Stark, A. **A phase II trial of marimastat (BB-2516) in advanced pancreatic cancer (abstract).** *Ann. Oncol.* 1996; *7*: 51.
- Evans, J.D.; Ghanch, P.; Kawesha, A.; Neoptolemos, J.P. **Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer.** *Digestion.* 1997; *58*: 520-528.
- Everitt, M.T.; Neurath, M. **Rat peritoneal mast cell carboxipeptidase: localization, purification and enzymatic propertiers.** *FEBS Lett.* 1980; *110*: 292-296.
- Fan, Z.; Baselga, J.; Masui, H.; Mendelsohn, J. **Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well stablished A431 cell xenografts.** *Cancer Res.* 1993; *53*: 4637-2642.
- Fan, Z.; Mendelsohn, J. **Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies.** *Current Opin. Oncol.* 1998; *10*: 67-73.
- Fanning, E.; Knippers, R. **Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen.** *Annu. Rev. Biochem.* 1992; *61*: 55-85.
- Feinberg, A.P; Vogelstein, B. **A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment to specific activity.** *Anal. Biochem.* 1983; *123*: 6-13.
- Fernández, E.; Fallon, M.; Frazier, M.; de Llorens, R.; Cuchillo, C.M. **Expression of acinar and ductal products in Capan-1 cells growing in synthetic serum and serum-free media.** *Cancer.* 1994; *73*: 2285-2295.
- Fernández, E. **Caracterización de ribonucleasas expresadas por células de adenocarcinoma pancreático humnao.** Tesis Doctoral. Universitat de Girona. Girona, 1994.

- Fidler, I.J.; Nicolson, G.L. **Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor cells.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1976; 57: 1119-1202.
- Fish, E. N.; Ghislain, J.; Trogadis, J.; Stevens, J. K. **Inhibitory effects of α -interferon on epidermal growth factor-mediated receptor-dependent event.** *Cancer Res.* 1993; 53: 5148-5157.
- Fogh, G.; Wright, W. C.; Loveless, J. O. **Absence of HeLa cell contaminants in 169 cell lines derived from human tumors.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; 58: 209-14.
- Fogh, J.; Fogh, J.M.; Orfeo, T. **One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumor cell lines producing tumors in nude mice.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; 59: 221-226.
- Folkman, J. **Clinical applications of research on angiogenesis.** *New England J. Med.* 1995; 333: 1757-1763.
- Frazier, M.L.; Mars, W.; Florine, D.; Montagna, R.; Saunders, G. **Efficient extraction of RNA from mammalian tissue.** *Mol. Cell Biochem.* 1983; 56: 113-122.
- Frazier, M.L.; Pathak, S.; Wang, Z.W.; Cleary, K.; Singletary, S.E.; Olivé, M.; Mackay, B.; Steck, P.A.; Levin, B. **Establishment of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line, MDA Panc-3.** *Pancreas.* 1990; 5: 8-16.
- Frazier, M.L.; Longnecker, D.S. **Cell lines of the human and rodent exocrine pancreas.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E. P. DiMagno, and G. A. Scheele (eds), *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (Second Edition)*. New York: Raven Press Ltd., 1993: 565-74.
- Frazier, M.L.; Fernández, E. **Gene expression in the developing pancreas and pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Bulletin.* 1994; 46: 485-491.
- French, A.R.; Tadaki, D.K.; Niyogi, S.K.; Lauffenburger, D.A. **Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by pH sensitivity of the receptor/ligand interaction.** *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 4334-4340.
- Friess, H.; Yamanaha, Y.; Büchner, M.W.; Ebert, M.; Beger, H.G.; Gold, L.I.; Korc, M. **Enhanced expression of transforming growth factor-beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival.** *Gastroenterology.* 1993a; 105: 1846-1856.
- Friess, H.; Yamanaha, Y.; Büchner, M.W.; Beger, H.G.; Kobrin, M.S.; Baldwin, R.L.; Korc, M. **Enhanced expression of the type II transforming growth factor-beta receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression.** *Cancer Res.* 1993b; 53: 2704-2707.
- Friess, H.; Yamanaka, H.; Bucher, M.; Kobrin, M.S.; Tahara, E.; Korc, M. **Cripto, a member of the epidermal growth-factor family, is over-expressed in human pancreatic cancer and chronic pancreatitis.** *Int. J. Cancer.* 1994; 56: 668-674.

- Friess, H.; Yamanaka, H.; Korbin, M.S.; Do, D.A.; Bucher, M.; Korc, M. **Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumour progression.** *Clinical Cancer Res.* 1995; *1*: 1413-1420.
- Friess, H.; Berberat, P.; Schilling, M.; Kunk, J.; Korc, M.; Büchler, M.W. **Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors.** *J. Mol. Med.* 1996; *74*: 35-42.
- Friess, H.; Kleeff, J.; Gumbs, A.; Büchler, M.W. **Molecular versus conventional markers in pancreatic cancer.** *Digestion.* 1997a; *58*: 557-563.
- Friess, H.; Gassmann, M.; Büchler, M.W. **Adjuvant therapy of pancreatic cancer using monoclonal antibodies and immune response modifiers.** *Int. J. Pancreatol.* 1997b; *21*: 43-52.
- Fritz, H.; Schmidt, I.; Turk, V. **Proteinase inhibitors and biological control.** *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371. 1990; supplement issue.
- Fry, D.W.; Kraker, A.J.; McMichael, A.; Ambroso, L.A.; Nelson, J.M.; Leopold, W.R.; Conors, R.W.; Bridges, A. **A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor kinase.** *Science*, 1994; *265*: 1093-1095.
- Fu, X.; Guadagni, F.; Hoffman, R. **A metastasis nude mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; *89*: 5645-5649.
- Fujii, H.; Egami, H.; Chaney, W.; Pour, P.; Pelling, P. **Pancreatic ductal adenocarcinomas induced in Syrian hamsters by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine contain a c-k-ras oncogene with a point mutated codon 12.** *Mol. Carcinogenesis.* 1990; *3*: 296-301.
- Gazdar, A.F.; Chick, W.L.; Oie, H.K.; Sims, H.L.; King, D.L.; Weir, G.C.; Lauris, V. **Continuous, clonal, insulin-and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; *77*: 3519-3523.
- Gee, P.; Harker Rhodes, C.; Fricker, L.D.; Angeletti, R.H. **Expression of neuropeptide processing enzymes and neurosecretory proteins in ependyma and choroid epithelium.** *Brain Research.* 1993; *617*: 238-248.
- Ghrayeb, J.; Kimura, H.; Takahara, M.; Hsiang, H.; Masui, Y.; Inouye, M. **Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*.** *EMBO J.* 1984; *3*: 2437-2442.
- Giard, D.J.; Aaronson S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H.; Parks, W.P. **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *J.Natl.Cancer Inst.* 1973; *51*: 1417-1423.
- Gillespie, J.; Dye, J.F.; Schachter, M.; Guillou, P.J. **Inhibition of pancreatic cancer cell growth *in vitro* by the tyrphostin group of tyrosine kinase inhibitors.** *Br. J. Cancer.* 1993; *68*: 1122-1126.

- Githens, S. **The pancreatic duct cells: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture.** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1988; 7: 486-506.
- Gold, E.B. **Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer.** *Surgical clinics of north america.* 1995; 75: 819-843.
- Gordis, L.; Gold, E. **Epidemiology and etiology of pancreatic cancer.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E. P. DiMagno, and G. A. Scheele (eds), *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (Second Edition)*. New York: Raven Press Ltd., 1993:837-55.
- Gordon, J.W.; Ruddle, F.H. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.** *Science.* 1981; 214: 1244-1246.
- Graham, J.S.; Ryan, C.A. **Accumulation of a metallo-carboxipeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1981; 101: 1164-1170.
- Grant, C.S. **Insulinoma.** *Baillière's Clinical Gastroenterology.* 1996; 10: 645-671.
- Graus-Porta, D.; Beerli, R.; Daly, J.; Hynes, N.E. **ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling.** *EMBO J.* 1997; 16: 1647-1655.
- Gray, A.; Dull, T.J.; Ullrich, A. **Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor.** *Nature.* 1983; 202: 722-725.
- Gregory, H. **Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor.** *Nature.* 1975; 257: 325-327.
- Greenwald, R.A. **Guidlines for clinical trial design for evaluation of MMP inhibitors.** *Ann NY Acad Sci.* 1994; 732: 273-279.
- Gress, T.M.; Müller-Pillasch, F.; Lerch, M.M.; Friess, H.; Büchler, M.; Adler, G. **Expression and *in-situ* localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer.** *Int. J. Cancer.* 1995; 62: 407-413.
- Groenen, L.C.; Nice, E.; Burgess, A.W. **Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens.** *Growth Factors.* 1994; 11: 235-237.
- Gueven, N.; Dittmann, K.; Rodemann, H.P. **Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced activation of the EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity.** *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 73: 157-162.
- Gulli, L.F.; Palmer, K.C.; Chen, Y.Q.; Reddy, K.B. **Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity.** *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 173-178.
- Gullick, W.J. **The c-erbB3/HER3 receptor in human cancer.** *Cancer Surveys.* 1996; 27: 339-349.

- Güssow, D.; Rein, R.; Ginjaar, I.; Hochstenbach, F.; Seemann, G.; Kottman, A.; Ploegh, H. **The human β_2 -microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit.** *J. Immunol.* 1987; *139*: 3132-3138.
- Hall, P.A.; Hugues, C.M.; Staddon, S.L.; Richman, P.I.; Gullick, W.J.; Lemoine, N.R. **Abnormalities for the *c-erbB-2* oncogene in human pancreatic cancer.** *J. Pathol.* 1990; *161*: 195-200.
- Hall, P.A.; Ray, A.; Lemoine, N.R.; Midgley, C.A.; Krausz, T.; Lane D.P. **p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology.** *Lancet.* 1991; *338*: 513.
- Hall, P.A.; Lemoine, N.R. **Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas.** *J. Pathol.* 1992. *166*: 97-103.
- Hall, P.A.; Lemoine, N.R. **Models of pancreatic cancer.** *Cancer Surveys.* 1993; *16*: 135-155.
- Hanahan, D. **Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes.** *Nature.* 1985; *315*: 115-122.
- Harlow, E.D.; Williamson, N.M.; Ralston, R.; Helfam, D.M.; Adams, T. **Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumour antigen p53.** *Mol. Cell. Biol.* 1985; *5*: 1601-1610.
- Hass, G.M.; Derr, J.E.; Makus, D.J.; Ryan, C.A. **Purification and characterization of the carboxypeptidase iso inhibitors from potatoes.** *Plant Physiol.* 1979. *64*: 1022-1028.
- Hass, G.M.; Ryan, C.A. **Carboxypeptidase inhibitor from potatoes.** *Meth. Enzymol.* 1981; *80*: 778-791.
- Hewlet, G. **Apropos aprotin: A review.** *Biotechnology.* 1990. June: 565-568.
- Hocman, G. **Chemoprevention of cancer: protease inhibitors.** *Int. J. Biochem.* 1992; *9*: 1365-1375.
- Hoffman, D.; Schmetz, I.; Hecht, S.S.; Wynder, E.L. **Chemical studies on tobacco smoke. XXXIX. On the identification of carcinogens, promoters and carcinogens.** In: *Proceedings, 3rd World Conference on Smoking and Health. I? Modifying the risk for the smoker.* Washington: U.S. Dept. of Health, Education and Welfare. 1976; 125.
- Hogan, B.; Constantini, F.; Lacy, E. **Introduction of new genetic information in: Manipulating the mouse embryo.** A laboratory manual. 1986. pp151-204.
- Hollander-Czytko, H.; Andersen, J.K.; Ryan, C.A. **Vacuolar localization of wound-induced carboxypeptidase inhibitor in potato leaves.** *Plant Physiol.* 1985; *78*: 76-79.
- Hollingsworth, R.E.J.; Hensey, C.E.; Lee, W.-H. **Retinoblastoma protein and the cell cycle.** *Curr. Opin. Genet. Devel.* 1993; *3*: 55-62.

- Howe, J.R.; Conlon, K.C. **The molecular genetics of pancreatic cancer.** *Surg. Oncol.* 1997; 6: 1-18.
- Howes, R.; Wasserman, J.D.; Freeman, M. **In vivo analysis of Argos structure-function. Sequence requirements for inhibition of the Drosophila epidermal growth factor receptor.** *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 4275-4281.
- Huang, L.; Goodrow, T.L.; Zhang, S.; Klein-Szanto, A.J.P.; Chang, H.; Ruggeri, B.A. **Deletion and mutation analyses of the P16/MTS-1 tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas.** *Cancer Res.* 1996; 56: 1137-1141.
- Hynes, N.E.; Stern, D.F. **The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1198: 165-184.
- Isaacs, N.W. **Cystine knots.** *Curr. Biol.* 1995; 5: 391-395.
- Janisch, W.; Schrieber, D. In D.D., Bigner, J.A., Swenberg (eds) **Experimental tumors of the central nervous system.** Kalamazoo, Michigan: Upjohn Company. 1977; 36.
- Jessop, N.W.; Jay, R.J. **Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors.** *In vitro.* 1980; 16: 212.
- Jhappan, C.; Stahle, C.; Harkins, R.N.; Fausto, N.; Smith, G.H.; Merlino, G.T. **TGF α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas.** *Cell.* 1990; 61: 1137-1146.
- Johansson, B.; Mandahl, N.; Heim, S.; Mertens, F.; Andrén-Sandberg, A.; Mitelam, F. **Chromosome abnormalities in pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 1989; 37: 209-213.
- Jonhson, M.D.; Kim, H.R.; Chesler, L.; Tsao, W.G.; Bouck, N.; Polverini P.J. **Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase.** *J. Cell Physiol.* 1994, 160: 194-202.
- Kalthoff, H.; Schmiegel, W.; Roeder, C.; Kasche, D.; Schmidt, A.; Lauer, G.; Thiele, H.G.; Honold, G.; Pantel, K.; Riethmuller, G.; Scherer, E.; Maurer, J.; Maacke, H.; Deppert, W. **p53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions.** *Oncogene.* 1993; 8: 289-298.
- Kennedy, A.R. **Anticarcinogenic activity of protease inhibitors.** In W. Troll, A.R. Kennedy (eds), *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents.* New York: Plenum Press, 1993: 9-63.
- Kennedy, A.R. **Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors.** *Cancer Res.* 1994; 54: 1999s-2005s.

- Kern, H.F.; Warshaw, A.; Scheele, G. **Fine structure of protein precipitation in acinar luminae in the normal human pancreas and in pancreatitis.** In: Gyr, K.; Singer, M.; Sarles, H. eds. *Pancreatitis: concepts and classification.* Amsterdam: Elsevier Biomedical Press; 1984.
- Kern, H.F.; Elsässer, H.P. **Fine Structure of Human Pancreatic Adenocarcinoma.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E.P. DiMagno, and G.A. Scheele (eds), *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (Second Edition).* New York: Raven Press Ltd., 1993: 857-69.
- Khazaie, K.; Schirrmacher, V.; Lichtner, R.B. **EGF receptor in neoplasia and metastasis.** *Cancer Met. Rev.* 1993; 12: 255-274.
- Kim, S.J.-H.; Ho, S.B.; Montgomery, C.K.; Kim, Y.S. **Cell lineage markers in human pancreatic cancer.** *Cancer* 1990; 66: 2134-2143.
- Kirk, J.; Carmichael, J.; Stratford, I.J.; Harris, A.L. **Selective toxicity of TGF- α -PE40 to EGFR-positive cell lines: selective protection of low EGFR-expressing cell lines by EGF.** *Br. J. Cancer.* 1994; 69: 988-994.
- Kleiner, D.E.; Stetler-Stevenson, W.G. **Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5: 891-897.
- Klöppel, G.; Fitzgerald, P.J. **Pathology of nonendocrine pancreatic tumors.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, F.P. Brooks, E. Lebenthal, E.P. DiMagno, and G.A. Scheele (eds). *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology and Diseases.* New York: Raven Press. 1986; 649-647.
- Klöppel, G. **Pathology of Nonendocrine Pancreatic Tumors.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E.P. DiMagno, and G.A. Scheele (eds), *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (Second Edition).* New York: Raven Press Ltd., 1993: 871-98.
- Klöppel, G.; Schröder, S.; Heitz, P.U. **Histopathology and Immunopathology of Pancreatic Endocrine Tumors.** In: Mignon, M.; Jensen, R.T. (eds), *Endocrine tumors of the pancreas.* *Front Gastrointestinal Res.* Basel, Karger, 1995; 23: 99-120.
- Knudson, A.G. **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 820-823.
- Knudson, A.G. **Antioncogenes and human cancer.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 10914-10921.
- Koivunen, E.; Ristimäki, A.; Itkonen, O.; Osman, S.; Vuento, M.; Stenman, U.H. **Tumor-associated trypsin participates in cancer cell mediated degradation of extracellular matrix.** *Cancer Res.* 1991; 51: 2107-2112.
- Kobrin, M.S.; Funatomi, H.; Friess, H.; Buchler, M.W.; Stathis, P.; Korc, M. **Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer.** *Int. J. Oncol.* 1994; 6: 625-631.

- Korc, M.; Magun, B.E. **Recycling of epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma cell line.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 6172-6175.
- Korc, M.; Meltzer, P.; Trent, J. **Enhanced expression of epidermal growth factor receptor correlates with alterations of chromosome 7 in human pancreatic cancer.** Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83: 5141-4.
- Korc, M.; Finman, J.E. **Attenuated processing of epidermal growth factor in the face of marked degradation of transforming growth factor alpha.** J. Biol. Chem. 1989; 264: 14990-14999.
- Korc, M.; Chancrasekar, B.; Yamanaka, Y.; Friess, H.; Buchler, M.; Beger, G.G. **Overexpression of the epidermal growth-factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth-factor and transforming growth-factor-alpha.** J. Clin. Invest. 1992; 90: 1352-1360.
- Korc, M. **Role of growth factors in pancreatic cancer.** Surg. Oncol. Clin. N. Am. 1998; 7: 25-41.
- Kyriazis, A.P.; Kyriazis, A.A.; Scarpelli, D.G.; Fogh, J.; Rao, M.S.; Lepera, R. **Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse.** Am. J. Pathol. 1982; 106: 250-260.
- Laemmli, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4.** Nature. 1970; 227: 680-685.
- Laskowski, M.; Kato, I. **Protein inhibitors of proteinases.** Ann. Rev. Biochem. 1980; 49: 593-626.
- Laurence, D.J.R.; Gusterson, B.A. **The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in normal and in cancer cells.** Tumor Biology. 1990; 11: 229-261.
- Lednický, L.A.; Garcea, R.L.; Bergsagel, D.J.; Butel, J.S. **Natural simian virus strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors.** Virology. 1995; 212: 710-717.
- Lee, D.C., Luetkeke, N.C. and Petch, L.A. **Transforming growth factor- α and role in neoplastic progression.** Cancer Treat. Res. 1992; 63: 233-254.
- Leger, R.J.; Bidochka, M.J.; Roberts, D.W. **Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Arch. Biochem. Biophys. 1994; 314: 392-398.
- Lei, S.; Appert, H.E.; Nakata, B.; Domenico, D.R.; Kim, K.; Howard, J.M. **Overexpression of HER-2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival.** Int. J. Pancreatol. 1995; 17: 15-21.

- Lemmon, M.A.; Bu, Z.; Ladbury, J.E.; Zhou, M.; Pinchasi, D.; Lax, I.; Engelman, D.M.; Schlessinger, J. **Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGF dimer.** *EMBO J.* 1997; *16*: 281-294.
- Lemoine, N.R.; Lobresco, M.; Leung, H.; Barton, C.; Hugues, C.M.; Pringent, S.A.; Gullick, W.J.; Klöppel, G. **The erbB-3 gene in human pancreatic cancer.** *J. Pathol.* 1992a; *168*: 269-273.
- Lemoine, N.R.; Jain, S.; Hugues, C.M.; Staddon, S.L.; Maillet, B.; Hall, P.A.; Klöppel, G. **Ki-ras oncogene activation in pre-invasive pancreatic neoplasia.** *Gastroenterology.* 1992b; *102*: 230-236.
- Lemoine, N.R.; Hugues, C.M.; Barton, C.; Poulson, R.; Jeffery, R.E.; Klöppel, G.; Hall, P.A.; Gullick, W.J. **The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer.** *J. Pathol.* 1992c; *166*: 7-12.
- Lemoine, N.R.; Pignatelli, M. **Type-I growth factor receptors in pancreatic and gastrointestinal neoplasia.** *European J. Gastroenterology and Hepatology.* 1995; *7*: 939-944.
- Lemoine, N.R. **Molecular advances in pancreatic cancer.** *Digestion.* 1997; *58*: 550-556.
- Leung, H.Y.; Gullick, W.J.; Lemoine, N.R. **Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer.** *Int. J. Cancer.* 1994; *59*: 667-675.
- Levin, V.A.; Gutin, P.H.; Leibel, S. **Choroid plexus papilloma and carcinoma.** In DeVita, V.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A (eds). *Cancer. Principles and practice of oncology.*(4 Ed).1993; 1728-1729.
- Levitcki, A. **Targeting signal transduction for disease therapy.** *Curr. Op. Cell Biol.* 1996; *8*: 239-244.
- Lieber, M.; Mazzetta, J.; Nelson-Rees, W.; Kaplan, M.; Todaro, G. **Establishment of a continuous cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.** *Int. J. Cancer.* 1975; *15*: 741-747.
- Liebow, C.; Kierowski, M.; DuSapin, K. **Hormonal control of pancreatic cancer growth.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; *86*: 2003-2007.
- Ling, S. L.; Nussinov, R. **A disulphide-reinforced structural scaffold shared by small proteins with diverse functions.** *Nature Struct. Biol.* 1995; *2*: 835-837.
- Link, K-H.; Gansauge, F.; Pillasch, J.; Berger, H-G. **Multimodal therapies in ductal pancreatic cancer.** *Int. J. Pancreat.* 1997; *21*: 71-83.
- Liotta, L.A.; Steeg, P.S.; Stetler-Stevenson, W.G. **Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.** *Cell.* 1991; *64*: 327-336.

- Liu, Q.; Yan, Y.X.; McClure, M.; Nakagawa, H.; Jufimura, F.; Rustgi, A.K. **Mts-1 (cdkn2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophageous squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines.** *Oncogene*. 1995; *10*: 619-622.
- Löhr, M.; Trautmann, B. **Pancreatic Cancer: Stromal-Epithelial Interactions.** *Int. J. Pancreatology*. 1993; *14*: 57-58.
- Löhr, M.; Trautmann, B.; Göttler, M.; Peters, S.; Zauner, I.; Maillet, B.; Klöppel, G. **Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins.** *Br. J. Cancer*. 1994; *69*: 144-151.
- Longnecker, D.S.; Curphey, T.J. **Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats.** *Cancer Res*. 1975; *35*: 2249-2258.
- Longnecker, D.S.; Wiebikin, N.M.; Schaeffer, B.K.; Roebuck, B.D. **Experimental carcinogenesis in the pancreas.** *Int. Rev. Experim. Pathol.* 1984; *26*: 177-229.
- Longnecker, D.S.; Memoli, V.; Pettengill, O.S. **Recent results in animal models of pancreatic carcinoma: Histogenesis of tumors.** *The Yale J. Biol. Med.* 1992; *65*: 457-464.
- Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P.; Cavallini, G.; Ammann, R.W.; Lankisch, P.G.; Andersen, J.R.; Dimagno, E.P.; Andrén-Sandberg, A.; Domellof, L. **Pancreatitis and the risk of cancer of pancreatic cancer.** *N. Engl. J. Med.* 1993; *328*: 1433-1437.
- Luetkeke, N.C.; Qiu, T.H.; Peiffer R.L.; Oliver, P.; Smithies, O.; Lee, D.C. **TGF α deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice.** *Cell*. 1993; *73*: 263-278.
- Macualay, V.; O'Byrne, K.; Saunders, M.; Salisbury, A.; Long, L.; Gleerson, F.; Gareson, T.S.; Harris, A.L.; Talbot, D.C. **A phase I study of the matrix metalloproteinase inhibitor batismatat (BB-94) in patients with pleural effusions (abstract).** *Br. J. Cancer*. 1995; *75*: 11.
- Magdelénat, H. **Tumor markers in oncology: past, present and future.** *J. Imm. Methods*. 1992; *150*: 133-143.
- Maillet, B.; De Grève, J.; Lemoine, N.; Kalthoff, H.; Schmiegel, W.; Klöppel, G. **Phenotypical differentiation and genetic alterations in human pancreatic carcinoma cell lines.** *Int. J. Pancreatol.* 1993; *14*: 72-75.
- Mann, G.B.; Fowler, K.J.; Gabriel, A.; Nice, E.C.; Williams, R.L.; Dunn, A.R. **Mice with a null mutation of TGF α gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation.** *Cell*. 1993; *73*: 249-261.
- Marks, J.R.; Lin, J.; Hinds, P.; Miller, D.; Levine, A.J. **Cellular gene expression in papillomas of the choroid plexus from transgenic mice that express the simian virus 40 large T antigen.** *J Virol*. 1989; *63*: 790-797.

- Marino, C. **Producción mediante fermentación del rePCI y análisis por mutagénesis dirigida del papel del residuo Val 38.** Máster de Licenciatura. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, 1993.
- Marino, C.; Molina, M.A.; Canals, F.; Avilés, X.A.; Querol, E. **Overproduction of a recombinant carboxypeptidase inhibitor by optimization of fermentation conditions.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; *41*: 632-637.
- Marquardt, H.; Todaro, G.J. **Human transforming growth factor: production by a melanoma cell line, purification, and characterization.** *J. Biol. Chem.* 1982; *257*: 5220-5225.
- Marquardt, H.; Hunkapiller, M.W.; Hood, L.E.; Twardzik, D.R.; De Larco, J.E. **Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: Amino acid sequence homology with epidermal growth factor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; *80*: 4684-4688.
- Martini, F.; Iachheri, L.; Lazzarin, L.; Carinci, P.; Corallini, A.; Gerosa, M.; Iuzzolino, P.; Barbanti-Brodano, G.; Tognon, M. **SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals.** *Cancer Res.* 1996; *56*: 4820-4825.
- Mas, J.M.; Aloy, P.; Blanco-Aparicio, C.; Molina, M.A.; Llorens, R.; Querol, E.; Avilés, X. **Disulphide-bridge topology as a tool for characterising protein structure/function relationships.** Enviado al *J. Mol. Biol.* 1998.
- Massagué, J. **Transforming growth factor- α - A model for membrane-anchored growth factors.** *J. Biol. Chem.* 1990; *265*: 21393-21396.
- Mastrangelo, A.J.; Betenbaugh, M.J. **Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems.** *TIBTECH.* 1998; *16*: 88-95.
- Masui, H.; Castro, L.; Mendelsohn, J. **Consumption of EGF by A431 cells: evidence for receptor recycling.** *J. Cell Biol.* 1993; *120*: 85-93.
- McDonald, R.J.; Stary, S.J.; Switt, G.H. **Two similar but nonallelic rat pancreatic trypsinogens.** *J. Biol. Chem.* 1982; *257*: 9724-9732.
- McDonald, N.Q.; Hendrickson, W.A. **A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.** *Cell.* 1993; *73*: 421-424.
- Messing, A.; Chen, H.Y.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. **Peripheral neuropathies, hepatocellular carcinomas and islet cell adenomas in transgenic mice.** *Nature.* 1985; *316*: 461-463.
- Messing, A.; Pinkert, C. A.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L. **Development study of SV40 large T antigen expression in transgenic mice with choroid plexus neoplasia.** *Oncogene Res.* 1988; *3*: 87-97.

- Mignatti, P.; Rifkin, D.B. **Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion. Physiological Reviews.** 1993; 73: 161-195.
- Miszczuk-Jamska, B.; Merten, M.; Guy-Crotte, O.; Amouric, M.; Clemente, F.; Schoumacher, R.A.; Figarella, C. **Characterization of trypsinogens 1 and 2 in two human pancreatic adenocarcinoma cell lines; CFPAC-1 and Capan-1.** FEBS Lett. 1991; 294: 175-178.
- Miyazaki, J.; Araki, K.; Yamato, E.; Ikegami, H.; Asano, T.; Shibasaki, Y.; Oka, Y.; Yamamura, K. **Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms.** Endocrinology. 1990; 127: 126-132.
- Modjtahedi, H.; Eccles, S.A.; Box, G.; Styles, J.; Dean, C.J. **Antitumor activity of combinations of antibodies directed against different epitopes on the extracellular domain of the human EGF receptor.** Cell Biophys. 1993; 22: 129-146.
- Molina, M.A.; Avilés, F.X.; Querol, E. **Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector.** Gene. 1992; 116: 129-138.
- Molina, M.A. **Análisis por ingeniería genética de proteínas de la relación estructura-función del PCI.** Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, 1993.
- Molina, M.A.; Marino, C.; Oliva, B.; Avilés, F.X.; Querol, E. **C-tail valine is a key residue for stabilization of complex between potato inhibitor and carboxypeptidase A.** J. Biol. Chem. 1994; 269: 21467-21472.
- Moore, M. **Activity of gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma.** Cancer Supplement. 1996; 78: 633-638.
- Morelli, D.; Sardini, A.; Villa, E.; Villa M.L.; Menard, S.; Colnaghi, M.I.; Balsari, A. **Modulation of drug induced cytotoxicity by a bispecific monoclonal antibody that recognizes the epidermal growth factor receptor and doxorubicin.** Cancer Immunol. Immunother. 1994; 38: 171-177.
- Moyer, J.D.; Barbacci, E.G.; Iwata, K.K.; Arnold, L.; Boman, B.; Cunningham, A.; DiOrio, C.; Doty, J.; Morin, M.J.; Moyer, M.P.; Neveu, M.; Pollack, V.A.; Pustilnik, L.R.; Reynolds, M.M.; Sloan, D.; Theleman, A.; Miller, P. **Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, and inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.** Cancer Res. 1997; 57: 4838-4848.
- Muller, W.J.; Arteaga, C.L.; Muthuswamy, S.K.; Siegel, P.M.; Webster, M.A.; Cardiff, R.D.; Meise, K.S.; Li, F.; Halter, S.A.; Coffey, R.J. **Synergistic interaction of the Neu proto-oncogen product and transforming growth factor alpha in the mammary epithelium of transgenic mice.** Mol. Cell Biol. 1996; 16: 5726-5736.
- Murakami, A.S.; Strobel, M.C.; Vande Woude, G.F. **Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs.** In J., Mendelsohn, P.M., Howley, M.A., Israel, Liotta, L.A. (eds), The molecular basis of cancer. Philadelphia: Saunders Company; 1995: 3-17.

- Murphy, D.; Bishop, A.; Rindi, G.; Murphy, M.N.; Stamp, G.W.H.; Hanson, J.; Polak, J.M.; Hogan, B. **Mice transgenic for vasopressin-SV40 hybrid oncogene develop tumors of the endocrine pancreas and the anterior pituitary.** *Am. J. Pathol.* 1987; *129*: 552-566.
- Nelson, J.; Stewart, R.; McGivern, M.; Bailie, J.R.; Walker, B.; Murphy, R.F.; Wilson, D.J. **Synthetic murine epidermal growth factor sequence 20-31 is mitogenic and angiogenic.** *Carcinogenesis.* 1991; *12*: 1823-1829.
- Newbould, M. J.; Kelsey, A. M.; Arango, J. C.; Ironside, J. W.; Birch, J. **The choroid plexus carcinomas of childhood: histopathology, immunocytochemistry and clinicopathological correlations.** *Histopathology.* 1995; *26*: 137-143.
- Nitecki, S.S.; Sarr, M.G.; Colby, T.V.; Heerden, J.A. **Long-term survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. Is it really improving?.** *Ann Surg.* 1995; *221*: 59-66.
- Normanno, N.; Luca, A.D.; Salomon, D.S.; Ciardiello, F. **Epidermal growth factor-related peptides as targets for experimental therapy of human colon carcinoma.** *Cancer Detect. Prev.* 1998; *22*: 62-67.
- Norton, J.A. **Neuroendocrine tumors of the pancreas and duodenum.** *Curr. Probl. Surg.* 1994; *31*: 77-158.
- Norusis, M.J. **Life Tables.** SPSS for Windows advanced statistics Release 6.0. SPSS Inc Chicago. 1993: 247-274.
- Oikawa, T.; Hitomi, J.; Kono, A.; Kaneko, E.; Yamagachi, K. **Frequent expression of genes for receptor tyrosine kinases and their ligands in human pancreatic cancer cells.** *Int. J. Pancreatol.* 1995; *18*: 15-23.
- Okamura, K.; Morimoto, A.; Hamanaka, R.; Ono, M.; Kohno, K.; Uchida, Y.; Kuwano, M. **A model system for tumor angiogenesis: involvement of transforming growth factor- α in tube formation of human microvascular endothelial cells induced by edophageal cancer cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; *186*: 1471-1479.
- Oliva, B.; Wastlund, M.; Nilsson, O.; Cardenas, R.; Querol, E.; Avilés, F.X.; Tapia, O. **Stability and fluctuations of the potato carboxypeptidase A protein inhibitor fold. A molecular dynamics study.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; *176*: 616-621.
- Oliva, B.; Wastlund, M.; Nilsson, O.; Cardenas, R.; Querol, E.; Avilés, F.X.; Tapia, O. **A molecular dynamics study of a model built pro36gly mutant derived from potato carboxipeptidase A inhibitor protein.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; *176*: 627-632.
- Oliva, B. **La dinámica molecular como herramienta para el diseño de mutantes en ingeniería de proteínas: Estudio comparativo de la simulación de un inhibidor de carboxipeptidasa y del mutante Pro36-Gly.** Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, 1992.

- Ormerod, M.G.; Kubbies, M. **Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and hoechst-propidium iodide stain.** Cytometry. 1992; *13*: 678-685.
- Ornitz, D.M.; Hammer, R.E.; Messing, A.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. **Pancreatic neoplasm induced by SV40 T antigen expression in acinar cells of transgenic mice.** Science. 1987; *238*: 1201-1207.
- Orr, G.L.; Strickland, J.A.; Walsh, T.A. **Inhibition of *Diatrofica larval* growth by a multicystatin from potato tubers.** J. Insect Physiol. 1994; *40*: 893-900.
- Oustry, P.; Estival, A.; Pradayrol, L.; Vaysse, N.; Clémente, F. **Two subclasses of EGF receptors in the human pancreatic cell lines Capan-1 and MIA PaCa-2.** Int. J. Pancreatol. 1990; *6*: 119-128.
- Ozawa, S.; Ueda, M.; Ando, N.; Abe, O.; Minoshima, S.; Shimizu, N. **Selective killings of squamous carcinoma cells by and immunotoxin that recognizes the EGF receptor.** Int. J. Cancer. 1989; *43*: 152-157.
- Packer, R.J.; Perilongo, G.; Johnson, D.; Sutton, L.N.; Vezina, G.; Zimmerman R.A.; Ryan, J.; Reaman, G.; Schut, L. **Choroid plexus carcinoma of childhood.** Cancer. 1992; *69*: 580-585.
- Pai, L.H.; Gallo, M.G.; FitzGerald, D.J.; Pastan, I. **Antitumor activity of a transforming growth factor- α -*Pseudomonas* exotoxin fusion protein (TGF α -PE40).** Cancer Res. 1991; *51*: 2808-2812.
- Palmiter, R.D.; Chen, H.Y.; Messing, A.; Brinster, R.L. **SV40 enhacer and large-T antigen are instrumental in development of choroid plexus tumours in transgenic mice.** Nature. 1985; *316*: 457-460.
- Parker, S.L.; Tong, T.; Bolden, S.; Wingo, P.A. **Cancer Statistics.** CA. 1996, *46*: 5-28.
- Parker, S.L.; Tong, T.; Bolden, S.; Wingo, P.A. **Cancer Statistics.** CA. 1997, *47*: 5-27.
- Parkkila, A. K., Herva, R., Parkkila, S. and Rajaniemi, H. **Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours.** Histochem J. 1995; *27*: 974-982.
- Parsons, S.; Watson, S.; Amar, S.; Steele, R. **Phase I/II trial of a matrix metalloproteinase inhibitor in patients with malignant ascites (abstract).** Gastroenterology. 1996; *110*: 575.
- Pavelic, K.; Khrascan, R.; Kapitanovic, S.; Vranes, Z.; Cabrijan, T.; Spaventi, S.; Korsic, M.; Krizanac, S.; Li, Q.; Stambrook, P.; Gluckman, J.L.; Pavelics, Z. **Molecular genetics of malignant insulinoma.** Anticancer research. 1996; *16*: 1707-1718.

- Perez-Soler, R.; Donato, N.J.; Shin, D.M.; Rosenblum, M.G.; Zhang, H.Z.; Tornos, C.; Brewer, H.; Chan, J.C.; Lee, J.S.; Hong, W.K. et al. **Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody.** *J. Clin. Oncol.* 1994, *12*: 730-739.
- Perry, R.R.; Vinik, A.I. **Endocrine tumors of the gastrointestinal tract.** *Annu. Rev. Med.* 1996; *47*: 57-68.
- Pierré, A.; Kraus-Berthier, L.; Atassi, G.; Cros, S.; Poupon, M.F.; Lavielle, G.; Berlion, M.; Bizzari, J.P. **Preclinical antitumor activity of a new *vinca* alkaloid derivate, S12363.** *Cancer Res.* 1991; *51*: 2312-2318.
- Pietri, F.; Clavel, F. **Occupational exposure and cancer of the pancreas: a review.** *Br. J. Ind. Med.* 1991; *48*: 583-587.
- Pimentel, E. **Hand book of growth factors. Volumen I: General Basic Aspects.** Ed. CRC Press, Inc, 1994.
- Pinkas-Kramarski, R.; Soussan, L.; Waterman, H.; Levkowitz, G.; Alroy, I.; Klapper, L.; Lavi, S.; Seger, R.; Ratzkin, B.J.; Sela, M.; Yarden, Y. **Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interaccion.** *EMBO J.* 1996; *15*: 2452-2467.
- Poitout, V.; Olson, L.K.; Robertson, R.P. **Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications.** *Diabetes Metab.* 1996; *22*: 7-14.
- Pour, P.; Kruger, F.W.; Althoff, J.; Cardesa, A.; Mohr, U. **Cancer of the pancreas induced in the Syrian golden hamster.** *Am. J. Pathol.* 1974; *76*: 349-358.
- Pour, P.; Althoff, J.; Kruger, F.W.; Mohr, U. **A potent pancreatic carcinogen in Syrian hamsters: *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine.** *J. Natl. Cancer Inst.* 1977; *58*: 1449-1453.
- Pour, P.M.; Egami, H.; Takiyama, Y. **Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications.** *Gastroenterology.* 1991; *100* : 529-536.
- Pratt, W.B.; Taylor P. **Principles of drug action. The basis of pharmacology.** Ed. Churchill Livingstone, N.Y., 1990.
- Quaife C.J.; Pinkert, C.A.; Ornitz, D.M.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. **Pancreatic neoplasia induced by *ras* expression in acinar cells of transgenic mice.** *Cell.* 1987; *48*: 1023-1034.
- Querol, E.; Molina, M.A.; Daura, X.; Oliva, B.; Marino, C.; Canals, F.; Crane-Robinson, C.; Tapia, O. **Protease inhibitors from vegetables as target for protein engineering: application to the potato carboxypeptidase inhibitor.** In : Avilés, F.X. (Ed.), *Innovations on Proteases and their inhibitors*, Walter de Gruyter, Berlin- New York. 1993; 479-486.
- Raijman, I.; Levin, B. **Exocrine Tumors of the Pancreas.** In: V. L. W. Go, J. D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E.P. DiMagno, and G.A. Scheele (eds), *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (Second Edition)*. New York: Raven Press Ltd., 1993: 899-912.

- Real, F.X.; Rettig, W.J.; Chesa, P.G.; Melamed, M.R.; Old, L.J.; Mendelsohn, J. **Expression of epidermal growth receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation.** *Cancer Res.* 1986; *46*: 4726-4731.
- Reddy, J.K.; Rao, M.S. **Pancreatic adenocarcinoma in inbred guinea pigs induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourea.** *Cancer Res.* 1975; *35*: 2269-2276.
- Rees, D.C.; Lipscomb, W.N. **Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution.** *J. Mol. Biol.* 1982; *160*: 475-498.
- Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G.R. **Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; *76*: 3116-3120.
- Reyes, G.; Villanueva, A.; Pujol, M.; Farré, A.; Lluís, F.; Capellà, G. **Orthotopic implantation of human carcinomas of the exocrine pancreas in nude mice.** *Digestion. European Pancreatic Club, Abstracts 1992*; 1304-1305.
- Reynolds, R.K.; Hoekzema, G.S.; Vogel, J.; Hinrichs, S.H.; Jay, G. **Multiple endocrine neoplasia induced by the promiscuous expression of a viral oncogene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; *85*: 3135-3139.
- Ribbons, D.W.; Brew, K. (Eds.). **Proteolysis and Physiological Regulation.** Academic Press, New York, 1976.
- Riese, D.J.II; Stern, D.F. **Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network.** *BioEssays.* 1998; *20*: 41-48.
- Rindi, G.; Efart, S.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.; Solcia, E.; Polak, J.M. **Glucagonomas of transgenic mice express a wide range of general neuroendocrine markers and bioactive peptides.** *Virchows Arch.* 1991; *419*: 115-129.
- Roberts, A.B.; Anzano, M.A.; Lamb, L.C.; Smith, J.M.; Sporn, M.B. **New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; *78*: 5339-5343.
- Rogers, J. H.; Hunt, S. P. **Carbonic anhydrase-II messenger RNA in neurons and glia of chick brain: mapping by in situ hybridization.** *Neuroscience.* 1987; *23*: 343-361.
- Rosenberg, L.; Duguid, W.P.; Brown, R.A. **Development of experimental cancer in the head of the pancreas by surgical induction of tissue injury.** *Am. J. Surg.* 1984; *147*: 146-151.
- Rozenblum, E.; Schutte, M.; Goggins, M.; Hahn, S.A.; Panzer, S.; Zahurak, M.; Goodman, S.N.; Sohn, T.A.; Hruban, R.H.; Yeo, C.J.; Kern, S.E. **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.** *Cancer Res.* 1997; *57*: 1731-1734.
- Ruggeri, B.; Zhang, S.Y.; Caamano, J.; Dirado, M.; Flynn, S.D.; Klein-Szanto, A.J.P. **Human pancreatic carcinoma cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and RB-1 tumor-suppressor genes.** *Oncogene.* 1992; *7*: 1503-1511.

- Rusch, V.; Mendelsohn, J.; Dmitrovsky, E. **The epidermal growth factor receptor and its ligand as therapeutic targets in human tumors.** Cytokine & Growth Factor Reviews. 1996; 7: 133-141.
- Ryan, C.; Hass, G.M.; Kuhn, R.W. **Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes.** J. Biol. Chem. 1974; 249: 5495-5499.
- Ryan, C.A. **Proteinase inhibitor.** In Stumpf, P.K., Conn, E.E. (ed.), The biochemistry of Plants, Acad. Press, New York. 1981; 6 : 357-370.
- Ryan, C.A. **Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores.** BioEssays. 1989; 10: 20-24.
- Sandgren, E.P.; Luetkeke, N.C.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Lee, D.C. **Overexpression of TGF α in transgenic mice: Induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast.** Cell. 1990; 61: 1121-1135.
- Sandgren, E.P.; Quaife, C.J.; Paulovich, A.C.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. **Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 93-97.
- Sandgren, E.P.; Luetkeke, N.C.; Qui, T.H.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.P.; Lee, D.C. **Transforming growth factor dramatically enhances oncogene-induced carcinogenesis in transgenic mouse pancreas and liver.** Mol. Cell Biol. 1993; 13: 320-330.
- Santerre, R.F.; Cook, R.A.; Crisel, R.M.; Sharp, J.D.; Schmidt, R.J.; Williams, D.C.; Wilson, C.P. **Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981; 78: 4339-4343.
- Scarpa, A.; Capelli, P.; Villanueva, A.; Zamboni, G.; Lluís, F.; Accolla, R.; Mariuzzi, G.; Capellà, G. **Pancreatic cancer in Europe. Ki-ras gene mutation pattern shows geographical differences.** Int. J. Cancer. 1994; 57: 167-171.
- Scarpelli, D.G.; Reddy, J.K.; Longnecker, D.S.(eds) **Experimental pancreatic carcinogenesis.** 1986. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Scarpelli, D. G.; Sambasiva, R.; Reddy, J. K. **Are acinar cells involved in the pathogenesis of ductal adenocarcinoma of the pancreas?.** Cancer Cells. 1991; 3: 275-7.
- Scharpe, S.; De Meester, I.; Hendricks, D.; Vanhoof, G.; van Sande, M.; Vriend, G. **Proteases and their inhibitors: today and tomorrow.** Biochimie.1991; 73: 121-126.
- Schiffer, D. **Choroid Plexus Tumors.** In Brain Tumors. Pathology and its biological correlates. New York, Springer-Verlag. 1993; 217-221.
- Schmiegel, W.; Schmielau, J.; Henne-Bruns, D.; Juhl, H.; Roeder, C.; Buggish, P.; Onur, A.; Kremer, B.; Kalthoff, H.; Jensen E.V. **Cytokine-mediated enhancement of epidermal growth factor receptor expression provides an immunological approach to the therapy of pancreatic cancer.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 12622-12626.

- Schnall, S.F.; MacDonald, J.S. **Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas.** *Seminars in oncology.* 1996; *23*: 220-228.
- Schnebli, H.P.; Braun, N.J. **Proteinase inhibitors as drugs.** In Barret S., Salvesen P.A. (Eds.), *Proteinase inhibitors.* Elsevier Science Publishers BV. 1986; 613-627.
- Schnurch, H.G.; Stegmüller, M.; Vering, A.; Beckmann, M.W.; Bender, H.G. **Growth inhibition of xenotransplanted human carcinomas by a monoclonal antibody directed against the epidermal growth factor receptor.** *Eur. J. Cancer.* 1994; *30A*: 491-496.
- Schweitzer, R.; Howes, R.; Smith, R.; Shilo, B.-Z.; Freeman, M. **Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein Argos.** *Nature.* 1955; *376*: 699-702.
- Scott, J.; Urdea, M.; Quiroga, M.; Sanchez-Pescador, R.; Fong, N.; Selby, M.; Rutter, W.J.; Bell, G.I. **Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins.** *Science.* 1983; *221*: 236-240.
- Shibata, D.; Almoguera, C.; Forrester, K.; Dunitz, J.; Martin, S.E.; Cosgrove, M.M.; Perucho, M.; Arnheim, N. **Detection of *c-k-ras* mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 1990a; *50*: 1279-1283.
- Shibata, D.; Capellà, G.; Perucho, M.B. **Mutational activation of the *c-k-ras* gene in human pancreatic carcinoma.** *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1990b; *4*: 151-169.
- Sibilia, M.; Wagner, E.F. **Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor.** *Science.* 1995; *269*: 234-238.
- Smith, J.J., Derynck, R.; Korc, M. **Production of transforming growth factor α in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; *84*: 7567-7570.
- Sordat, B.; Fritsche, R.; Mach, J.P.; Carrel, S.; Ozzello, L.; Cerotini, J.C. In: **Proceedings of the first international workshop on nude mice.** Rygaard, J.; Povlsen, C.O; editors. Stuttgart, F.R.G.: Fischer 1973; 269-277.
- Sorkin, A.; Waters, C.M. **Endocytosis of growth factor receptors.** *BioEssays.* 1993; *15*: 375-382.
- Stracke, M.L.; Liotta, L.A. **Multi-step Cascade of Tumor Cell Metastasis.** *In vivo.* 1992; *6*: 309-316.
- Sun, P.D. **The cystine-knot growth-factor superfamily.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1995; *24*: 269-291.
- Suwa, H.; Yoshimura, T.; Yamaguchi, N.; Kanehira, K.; Manabe, T.; Imamura, M.; Hiai, H.; Fukumoto, M. ***K-ras* and *p53* alterations in genomic DNA and transcripts of human pancreatic adenocarcinoma cell lines.** *Jpn. J. Cancer Res.* 1994; *85*: 1005-1014.

- Tada, M.; Omata, M.; Kawai, S.; Saisho, H.; Ohto, M.; Saiki, R.K.; Sninsky, J.J. **Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 1993; 53: 2472-74.
- Tan, M.; Yao, J.; Yu, D. **Overexpression of the *c-erbB-2* gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities.** *Cancer Res.* 1997; 57: 1199-1205.
- Thomas, P.S. **Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 5201-5205.
- Threadgill, D.W.; Dlugosz, A.A.; Hansen, L.A.; Tennenbaum, T.; Lichti, U.; Yee, D.; LaMantia, C.; Mourton, T.; Herrup, K.; Harris, R.C.; et al. **Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype.** *Science.* 1995; 269: 230-234.
- Todaro, G.J.; De Larco, J.E. **Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells.** *Nature.* 1976; 264: 26-31.
- Tosi, E.; Valota, O.; Negri, D.R.M.; Adobati, E.; Mazzoni, A.; Meazza, R.; Ferrini, S.; Colnaghi, M.I.; Canevari, S. **Anti-tumor efficacy of an anti-epidermal-growth-factor-receptor monoclonal antibody and its F(ab')₂ fragment against high- and low-EGFR-expressing carcinomas in nude mice.** *Int. J. Cancer.* 1995; 62: 643-650.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 4350-4354.
- Tsutsumi, M.; Yasui, W.; Naito, A.; Ohashi, K.; Kobayashi, E.; Noguchi, O.; Horiguchi, K.; Okita, S.; Tsujiuchi, T.; Kitada, H.; et al. **Expression of *cripto* in human pancreatic tumors.** *Jpn. J. Cancer Res.* 1994; 85: 118-121.
- Tzahar, E.; Waterman, H.; Chen, X.; Levkowitz, G.; Karunagaran, D.; Lavi, S.; Ratzkin, B.J.; Yarden, Y. **A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by *neu* differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.** *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 5276-5287.
- Ullrich, A.; Schlessinger, J. **Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity.** *Cell.* 1990; 61: 203-212.
- Umezawa, K. **Inhibition of experimental metastasis by enzyme inhibitors from microorganisms and plants.** *Adv. Enzyme Regul.* 1996; 36: 267-281.
- Ushijama, T.; Tsutsumi, M.; Sakai, R.; Ishisaka, Y.; Takaku, F.; Konishi, Y.; Takahashi, M.; Sugimura, T.; Nagao, M. ***ki-ras* activation in pancreatic carcinomas of Syrian hamsters induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine.** *Jpn J Cancer Res.* 1991; 82: 965-968.

- van der Heyden, M.A.G.; Van Bergen en Henegouwen, P.M.P.; de Rutier, N.; Verdaasdonk, M.A.M.; van den Tweel, J.G.; Rijksen, G.; Boonstra, J.; Joling, P. **The actin binding domain of the epidermal growth factor receptor is required for EGF-stimulated tissue invasion.** *Exp. Cell Res.* 1997; *234*: 521-526.
- van de Poll, M.L.; van Vugt, M.J.; Ienferink, A.E.; van Zoelen, E.J. **Insertion of Argos sequences into the B-loop of epidermal growth factor results in a low-affinity ligand with strong agonistic activity.** *Biochemistry.* 1997; *36*: 7425-7431.
- van Dyke, T.A.; Finlay, C.; Miller, D.; Marks, H.; Lozano, G.; Levine, A.J. **Relationship between simian virus 40 large tumor antigen expression and tumor formation in transgenic mice.** *J. Virol.* 1987; *61*: 2029-2032.
- Verma, I.M.; Somia, N. **Gene therapy- promises, problems and prospects.** *Nature.* 1997; *389*:239-242.
- Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. **Carcinogens leave fingerprints.** *Nature.* 1992; *355*: 209-210.
- Vollmar, A.M.; Banker, D.E.; Mendelshon, J.; Herschman, H.R. **Toxicity of ligand and antibody-directed ricin α -chain conjugates recognizing the epidermal growth factor receptor.** *J. Cell Physiol.* 1987; *131*: 418-425.
- Wagner, M.; Cao, T.; Lopez, M.E.; Hope, C.; Van Nostrand, K.; Kobrin, M.S.; Fan, H.U.; Büchler, M.W.; Korc, M. **Expression of a truncated EGF receptor is associated with inhibition of pancreatic cancer cell growth and enhanced sensitivity to cisplatin.** *Int. J. Cancer.* 1996; *68*: 782-787.
- Walh, S.M.; Wong, H.; McCartney-Francis, N. **Role of growth factors in inflammation and repair.** *J. Cell Biochem.* 1989; *40*: 193-199.
- Wang, W.; Hendriks, D.F.; Scharpé, S.S. **Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen.** *J. Biol. Chem.* 1994; *269*: 15937-15944.
- Wasserman, J.D.; Freeman, M. **Control of EGF receptor activation in *Drosophila*.** *Trends in Cell Biol.* 1997; *7*: 431-433.
- Watanabe, M.; Nobuta, A.; Tanaka, J.; Asaka, M. **An effect of k-ras gene mutation on epidermal growth factor receptor signal transduction in Panc-1 pancreatic carcinoma cells.** *Int J. Cancer.* 1996; *67*: 264-268.
- Waters, J.S.; Ross, P.J.; Popescu, R.A.; Cunningham, D. **New approaches to the treatment of gastro-intestinal cancer.** *Digestion.* 1997; *58*: 508-519.
- Weber W., Bertics, P.J.; Gill, G.N. **Immunoaffinity purification of the epidermal growth factor receptor. Stoichiometry of binding and kinetics of self-phosphorylation.** *J. Biol. Chem.* 1984; *259*: 14631-14636.
- Weinberg, R.A. **The retinoblastoma gene and cell growth control.** *Trends Biochem. Sci.* 1990; *15*: 199-202.

- Weinberg, R.A. **Tumor suppressor genes**. *Science*. 1991; 254: 1138-1146.
- Weiss, F.U.; Daub, H.; Ullrich, A. **Novel mechanisms of RTK signal generation**. *Current Opin. Genet. Develop.* 1997; 7: 80-86.
- Williams, J.A.; Goldfine, I.D. **The insulin-acinar relationship**. In: Go, V.L.W.; Gardner, J.D.; Brooks, F.P.; Lebenthal, E.; DiMagno, E.P.; Scheele, G.A. (eds). *The exocrine pancreas*. Raven Press, New York. 1986; pp 347-360.
- Wu, X.; Fan, Z.; Masui, H.; Rosen, N.; Mendelsohn, J. **Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin**. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1897-1905.
- Wu, X.; Rubin, M.; Fan, Z.; Deblasio, T.; Soos, T.; Koff, A.; Mendelsohn, J. **Involvement of p27^{KIP1} in G1 arrest mediated by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody**. *Oncogene*. 1996; 12: 1397-1403.
- Wynder, E.L.; Mabuchi, K.; Maruchi, N.; Fortner, J.G. **Epidemiology of cancer of the pancreas**. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973; 50: 645.
- Yamaguchi, N.; Yamamura, Y.; Kunihiki, K.; Ohtsuji, E.; Imanishi, J.; Ashihara, T. **Characterization of new human pancreatic cancer cell lines which propagate in a protein-free chemically defined medium**. *Cancer Res.* 1990; 50: 7008-7014.
- Yamanaka, Y.; Friess, H.; Kobrin, M.S.; Büchler, M.; Beger, H.G.; Korc, M. **Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness**. *Anticancer Res.* 1993a; 13: 565-570.
- Yamanaka, Y.; Friess, H.; Büchler, M.; Beger, H.G.; Gold, L.I.; Korc, M. **Synthesis and expression of transforming growth factor-beta 1, beta 2 and beta 3 in the endocrine and exocrine pancreas**. *Diabetis.* 1993b; 42: 746-756.
- Yamanaka, Y.; Friess, H.; Büchler, M.; Beger, H.G.; Uchida, E.; Onda, M.; Kobrin, M.S.; Korc, M. **Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage**. *Cancer Res.* 1993c; 53: 5289-5296.
- Zeleznik, A.J.; Ihrig, L.L.; Bassett, S.G. **Development expression of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells**. *Endocrinology.* 1989; 125: 2218-2220.
- Zhang, M.; Martin, K.J.; Sheng, S.; Sager, R. **Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis**. *TIB TECH.* 1998; 16: 66-71.
- Zumkeller, W.; Schofield, P. N. **Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients**. *Anticancer Res.* 1995; 15: 344-348.

Apéndice

Potato Carboxypeptidase Inhibitor, a T-knot Protein, Is an Epidermal Growth Factor Antagonist That Inhibits Tumor Cell Growth*

(Received for publication, December 15, 1997, and in revised form, March 8, 1998)

Carmen Blanco-Aparicio^{‡§}, Miguel Angel Molina^{‡§}, Ester Fernández-Salas[‡], Marsha L. Frazier[¶],
José M. Mas[¶], Enrique Queroll[¶], Francesc X. Avilés^{¶*}, and Rafael de Llorens[‡]

From the [‡]Unitat de Bioquímica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona 17071, Spain, the [¶]Department of Gastrointestinal Medical Oncology and Digestive Diseases, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, and the Institut de Biologia Fonamental and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 08193 Spain

Epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) are involved in many aspects of the development of carcinomas, including tumor cell growth, vascularization, invasiveness, and metastasis. Because EGFR has been found to be overexpressed in many tumors of epithelial origin, it is a potential target for antitumor therapy. Here we report that potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), a 39-amino acid protease inhibitor with three disulfide bridges, is an antagonist of human EGF. It competed with EGF for binding to EGFR and inhibited EGFR activation and cell proliferation induced by this growth factor. PCI suppressed the growth of several human pancreatic adenocarcinoma cell lines, both *in vitro* and in nude mice. PCI has a special disulfide scaffold called a T-knot that is also present in several growth factors including EGF and transforming growth factor α . PCI shows structural similarities with these factors, a fact that can explain the antagonistic effect of the former. This is the first reported example of an antagonistic analogue of human EGF.

In multicellular organisms peptide factors regulate a variety of cell functions and processes including cell proliferation (1). Epidermal growth factor (EGF)¹ is a competence peptide factor that can induce the cells to advance into the G₁ phase and is required for differentiation of epidermal tissues (1, 2). It is produced by many normal tissues and is present in serum. Both EGF and transforming growth factor α (TGF- α), a growth factor highly homologous to EGF, bind to EGF receptor (EGFR or ErbB-1) (3, 4) and produce similar biological responses.

* This study was supported by Grants SAF94-0939, BIO94-0912-CO2, and BIO95-0848 from the Comisión Interministerial para la Ciencia y la Tecnología of the Spanish Ministry of Education (to R. de L., E. Q., and F. X. A., respectively) and by National Institutes of Health Cancer Center Core Grant ROI-CA46687 (to the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ These authors contributed equally to this work.

** To whom correspondence should be addressed: Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: 34-3-5811315; Fax: 34-3-5812011; E-mail: fx.aviles@blues.uab.es.

¹ The abbreviations used are: EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; PCI, potato carboxypeptidase inhibitor; TGF- α , transforming growth factor α ; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; RITC, rhodamine B isothiocyanate.

Binding of EGF to EGFR induces receptor dimerization (5) and leads to receptor activation and tyrosine transphosphorylation (6). Ligand-receptor complexes are quickly internalized via coated pits and either recycled or subjected to lysosomal degradation (7).

Most human cancers arise in the epithelial component of organs including the skin, breast, lung, and gastrointestinal and genitourinary tracts. Alterations in growth factor signaling pathways during epithelial neoplasia are common and therefore may be important in the development and maintenance of the neoplastic phenotype (8). EGF, TGF- α , and their receptor, EGFR, seem to play a particularly prominent role in epithelial neoplasia (9, 10), and they have been implicated in processes such as tumor cell growth, vascularization, invasiveness, and metastasis (8, 11-13). In many tumors of epithelial origin (carcinomas), EGFR has been found to be overexpressed, and in some cases an autocrine loop involving TGF- α has been reported (2, 14). The importance of an autocrine loop activation involving TGF- α was first described in pancreatic cancer (15), which has a very poor prognosis. EGFR activation is involved in the genesis and progression of pancreatic neoplasia (16, 17). The increased levels of EGF, TGF- α , and EGFR produced by pancreatic tumors may provide tumor cells with a distinct growth advantage that contributes to the clinical aggressiveness of this malignancy.

Given the importance of EGFR in carcinomas, disruption of the activation of EGFR appears to be an excellent target for cancer therapy (2, 13, 18). Cancer cells seem to have lost the normal redundancy in signal transduction pathways and so are preferentially vulnerable to signal interceptors. EGFR activation can be disrupted in several ways, including with EGF antagonists (19), with tyrosine kinase inhibitors (13), and with antibodies directed against the EGFR (20). These three strategies have had various success ratios. Development of EGF/TGF- α antagonists by using short synthetic fragments of both growth factors has not been successful (19). The tyrosine kinase inhibitors have been shown to inhibit the development of tumors in animal models but have toxic side effects (13). In contrast, the use of antibodies seems to have some efficiency as antitumor treatment and it is being tested in clinical trials.

In the study presented here, we show that potato carboxypeptidase inhibitor (PCI), a proteinaceous protease inhibitor, is an antagonist of human EGF with antitumor properties. Some protease inhibitors have been reported to serve as cancer-chemopreventive agents, because they can substantially suppress radiation- and chemical-induced malignant transformation *in vitro* and have strong anticarcinogenic activity *in vivo*

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PRG/OF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	spriggds	3				3,4	499950

(21–23). However, the mechanisms responsible for this activity are unknown.

PCI is a 39-amino acid protein naturally occurring in potatoes that can form complexes with several metallo-carboxypeptidases, inhibiting them in a strong competitive way with a K_i in the nanomolar range (24). We have developed a procedure to obtain the inhibitor in a recombinant form in *Escherichia coli* (25–27). Its structure is known in aqueous solution (28) and in crystal complex with carboxypeptidase A (29). The 27-residue globular core of PCI is stabilized by three disulfide bridges. Residues 35–39 form a C-terminal tail that docks on the carboxypeptidase A active center. PCI contains a small cysteine-rich module, called a T-knot scaffold, that is shared by several different protein families, including the EGF family (30–32).

We report here that PCI is an antagonistic analogue of human EGF, the first one described. PCI bound to EGFR and inhibited its activation by EGF. The structural similarities of PCI with this and other growth factors probably account for its properties as EGF antagonist. In addition, PCI inhibited the growth of human pancreatic cell lines and tumors transplanted in nude mice. Our results indicate that these antitumor properties are probably a result of the EGF antagonistic activity of PCI.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Human recombinant EGF was purchased from R & D Systems (Abingdon, UK), 125 I-labeled EGF from ICN (Costa Mesa, CA), human recombinant insulin was from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), monoclonal antibody against EGFR (clone EGFR1) was from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK), recombinant anti-phosphotyrosine antibody (RC20) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY), protein molecular weight standards were from Bio-Rad (Hercules, CA), and the EZ4U reduction assay kit was from Biomedica Corp. (Vienna, Austria). All other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) or Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

PCI was obtained as a recombinant protein. The construction of a synthetic gene for PCI, its expression in *E. coli*, and a procedure to detect, quantify, and purify recombinant PCI secreted into the culture medium have been previously reported (25–27).

Routine Cell Culture—Capan-1, Panc-1, A431, and HIT were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Capan-1, A431, and HIT cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, and 20 μ g/ml gentamicin unless otherwise indicated. Panc-1 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, and 20 μ g/ml gentamicin.

Cell Proliferation Assays and Growth Curves—The inhibitory effects of PCI on cell growth were determined with a proliferative assay. To measure proliferation in medium with serum, Capan-1, Panc-1, and HIT tumor cells were seeded at a density of 5×10^3 /well in 96-well plates in medium containing 10% FBS. PCI was immediately added at concentrations of 0.1–200 μ g/ml. The cells were fed every 4 days with medium containing fresh PCI. Control cells were grown without PCI. After 23 days (for Capan-1) or 10 days (for Panc-1 and HIT), the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-phenylaminocarbonyl-2H-tetrazolium-hydroxide (EZ4U) reduction assay was performed to estimate the number of cells according to the manufacturer's instructions.

To measure proliferation in serum free medium, Capan-1 cells were seeded at a density of $5\text{--}15 \times 10^3$ /well in 96-well plates in the presence of DMEM supplemented with 10% FBS. After 72 h, the cells were washed with PBS twice, and serum-free medium (DMEM plus 0.1% of bovine serum albumin without FBS) was added. 24 h later, the serum-starved cells were washed twice with PBS and grown in serum-free medium supplemented with 5 ng/ml sodium selenite and 5 μ g/ml transferrin with EGF (10 ng/ml), insulin (5 μ g/ml), PCI (50 μ g/ml), EGF (10 ng/ml), and PCI (50 μ g/ml) or insulin (5 μ g/ml) and PCI (50 μ g/ml). After 72 h, Capan-1 cells were washed with PBS, and the EZ4U reduction assay was performed to determine the number of cells.

The growth curve of Capan-1 cells was obtained as follows. Capan-1 cells seeded at a density of 1×10^5 /well in 6-well plates were treated with 0, 1, or 10 μ g/ml PCI. The cells were fed every 4 days with fresh medium. Every day, three replicate wells for each treatment were washed once with PBS, the cells were detached with trypsin, and viable cells were counted by trypan blue dye exclusion.

To obtain the growth curve of Capan-1 cells pretreated with PCI, tumor cells were grown in presence of 50 μ g/ml PCI for 3 weeks. The cells were fed every 4 days with medium containing fresh PCI and split 1:10 weekly. Control, untreated cells were grown simultaneously in absence of PCI. After 21 days, the cells were trypsinized, seeded at a density of 2×10^3 /well in 96-well plates, and treated with 0, 1, or 50 μ g/ml PCI. Control cells were grown in PCI-free medium. Every 3 days, 8 replicate wells for each treatment were submitted to the EZ4U reduction assay to estimate the number of cells.

Tumor Transplantation Experiments—For injection into nude mice, Capan-1 cells were trypsinized and resuspended in DMEM. 6-week-old female Cd1 nude mice were each injected subcutaneously in the dorsal area with 1×10^7 cells in 0.1 ml of DMEM. 12 days after the injection, when the tumors had reached at least 2 mm in diameter, treatment was started. The tumors were injected daily with 11, 60, or 120 μ g of PCI. Control mice were treated with PBS alone. Each group was composed of five mice. The tumors were measured weekly. After 32 days, the animals were killed by CO₂ asphyxiation. Their tumor volumes were determined by using the formula ((width)² × length)/2.

Cell Cycle Analysis—Logarithmically growing Capan-1 cells were treated with 50 μ g/ml PCI for 12 days in a 75-cm² flask. Adherent cells were collected by trypsinization and combined with cells floating in the medium. After being washed with PBS, the cells were resuspended in 200 μ l of PBS, and 2 ml of ethanol 70% at -20°C was added. After 2 h of fixation, the cells were stained with propidium iodide (50 μ g/ml), and RNase (20 μ g/ml) was also added. Flow cytometry was performed by exciting the cells with a 488-nm laser (Becton Dickinson and Co., Rutherford, NJ).

PCI Internalization Assays—RITC labeling of PCI was performed according to Billings *et al.* (21). The RITC-labeled PCI was used for fluorescence internalization assays. Cells were cultured in chamber slides (Nunc, Kamstrup, Denmark) in DMEM supplemented with 10% serum, and RITC-labeled PCI was added at a concentration of 20 μ g/ml. After 30 min, the medium was removed, and the cell monolayers were washed with PBS, fixed with 1:1 methanol:acetic acid, and observed under a fluorescence microscope.

PCI uptake assays were performed by measuring the PCI concentration in Capan-1 culture medium for 24 h. In three separate experiments cells growing logarithmically in a 25-cm² flask in DMEM supplemented with 10% FBS were treated with PCI at 10, 50, and 200 μ g/ml. Samples of 20 μ l of medium were taken every 30 min for 24 h. The concentration of PCI was determined by inhibition assays of carboxypeptidase A (24) and enzyme-linked immunosorbent assay using a rabbit polyclonal antibody raised against PCI. Medium without PCI was used as a reference.

Comparison of the Three-dimensional Structures of PCI and EGF—We developed a computer program (Knot-Match)² to superimpose the proteins by three-dimensional alignment of their disulfide bridges. The program clusters structures from Protein Data Base proteins by means of a density search algorithm. Molecular graphics and simulations were performed on a Power Indigo 2 from Silicon Graphics. The structures of PCI and growth factors were visualized with the TURBO FRODO program (33). The conformation of loops was analyzed by the Arch-Type program (34).

Ligand Binding Assays—Capan-1 cells were seeded at a density of 1.25×10^5 /well in 24-well plates in the presence of DMEM plus 10% FBS. After 48 h, the medium was replaced with DMEM without FBS. 24 h later, the cells were washed twice with ice-cold binding buffer (DMEM plus 20 mM HEPES, pH 7.5, and 0.3% (w/v) bovine serum albumin) and incubated for 4 h at 4°C with binding buffer containing 350 pM 125 I-labeled EGF and various concentrations of EGF or PCI. The cells were then washed rapidly three times with ice-cold PBS with 0.1% bovine serum albumin and solubilized by incubating them for 30 min at room temperature with 1 N NaOH with 0.1% SDS. The radioactivity in the suspension was determined with a γ counter (LKB, Uppsala, Sweden). Nonspecific binding was determined as the amount of radioactivity bound to cells incubated with a 100-fold molar excess of unlabeled EGF. The data were analyzed by computer fitting of one ligand with two binding sites.

Receptor Phosphorylation Analysis—Receptor phosphorylation analyses of serum-starved cells were performed as follows. 50% confluent, serum-starved Capan-1 and A431 cells in 60-mm dishes were treated with various concentrations of PCI (in DMEM) for 10 min and immediately stimulated with EGF (5 ng/ml for Capan-1 and 1 ng/ml for A431

²J. M. Mas, B. Oliva, C. Blanco, M. A. Molina, R. de Llorens, F. X. Avilés, and E. Querol, submitted for publication.

Ong. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	spriggsd	3				3,4	499950

cells, also in DMEM) for 10 min. The cells were then lysed, and the EGFR was immunoprecipitated from cell extracts using equal amounts of proteins of each sample with anti-EGFR antibody EGFR1. The kinase activity of the immunoprecipitated receptor was measured by incubating it with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ for 10 min (35). Samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by autoradiography. The bands were quantified with a β counter. The level of tyrosine phosphorylation of the immunoprecipitated receptor was assessed by immunoblotting with anti-Tyr(P) antibody RC-20 (36). The blots were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) and then autoradiographed. The bands were quantified by densitometry.

For the receptor phosphorylation analyses of Capan-1 and A431 cells growing in DMEM plus 10% FBS, cells were treated with 10 ng/ml EGF or 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI. The kinase activity of the receptor was measured as described above.

Data Analysis—Means \pm S.E. are depicted unless indicated otherwise. Student's *t* test or analysis of variance for repeated measures was used for comparisons between data sets.

Covalent Cross-linking Experiments—The cross-linking experiments were carried out as previously reported in Ref. 47. Briefly, cells of A431 human epidermal carcinoma line were lysed and homogenized. Samples were mixed with different concentrations of PCI alone and PCI plus EGF. Cross-linking was initiated by addition of glutaraldehyde. The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (5%), electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, and immunostained with antibodies against EGFR (ErbB-1). The presence of PCI was corroborated by immunostaining with rabbit antibodies against PCI on the same membrane.

RESULTS

Inhibition of Proliferation of Pancreatic Tumor Cell Lines by PCI—To determine whether PCI could inhibit the growth of tumor cells, we tested its ability to affect the *in vitro* growth of two human pancreatic adenocarcinoma cell lines, Panc-1 and Capan-1, and the hamster insulinoma cell line HIT. Cells were cultured in medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Concentrations of PCI greater than 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly inhibited growth, particularly for Capan-1 and HIT cells (Fig. 1A). The maximal effect was obtained at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI; higher concentrations did not have stronger effects.

We subsequently obtained the growth curve of Capan-1 cells in the presence of 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI. There was a clear decrease in the growth rate of the cells in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI (Fig. 1B). No significant differences were observed in the cells treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI compared with controls.

Further studies were undertaken to assess the effect of protracted treatment with PCI on the proliferation of Capan-1 cells. The growth rate of the cells that had been pretreated with PCI for 3 weeks was significantly lower than that of Capan-1 control cells (Fig. 1C). The inhibitory effect was observed even when the pretreated cells were grown without PCI. These experiments demonstrated that PCI had a long lasting inhibitory effect on the growth of Capan-1 cells that was maintained even after PCI was removed from the culture medium.

Inhibition by PCI of Capan-1 Tumor Growth in Nude Mice—We next determined whether PCI could also reduce the growth of solid tumors obtained by subcutaneous injection of Capan-1 cells into nude mice (Fig. 2). There was a significant reduction of the growth of the tumor transplantations at the three PCI doses tested. No toxic side effects were observed in any of the treated animals. Histological examination of the tumors showed no appreciable morphological differences between tumors from treated and control animals (data not shown), suggesting that the decreased size of tumors in treated animals was not due to cytotoxic effects or massive cellular death. That PCI could inhibit the growth of human pancreatic tumor cells is particularly important because the prognosis for pancreatic cancer is very poor and there are no effective treatments (37).

Effects of PCI on Cell Cycle Traversal—To further character-

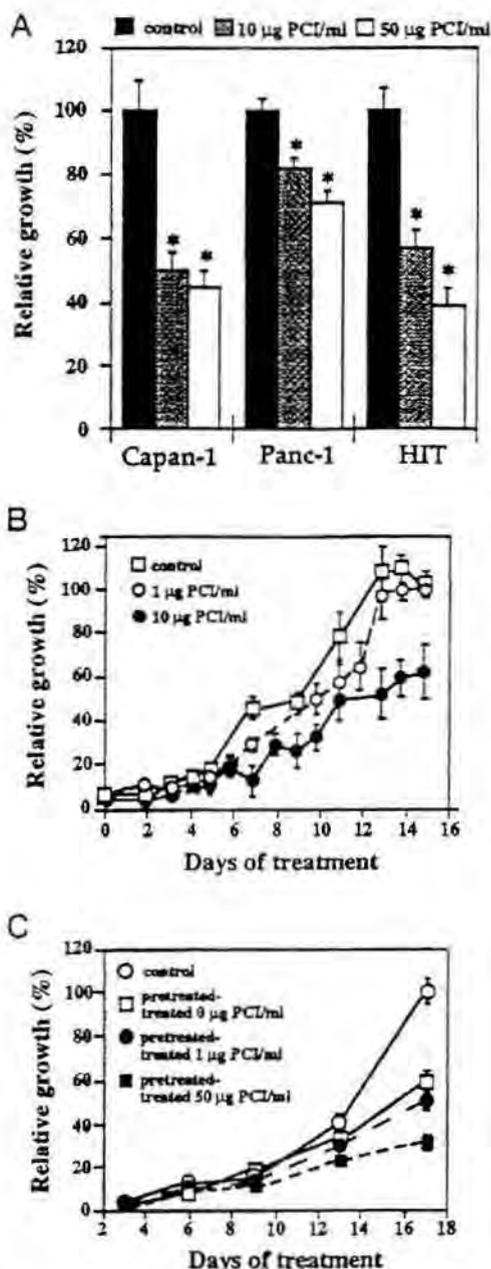


FIG. 1. Effects of PCI on the growth of pancreatic adenocarcinoma tumor cell lines. A, inhibition of Capan-1, Panc-1, and HIT proliferation by PCI. The number of cells was estimated after 10 days (for Panc-1 and HIT) or 23 days (for Capan-1). The values shown are means \pm S.E. from 8 replicate wells for each treatment. An asterisk denotes significantly different from control ($p < 0.001$). B, effects of PCI on the growth curve of Capan-1 cells. The values shown are means \pm S.E. C, effects of PCI pretreatment on the growth of Capan-1. Tumor cells were pretreated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI for 3 weeks. After 21 days, the cells were trypsinized and seeded, and PCI was added at the indicated concentrations. The extent of cell proliferation was determined every 3 days by using the colorimetric EZ4U assay.

ize the effects of PCI on tumor cell growth, analyses of cell cycle phase distribution were performed with Capan-1 cells. Flow cytometry did not reveal any cell cycle changes in Capan-1 cells treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI for up to 7 days compared with controls. No significant increase in the percentage of apoptotic cells was observed by flow cytometry, direct counting of apoptotic cells after nucleus staining, or agarose electrophoresis of nuclear DNA. However, after 12 days of treatment with PCI, a significant increase in the percentage of apoptotic cells (the sub- G_0 population) was observed by flow cytometry (being the mean \pm S.D. of $6.9 \pm 0.9\%$ for control and $10.5 \pm 1.5\%$ for treated cells). A small increase ($65.2 \pm 0.9\%$ to $68.5 \pm 2.9\%$) in

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	spriggsd'	3				3,4	499950

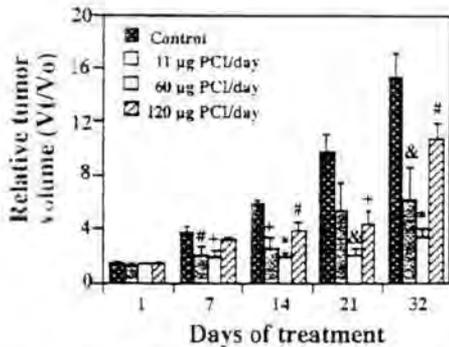


FIG. 2. Suppression by PCI of Capan-1 tumor growth in nude mice. Female C57BL/6 nude mice were injected subcutaneously in the dorsal area with 1×10^7 cells. Treatment was started 12 days after the injection. The tumors were injected daily with various doses of PCI dissolved in PBS. Control mice were treated with PBS alone. Each group was composed of five mice. The data are expressed as the final volume of the tumors (V_t) relative to their initial volume (V_0) and are the means \pm S.E. The symbols above the bars denote significant difference from control values: #, $p < 0.1$; +, $p < 0.025$; &, $p < 0.01$; *, $p < 0.001$.

the percentage of cells in the G_0/G_1 phase was also detected. These findings suggested that the increase in the percentage of apoptotic cells in presence of PCI could be one of the mechanisms responsible for the inhibitory effect of this protein on tumor cell growth.

Internalization of PCI by Capan-1 and Panc-1 Cells—The results so far obtained led us to examine whether PCI was taken up by tumor cells. Using fluorescent labeling of PCI, we demonstrated that PCI was easily internalized by Capan-1 and Panc-1 cells. FITC-conjugated PCI was observed in the cytoplasm of the cells as early as 30 min after its addition to the culture medium of logarithmically growing cells. The fluorescence was located mainly around the nucleus (Fig. 3A).

To better characterize the kinetics of the internalization of PCI by the cells, we measured the PCI concentration in the medium every 30 min for 24 h after its addition. Three separate experiments were performed using three different PCI initial concentrations. In all cases, PCI underwent several cycles of disappearance and reappearance (Fig. 3B). 24 h after its addition, PCI was purified from the medium and subjected to mass spectrometry analysis, which showed that the molecular mass of PCI remained unaltered. This finding was not surprising, because PCI has been reported to be very resistant to proteolytic degradation (38).

Computer Comparison of the Three-dimensional Structures of PCI and EGF—PCI and several mammalian growth factors, ω -toxins, and other proteins share a cystine-knot scaffold, the so-called T-knot (30–32). To gain insight into the possible mechanisms responsible for the growth inhibitory effects of PCI, we compared the three-dimensional structures of PCI and other T-knot proteins by means of Knot-Match program.² The program yielded seven groups. One of these groups contained growth factors and other proteins such as PCI. The geometries of the disulfide bridges in PCI are very similar to those in EGF (Fig. 4), TGF- α , and heregulin (data not shown). In addition, the conformation of two PCI loops (residues 18–24 and particularly residues 27–34) and a stretch of PCI C-tail (residues 33–37) is very similar and can be superimposed with a good root mean square deviation with loops 14–20 and 22–29 and the C-terminal tail (42–46) of EGF. PCI loop 27–34 showed a root mean square deviation of 0.79 Å for backbone atoms with loop 22–29 of EGF. Moreover, some key functional positions in EGF related to receptor binding (19) turned out to be of similar character in PCI when the three-dimensional structures of both proteins were superimposed, based on disulfide bridges topol-

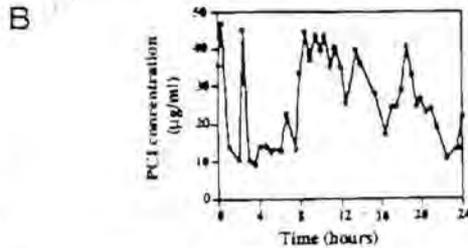


FIG. 3. Uptake of PCI by logarithmically growing Capan-1 cells. A, cells grown for 30 min in the presence of FITC-labeled PCI viewed by fluorescence microscopy (magnification, 400 \times). B, PCI concentration in the medium of a Capan-1 culture. PCI was added at 50 μ g/ml, and its concentration was followed for 24 h. Similar disappearance and reappearance cycles were observed in separate experiments using initial concentrations of 10 and 200 μ g PCI/ml.

ogy. Among them are Leu²⁶, Tyr³⁷, Arg⁴¹, and Leu⁴⁷, which correspond to Ala³¹, Trp²², Lys¹⁰, and Val³⁸ of PCI (Fig. 4).

The structural and conservative positional similarities between PCI and human EGF and TGF- α suggested that PCI could act as an EGF/TGF- α antagonist, competing with these growth factors for binding to EGFR and thus inhibiting its activation. This could be the mechanism for the suppressive effect of PCI on tumor cell growth, because EGFR stimulation by either EGF or TGF- α seems to be required for proliferation by a variety of tumor cell lines and carcinomas (13, 39, 40). We used several approaches to test the hypothesis that PCI is an EGF antagonist.

Suppression by PCI of the Stimulatory Effect of EGF on the Growth of Capan-1 Cells—We performed experiments with serum-starved Capan-1 cells in presence of PCI, EGF, insulin, or PCI and growth factor simultaneously. Both growth factors had a stimulatory effect on cell growth that was stronger in the case of EGF. The presence of PCI completely abolished the EGF stimulation of cell proliferation but had no effect in the case of insulin-induced cell growth (Fig. 5).

PCI Competition with EGF for Binding to EGFR—Binding experiments using the Capan-1 cell line were performed. The binding of ¹²⁵I-labeled EGF was measured in the presence of increasing concentrations of EGF (Fig. 6A). The data revealed that Capan-1 had high and low affinity receptors for EGF. For the former, the IC₅₀ for EGF was 0.6 μ M. We then measured the binding of ¹²⁵I-EGF in presence of increasing concentrations of PCI (Fig. 6B). PCI competed with ¹²⁵I-EGF for binding to the high and low affinity receptors. The IC₅₀ of the high affinity receptors for PCI was 100 μ M.

PCI Inhibition of EGFR Kinase Activity and Transphosphorylation Induced by EGF—We next investigated whether PCI could inhibit the activation of the receptor induced by EGF in the EGFR-overexpressing vulvar carcinoma cell line A431 (41) and in Capan-1. In experiments using serum-starved A431

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	spriggsd	3				3,4	499950

FIG. 4. Superimposition of the three-dimensional structures of PCI and EGF by using the Knot-Match program. Upper left, ribbon representation of superimposed PCI (yellow) and EGF (white) backbones. Right, Van der Waals representation of the three-dimensional structures of PCI and EGF. The side chains of the residues that coincide after superimposition of the disulfide bridges of the two proteins are color-coded: brown, hydrophobic; cyan, basic; green, polar; purple, aromatic. Center, Van der Waals representation of the superimposition of the three-dimensional structures of PCI (yellow) and EGF (white) using the same color code as in the representations on the right. The table shows the residues that coincide after the superimposition.

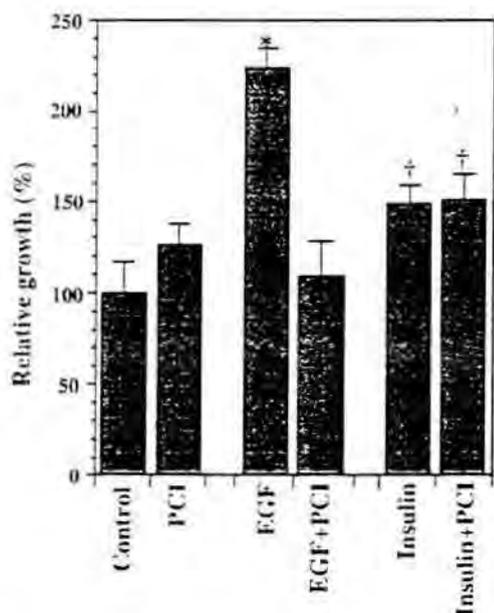
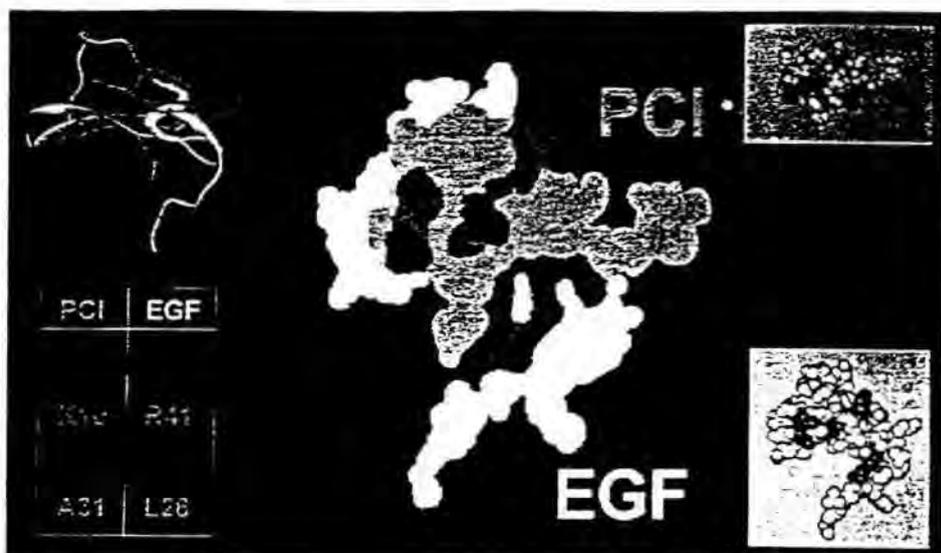


FIG. 5. Suppression by PCI of the stimulatory effect of EGF on the growth of serum-starved Capan-1 cells. Cells were treated during 72 h with EGF (10 ng/ml), insulin (5 μ g/ml), PCI (50 μ g/ml), EGF and PCI, or EGF and insulin. The values shown are the means \pm S.E. from 8 replicate wells for each treatment. Significant difference from control values are indicated: †, $p < 0.05$; *, $p < 0.001$. The results shown are a representative of three different experiments.

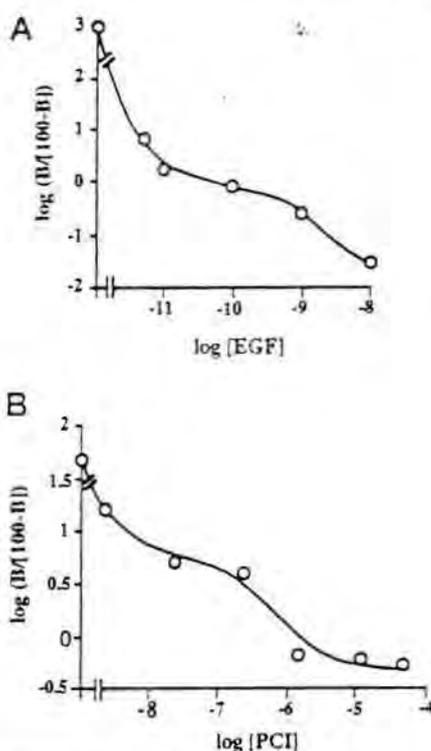


FIG. 6. Displacement of 125 I-labeled EGF from Capan-1 cells by unlabeled EGF (A) and PCI (B). Monolayers of serum-starved cells were incubated at 4 $^{\circ}$ C with 350 pM of 125 I-labeled EGF and various concentrations of EGF and PCI. Cell-bound radioactivity was determined following 4 h of incubation and extensive washing. Nonspecific binding was determined in the presence of an excess of the unlabeled factor and was subtracted from the total amount of cell-bound radioactivity. The specifically bound percentage of 125 I-labeled EGF (B) was used to calculate $\log (B/100 - B)$, which is plotted against the logarithm of the concentrations of EGF and PCI. The plots were also used to calculate the IC_{50} .

cells, we found that there was a low level of EGFR kinase activity. Addition of EGF caused a rapid increase in this activity (detectable after 10 min), and PCI was found to be an effective inhibitor of this activation. Preincubation of the cells with 50 μ g/ml PCI for 10 min completely suppressed any detectable activation of EGFR by EGF (Fig. 7A). Similar results were obtained in Capan-1 cells, in which 50 μ g/ml PCI strongly reduced the activation of EGFR by EGF (Fig. 7B). Western blot analyses confirmed that 50 μ g/ml PCI blocks the EGF-induced tyrosine transphosphorylation of EGFR in both A431 (Fig. 7A) and Capan-1 (Fig. 7B).

We also examined the effect of PCI on EGFR activation in Capan-1 and A431 cells growing in medium with 10% FBS, without added EGF. These cells showed a significant level of EGFR activation that was not affected by addition of EGF for 10 min (data not shown). When PCI was added for 10 min, the kinase activity of the receptor was significantly reduced about 20% (Fig. 8A), probably as a result of the PCI-induced blockage

of EGFR activation by growth factors either present in the FBS or produced by the cells. When PCI was maintained in the culture medium for 6 days, the reduction in the kinase activity was stronger; in this case the possibility that PCI down-regulates EGFR cannot be ruled out (Fig. 8B).

Covalent Cross-linking Experiments—Cross-linking assays showed that PCI interacts with EGFR and that this interaction could be reverted by EGF (not shown). PCI only cross-reacts with monomers of EGFR, thus indicating that it is inhibiting the dimerization capacity of EGF. PCI seems to act as an

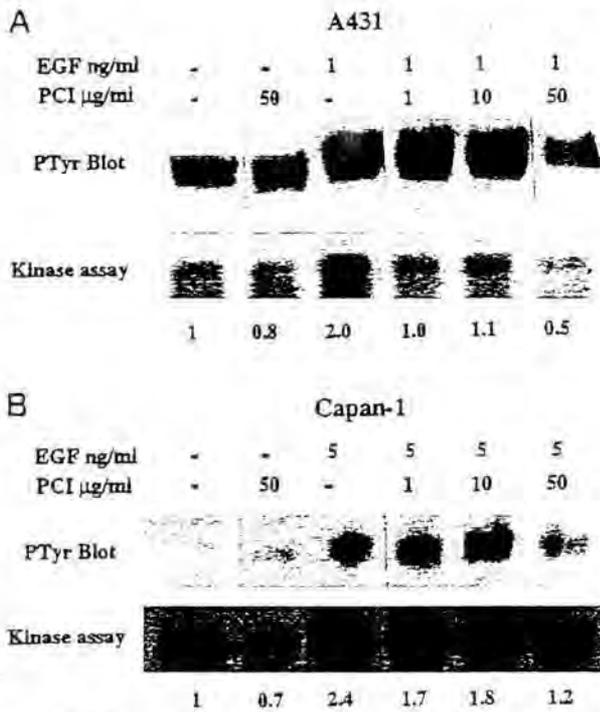


FIG. 7. Inhibition by PCI of EGFR activation by EGF in A431 (A) and Capan-1 (B) cells. 50% confluent serum-starved Capan-1 and A431 cells were treated with various concentrations of PCI for 10 min and immediately stimulated with EGF (5 ng/ml for Capan-1 and 1 ng/ml for A431 cells) for 10 min. The activation of the receptor was measured by an immune complex kinase assay (bottom panels) as well as by blotting of the immunoprecipitated receptor with anti-phosphotyrosine antibody (top panels). In the autoradiographs of the kinase assays, the number below each lane is its intensity relative to the control (untreated cells) as measured by a β counter. The results shown are a representative of three different experiments.

antagonist analogue of EGF preventing the dimerization process.

DISCUSSION

Much effort is currently being devoted to finding new molecules that target signal transduction pathways (13), including antagonists that bind to growth factor receptors without activating them (8, 19, 20). Such antagonists are of both theoretical and clinical interest, because they can lead to a better understanding of the interactions responsible for the binding of growth factors to their receptors and can be used as new anti-tumor drugs.

The EGFR is one of the most studied growth factor receptors due to its importance in the development and functionality of epidermal tissues as well as carcinomas, where it is frequently overexpressed. Both EGF and TGF- α bind to this receptor, whose activation initiates a cascade of biological processes (42) and is required for proliferation in many cell types and cancer cells. Despite its importance, no antagonist for human EGF has been reported so far. An inhibitory ligand of the *Drosophila* homologue of the mammalian EGFR has been recently described (43), and monoclonal antibodies against human EGFR have been produced (44). PCI is, however, the first reported antagonistic analogue of human EGF that is able to bind to EGFR without eliciting the activation of the receptor. In addition, PCI can suppress tumor cell growth, probably as a result of diminished EGFR activation.

The results of the binding experiments presented here demonstrated that PCI competed with EGF for binding to EGFR. The affinity of the receptor for EGF was higher than for PCI, as was expected. The internalization of PCI by the cells observed by using fluorescent labeling was perhaps a consequence of the

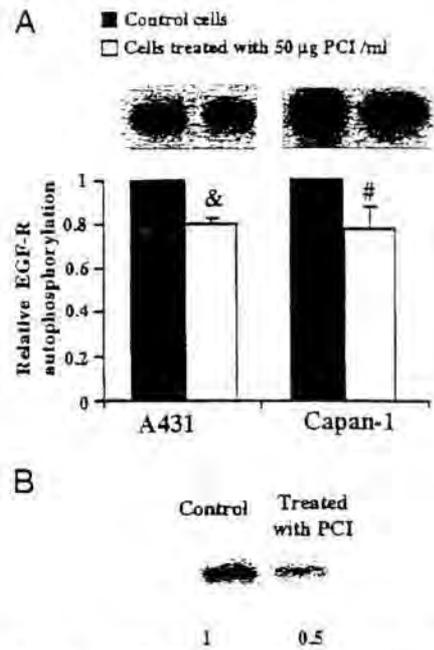


FIG. 8. Reduction of EGFR kinase activity by PCI in cells growing in medium with 10% FBS with no EGF added. A, Capan-1 and A431 cells growing in DMEM plus 10% FBS were treated with 50 μ g/ml PCI for 10 min, and the kinase activity of the immunoprecipitated receptor was measured. Four independent experiments were performed with each cell line. The bars represent the average 32 P-cpm of the EGFR bands, quantified with a β counter, \pm S.E. Significant differences from control values are indicated: #, $p < 0.1$; &, $p < 0.01$. A representative autoradiograph of each cell line is shown. B, A431 cells were treated with 50 μ g/ml PCI for 6 days, and the kinase activity of the receptor was measured. The number below each band is its intensity relative to the control value.

endocytosis of the EGFR once it was bound to PCI. Some indirect evidence supports this hypothesis. First, after internalization PCI was located around the nucleus, as is EGF (45). Second, PCI underwent several cycles of appearance and disappearance from the culture medium, which might have been produced by the recycling and lysosomal degradation of the receptor (7). This reappearance in the culture medium of a dissociated recycled ligand has also been observed in the case of EGF (46). Third, PCI was not altered by the cells, which rules out the possibility that PCI binds to a membrane metallo-carboxypeptidase, given that the last residue of the inhibitor is quickly cleaved when it binds to these kinds of enzymes (24).

PCI not only bound to EGFR, but it also inhibited the activation of the receptor induced by EGF. The experiments performed in serum-starved Capan-1 and A431 cells demonstrated that PCI binding did not significantly activate EGFR and that the inhibitor blocked the EGF-induced increase in the kinase activity of the receptor and the transphosphorylation of tyrosine residues (Fig. 7). In serum-starved cells, the level of EGFR activation was low, raising very significantly after addition of EGF. By contrast, in cells growing in presence of FBS, a significant level of EGFR activation was observed, probably as a result of the presence of growth factors in serum capable of activating the receptor. In these conditions, the addition of EGF did not have any effect on the level of EGFR activation. In contrast, PCI reduced the kinase activity of the receptor in a significant way, suggesting that it competed with the growth factors present in serum for binding to EGFR (Fig. 8A). In all the previous experiments, the cells were incubated with PCI only for 10 min. When the inhibitor was maintained for 6 days in the culture medium of A431 cells growing with serum, the reduction in the kinase activity of the receptor was stronger, perhaps because of the PCI-induced down-regulation of EGFR (Fig. 8B).

Computer-based analysis showed that PCI had clear structural similarities to EGF that can explain its antagonistic activity. Both PCI and EGF are small proteins with three disulfide bridges arranged in a special scaffold called the T-knot. We developed a computer program to superimpose proteins by structural alignment of the disulfide bridges. When applied to PCI and growth factors such as EGF, TGF- α , and heregulin, it revealed that two loops of the inhibitor and part of its C-terminal tail superimposed onto the corresponding growth factor loops. It also revealed that some residues of EGF involved in receptor binding (19) fit in the space with residues of PCI with similar physico-chemical properties (Fig. 4).

The inhibitory effect of PCI on the growth of human pancreatic adenocarcinoma cell lines was demonstrated in a variety of conditions. In the case of Capan-1 cells growing in medium with serum, the effect of PCI was apparent after 7–10 days of culture (Fig. 1) and was only observed when the PCI concentration was higher than 10 $\mu\text{g/ml}$. These findings correlate with the results obtained from cell cycle analyses, which indicated that after 12 days of treatment with PCI, the percentage of apoptotic cells significantly increased over the control values. A small increase in the number of cells in the G_0 - G_1 phase was also observed. These results are in agreement with those obtained by Wu *et al.* (44) using a monoclonal antibody against EGFR that blocks EGF binding and inhibits the proliferation of many tumor cell lines. They found that in some lines this antibody induced G_1 arrest or apoptosis. The effects of PCI on cell cycle traversal could explain the inhibition of cell growth induced by this protein.

The results obtained in the proliferation experiments using serum-starved Capan-1 cells indicate that the antiproliferative effect of PCI is probably due to the fact that it is an EGF antagonist. When EGF was added to serum-starved Capan-1 cells, it stimulated cell proliferation, but this effect was abolished if PCI was administered simultaneously to the cells. This result is in perfect agreement with those obtained when studying EGFR activation. By contrast, the stimulatory effect of insulin on Capan-1 cell growth was not affected by the presence of PCI. The inhibitor is therefore capable of specifically suppressing the EGF proliferative effect on serum-starved Capan-1 cells. In cells growing in medium with FBS, PCI probably competes with the growth factors present in serum capable of binding to EGFR, as EGFR activation experiments indicate, and blocks their proliferative effect. This offers an explanation for the inhibitory effect of PCI on cells growing with serum.

When Capan-1 cells were grown in presence of PCI for at least 3 weeks and then transferred into fresh medium, the growth rate of this cells even without PCI was significantly lower than that of control cells (Fig. 1C). If protracted treatment with PCI can down-regulate EGFR, as some of our results seem to suggest (Fig. 8B), the lower amounts of EGFR could be responsible for the reduction in the growth rate of the treated cells.

Some protease inhibitors have been reported to have anticarcinogenic properties (22), but the mechanisms responsible for these properties are unclear. We offer an explanation for the tumor growth suppressive activity of a protease inhibitor, PCI, showing that it acts as a growth factor antagonist. The effect of PCI on tumor growth seems attributable to its special topology and not to its protease-inhibitory activity. Several protease inhibitors with cancer-chemopreventive properties have a T-knot scaffold, and our work suggests that they may also act as growth factor antagonists.

Several properties of PCI make it a good candidate for a therapeutic agent. First, it was able to inhibit the development of human adenocarcinoma tumors transplanted into nude

mice without inducing any observable toxic side effects. This fact is particularly interesting because there are not effective treatments available for pancreatic cancer. Second, PCI is a small protein very resistant to denaturation and proteolytic degradation. And third, PCI had a long lasting inhibitory effect on the *in vitro* growth of pancreatic adenocarcinoma cell lines that was maintained even when it was removed from the culture medium. In addition, we have obtained a transgenic cell line from mice that develop insulinomas, and preliminary results indicate that PCI also reduces the growth of these tumors and increases the survival time of the animals.³

In summary, we have described the antitumor properties of PCI, a small protein with three disulfide bridges arranged in a T-knot, and we have demonstrated that it is the first antagonistic analogue of human EGF described. PCI is of both theoretical and clinical interest and opens the possibility of engineering PCI-like EGF antagonists with improved properties. At present, we are testing whether PCI can also inhibit the growth of other carcinoma cell lines expressing EGFR. That the most common cancers (lung, prostate, breast, and colon) are of epithelial origin gives an additional clinical interest to this approach.

Acknowledgments—We thank Prof. T. L. Blundell for the critical revision of the manuscript and helpful suggestions. We also thank G. E. Gallick (M. D. Anderson Cancer Center) for assistance with the EGFR phosphorylation studies; R. Peracaula, N. Ruiz, A. Oliva, and M. Sitjà (Universitat de Girona) for the review of the manuscript; and C. Marino, G. Venhudoval, and F. Canals (Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona) for technical assistance with the production of recombinant PCI.

REFERENCES

- Carpenter, G., and Wahl, M. I. (1991) in *Peptide Growth Factors and Their Receptors* (Sporn, M. B., and Roberts, A., eds) Vol. 1, pp. 69–172. Springer-Verlag, New York.
- Aaronson, S. (1991) *Science* **254**, 1146–1153.
- Carpenter, G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 881–914.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995) *Nature* **376**, 337–341.
- Lemmon, M. A., Bu, Z., Ladbury, J. E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D. M., and Schlessinger, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 281–294.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) *Cell* **61**, 203–212.
- Sorkin, A., and Waters, C. M. (1993) *BioEssays* **15**, 375–382.
- Zumkeller, W., and Schofield, P. N. (1995) *Anticancer Res.* **15**, 344–348.
- Derynck, R. (1992) *Adv. Cancer Res.* **58**, 27–52.
- Lee, D. C., Luetcke, N. C., and Petch, L. A. (1992) *Cancer Treat. Res.* **63**, 233–254.
- Engelbraaten, O., Bjerkvig, R., Pedersen, P. H., and Laerum, O. D. (1993) *Int. J. Cancer* **53**, 209–214.
- Nelson, J., Stewart, R., McGivern, M., Bailie, J. R., Walker, B., Murphy, R. F., and Wilson, D. J. (1991) *Carcinogenesis* **12**, 1823–1829.
- Levitzki, A. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 239–244.
- Imamoto, A., Beltran, L. M., and DiGiovanni, J. (1991) *Mol. Carcinogen.* **4**, 52–60.
- Smith, J. J., Derynck, R., and Korc, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7567–7570.
- Lemoine, N. R., Hugues, C. M., Barton, C. M., Poulson, R., Jeffery, R. E., Köppler, G., Hall, P. A., and Gullick, W. J. (1992) *J. Pathol.* **166**, 7–12.
- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., and Beger, H. G. (1992) *J. Clin. Invest.* **90**, 1352–1360.
- Hynes, N. E., and Groner, B. (1995) *Nat. Med.* **1**, 631–632.
- Groenen, L. C., Nice, E., and Burgess, A. W. (1994) *Growth Factors* **11**, 235–237.
- Baseigs, J., and Mendelsohn (1994) *J. Pharmacol. Ther.* **64**, 127–154.
- Billings, P. C., Morrow, A. R., Ryan, C. A., and Kennedy, A. R. (1989) *Carcinogenesis* **10**, 687–691.
- Kennedy, A. R. (1994) *Cancer Res.* **54**, (suppl.) 1999–2005.
- Kennedy, A., Beazer-Barclay, Y., Kinzler, K. W., and Newberne, P. M. (1996) *Cancer Res.* **56**, 679–682.
- Hass, J. M., and Ryan, C. A. (1981) *Methods Enzymol.* **80**, 778–791.
- Molina, M. A., Avilés, F. X., and Querol, E. (1992) *Gene (Amst.)* **116**, 129–138.
- Molina, M. A., Marino, C., Oliva, B., Avilés, F. X., and Querol, E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21467–21472.
- Marino, C., Molina, M., Canals, F., Avilés, F. X., and Querol, E. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 632–637.
- Clore, G. M., Gronsbom, A. M., Nüges, M., and Ryan, C. A. (1987) *Biochemistry* **26**, 8012–8023.
- Rees, D. C., and Lipscomb, W. N. (1982) *J. Mol. Biol.* **160**, 475–498.

³ C. Blanco, M. A. Molina, M. L. Frazier, and R. de Llorens, manuscript in preparation.

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	springgsd	3				3,4	499950

30. McDonald, N. Q., and Hendrickson, W. A. (1993) *Cell* **73**, 421-424
31. Sun, P. D. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 269-291
32. Ling, S. L., and Nussinov, R. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 835-837
33. Roussel, A., and Cambillau, C. (1991) *Silicon Graphics: Directory*, Silicon Graphics, Mountain View, CA
34. Oliva, B., Bates, P., Querol, E., Aviles, F. X., and Sternberg, M. J. E. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 814-830
35. Donato, N. J., Ince, C., Rosenblum, M. G., and Gallick, G. E. (1989) *J. Cell. Biochem.* **41**, 139-157
36. Peles, E., Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D., and Yarden, Y. (1993) *EMBO J.* **12**, 961-971
37. Parker, S. L., Tong, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. (1996) *CA-Cancer J. Clin.* **65**, 5-27
38. Ryan, C. A., Hass, G. M., and Kuhn, R. W. (1974) *J. Cell. Biochem.* **249**, 5495-5499
39. Derynck, R. (1988) *Cell* **54**, 593-595
40. Dean, C., Modjtahedi, H., Eccles, S., Box, G., and Styles, J. (1994) *Int. J. Cancer* **8**, (suppl.) 103-107
41. Merlino, G. T., Xu, Y., Ishii, S., Clark, A. J., Semba, K., Toyoshima, K., and Yamamoto, K. (1984) *Science* **224**, 417-419
42. Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988) *Biochemistry* **27**, 3113-3119
43. Schweitzer, R., Howes, R., Smith, R., Shilo, B.-Z., and Freeman, M. (1995) *Nature* **376**, 699-702
44. Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N., and Mendelsohn, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 1897-1905
45. Fish, E. N., Ghisla, J., Trogadis, J., and Stevens, J. K. (1993) *Cancer Res.* **53**, 5148-5157
46. French, A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S. K., and Laußenburger, D. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4334-4340
47. Canals F. (1992) *Biochemistry* **31**, 4493-4501

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	4 Color Figure(s)	ARTNO:
1st disk, 2nd K82	sonracsd	3	PROOF			3.4	499950

1

**DISULPHIDE-BRIDGE TOPOLOGY AS A TOOL FOR CHARACTERISING
PROTEIN STRUCTURE/FUNCTION RELATIONSHIPS.**

J. M. Mas¹, P. Aloy¹, B. Oliva¹, C. Blanco², M. A. Molina², R. Llorens²,
E. Querol¹ and F. X. Avilés^{1*}.

¹Institut de Biologia Fonamental i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. Spain.

²Unitat de Bioquímica, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, 17071 Girona, Spain.

Keywords: Disulphide bonds. Protein structure. Protein classification. Protein taxonomy.

*** Corresponding author:**

Dr. Francesc X. Avilés

Institut de Biologia Fonamental

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra, Barcelona. Spain

Phone : 34-3-5811315

Fax : 34-3-5812011

Mail: fx.aviles@blues.uab.es

ABSTRACT

A program, Knot-Match, for the automated classification of proteins by their disulphide-bridge topology has been designed. A protein classification has been performed by two clustering procedures, Density Search and Hierarchical Clustering Techniques, on a set of non-redundant PDB three-dimensional structures with a sequence identity lower than 65%. Proteins with three or more disulphides can be grouped by their preferences for certain disulphide-bridge topologies into seven main classes, with each class built up from several clusters. The automatically clustered proteins, although coming from different functional families, show structural and/or functional relationships among them. Besides the disulphide bridges, regular secondary structures and loops frequently become correctly aligned. Although the lack of significant sequence similarity among clustered proteins precludes the establishment of clear, evolutionary distant relationships, the program permits us to find out important structural or functional residues upon the superimposition of two protein structures which were previously weakly related or apparently unrelated. As examples, members of the largest cluster, which contains outstanding families of disulphide-rich proteins, such as EGF-like, Defensin-like and Plant protease inhibitors, have been deeply analysed upon disulphide-bridge overlapping. It has been found that amino acids which have been experimentally determined to be structural and functional key residues for these proteins, are conserved and overlapped in the three-dimensional structure even in members of these families with very low sequence similarity and with substantially different overall fold. Therefore, the program and the derived classification is very useful for finding relationships among proteins which would be hidden from the current sequence-similarity algorithms.

INTRODUCTION.

Sequence database searching has been used as a powerful tool in molecular biology because hints in protein structure and function can be inferred from it. Searches based upon efficient alignment algorithms are applied routinely to any newly deduced protein sequence (for a review, see Bork et al., 1994). A similar scenario can be envisaged for three-dimensional structure comparisons. The rate at which new structures are being obtained exceeds one per day as a result of recent advances in crystallography and NMR spectroscopy. More and more frequently, a newly determined three-dimensional (3D) structure is similar in fold to a known one, even when no sequence similarity is detectable. On the other hand, given that the 3D structure is highly conserved in protein evolution (Chothia & Lesk, 1986; Rost, 1997), comparison of 3D structures permits us to establish relationships between protein families which would appear inexistent or distinct upon the basis of sequence alignment, unifying two or more families into one superfamily or discovering biologically interesting relationships (Bork et al., 1992; Pascarella & Argos, 1992 a and b; Holm et al., 1993 and 1994; Sun & Davies, 1995).

Protein 3D comparison requires the superimposition of the corresponding structures. There are a very large number of ways in which one could match backbone atoms, from any pair of proteins, and an extensive computational analysis is still unfeasible with today's computers. Early computer methods required manual initial alignment and were very slow or limited to close homologues (Rossmann & Argos, 1976; Matthews & Rossmann, 1985; Taylor & Orengo, 1989; Zuker & Somorjai, 1989). A new generation of search algorithms based upon simplified approaches has been developed in the last

few years, the most efficient of which allowing fully automated and rapid similarity searches through an entire database. These computer methods for structural alignment are very useful in creating and developing a classification of the building blocks of protein structure (Vriend & Sander, 1991; Pascarella & Argos, 1992b; Orengo et al., 1992; Alexandrov et al., 1992; Holm et al., 1992, 1993 and 1994; Holm & Sander, 1996; Russell et al., 1997). However, comparison and classification of proteins having low sequential similarity or lacking regular secondary structures still results very difficult and, the development of new efficient tools for the structural alignment of these proteins is necessary (Johnson et al., 1994; Srinivasab et al., 1996).

Disulphide-containing proteins constitute a large group for which the development of tools for the 3D structural alignment and topological analysis is required, especially in the case of disulphide-rich proteins because the high content in disulphide quite probably affects their fold and topological tendencies (Chatrenet & Chang, 1992; Chang et al., 1994 and 1995). An important group of these is formed by those small-sized and with little or no regular secondary structures, in which the disulphides are indispensable for their structure and function (Betz, 1993; Hrabal et al., 1996). In this context, it has been previously suggested that common structural/functional features among proteins can be inter-related through the analysis of their disulphide bridges (Murray-Rust et al., 1993; Sun & Davies 1995; Vita et al., 1995). This led to some attempts to establish a classification of disulphide-rich proteins by means of cystine geometry (Harrison & Sternberg, 1994 & 1996), disulphide-bridge connectivity and others (Thornton 1981; Richardson 1981; Srinivasan et al., 1990).

This work shows a novel computer-based program and method to study

disulphide bridge topologies in proteins and to perform an automatic classification of the latter, facilitating the comparison of the 3D structures. An initial classification of proteins containing more than two disulphides is performed. Several structural classes are defined, establishing relationships previously hidden among remotely homologous or sequentially non-homologous protein families.

RESULTS

The use of intramolecular geometrical relationships to describe protein structures has the advantage of being independent of the co-ordinate frame (Sali & Blundell, 1990; Subbadao & Haneef, 1991; Vriend & Sander, 1991; Holm & Sander, 1993). In this study, structure comparison has been attempted using the disulphide bridges as primary units. Structural descriptors, such as virtual distance and virtual angles involving C_{α} of the disulphide-bonded Cys residues, form the basis for structure comparison. A non-redundant set of proteins (with less than 65% sequence identity) containing three or more disulphide bonds have been chosen for structure comparison (Hobhom et al., 1992; Hobhom & Sander, 1994). The structures are compared using a KNOT-MATCH program, and they are clustered by two different techniques (see later and/or Methods and Algorithms). The approach is simple and the combination of various tools to detect similarities is novel. Similarities in the scaffold, in the regular secondary structures and in important structural/functional residues have been found and examined in proteins clustered in our classification. The classification shows that disulphide bridge topologies are conserved structural motifs among proteins.

Classification of disulphide-containing proteins by means of KNOT-MATCH.

A classification of PDB proteins with at least three disulphide bridges has been achieved using the two clustering techniques: first, a Density Search Technique has been used for grouping the proteins into clusters; second, a Hierarchical Technique was able to group these clusters into classes (Figures 1 and 2). Structural and functional approaches and family definitions available in SCOP (Murzin *et al.*, 1995) have been used upon the selection of classes to build up a dendrogram (Classification Tree, Figure 1). In some cases, classes were split into subclasses for a better analysis of the results. The grouped proteins show a very similar topologic equivalence of disulphide bridges (TE-SS), with very small ssRMSD (see Methods and Algorithms). Sixty clusters were obtained by the first approach, fifteen of them containing more than one protein (70% of the initial set). Eleven out of these fifteen include only proteins with the same fold type and belong to the same functional family. By visual inspection of the dendrogram, seven different classes can be distinguished. Classes A to G are branched off into several groups with higher TE-SS relating the clusters. We have considered those proteins with ssRMSD under 2.6 Å (ssRMSD of cluster 3, which is taken as standard limit) to be structurally related by the disulphide topology.

Classes A to F are mainly formed by proteins with larger numbers of residues than proteins included in Class G. Proteins of the former classes often have enzymatic activities and are rich in regular secondary structures. Otherwise, Class D2 is formed by small proteins (Insulin-like family and Kringle Modules), functionally and/or structurally related with some of the proteins of Class G, although the disulphide bridges are different. Finally, Class G is composed of 66 proteins where the main cluster is Number 3. This

cluster is formed by 64 proteins with high TE-SS (ssRMSD = 2.6Å). Most of them are small proteins (85%) with few or no regular secondary structures, their fold being mainly organised around three or four disulphide bridges. A large number of proteins included in this cluster are growth factors, hormones, enzyme inhibitors and venoms. We have also found in cluster 3 some proteins with a large number of disulphide bridges and higher secondary structure content. Seventeen different folds are involved in the cluster and five of them (Cysteine-knot Cytokines, Epidermal Growth Factor-like, Small Inhibitors, Toxins and Lectins, Snake Toxin-like and Defensin-like) represents more than 50% of the total set of this cluster. In fact, this cluster is mainly formed by the known β -disulphide topology and by members of the T-knot family already studied by other authors (Narasimham et al., 1994; Isaacs, 1995; Sun & Davies, 1995; Harrison & Sternberg, 1996).

Analysis of the derived Classification.

Almost of all the proteins in the same family are grouped into clusters or classes with low ssRMSD values, most of the homologous proteins being clustered together (Russell & Barton, 1994; Murzin et al., 1995; Russell et al., 1997). However, remote homologous, analogous and non-related proteins can also be grouped by KNOT-MATCH within the same cluster or class. An example of this situation is shown in Cluster 3 (Class G) for the Snake Toxin-like fold. This fold is represented by two different families: the Snake Toxin-like, (with six representative homologous proteins), and Dendroaspin (with one representative). This last protein is analogous to the above-mentioned Snake Toxin-like, according to the homologous and analogous definitions described in the literature (Russell et al., 1997). In addition, Cluster 3 is formed by twenty-eight families with different folds and, consequently, non-related proteins under the criteria of SCOP.

Comparison Between Classes.

Although it could be expected that homologous proteins of the same functional family or with a similar fold were joined within the same disulphide topological class, it is remarkable that there are cases in which they are split into different classes or subclasses. Moreover, some proteins with more than three disulphide bridges may be representatives of more than one topological class producing a structural/functional overlap of classes. The following examples describe some of these paradoxes:

i) Cluster 5 (in Subclass D1) and Cluster 1 (in Class E) are split in the dendrogram of Figure 1 with ssRMSD larger than 8 Å, but all of the proteins belonging to these groups are Serine Proteinases. When analysing each protein in detail, it is noticed that the members of Cluster 5 are vertebrate proteins, while those of Cluster 1 are from fungus or worms. However, γ -Chymotrypsin A (3gctA) can enter into both clusters by using different combinations of disulphide bridges (it has more than three disulphides), which means different topologies.

ii) Subclasses F2 and F3 include proteins with the same fold type: Papain-like, which the algorithm divided into two different subclasses. Nevertheless, it can be observed that they arise from quite distant taxonomical organisms, kiwi or papaya for the case of F3 subclass and human for the F2 subclass.

Structural/Functional relevance of Disulphide-Bridge Topology.

In order to evaluate the structural/functional relevance of disulphide-bridge topology, several structural and functional relationships between proteins of some families of Cluster 3 (Class G) -the most populated one- have been

studied in more detail. They have been overlapped by means of their disulphide-bridge topologies, and side-chains and backbones have been compared to obtain relationships. A number of matches obtained in the 3D space have been contrasted with experimental results reported in the literature.

Relationships between members of different families in a cluster.

The protein scaffold has been studied for several families included in Cluster 3. Although proteins from this cluster have different structures and functions, an important group of them have some structural similarities in backbone regions. These similarities have been analysed by visual inspection using Turbo FRODO (Roussel et al., 1994). Alternatively, when the superimposed structures involve loops, they have been compared and analysed using the ArchType program for the automatic classification of loops (Oliva et al., 1997). In particular, the Potato Carboxypeptidase Inhibitor (PCI), a plant protease inhibitor, has been taken as a reference structure for such comparison given that it constitutes a family only formed by itself in the selected PDB. It is worth mentioning that extensive structural and functional information about this protein has been previously obtained (Oliva et al., 1991 a & b; Avilés et al., 1993; Molina et al., 1994, Oliva et al., 1995). Firstly, we would like to emphasise that several proteins of Cluster 3 have a similar region to the C27-C34 loop of PCI as, for example, scorpion toxins (1agt and 2crd). The RMSD between loops K27-H34 and K27-R34 of 1agt and 2crd and loop C27-C34 of PCI is about 0.7 Å. The D63-T7 loop of coagulation factor X -1ccf- also shows an RMSD of 1.8 Å versus the C27-C34 loop of PCI. Other families, such as the EGF-like family, also have similarities with this PCI loop; for example, loop H22-Y29 of EGF versus this PCI loop shows an RMSD of 0.7 Å. Another PCI loop, C18-C24, has equivalent regions in

other proteins such as loop K47-C54 from snake venom toxins -1coe- (RMSD of 0.6 Å) and the coagulation factor X -1ccf- from the EGF-like family (RMSD of 0.5 Å).

On the other hand, the comparison between chemically equivalent side-chain groups in the space has also been studied for proteins of Cluster 3. In particular, the location of similar residues in 3D space for the EGF-like family and for the above-mentioned PCI has been compared. This is a good example of two different families with a similar disulphide-bridge topology and loops which, in spite of the different sequential order of cystines, different functions and different dispositions of regular secondary structures, present a precise match of important functional residues in specific locations characteristic of the EGF-like family (Figure 3). Ten locations which conserve the physico-chemical properties of the involved residues have been found in both molecules. Four of them have a strong correlation between PCI and all members in the EGF family within this cluster. All of these locations have been described as structurally or functionally important, either for PCI or for EGF (Rees & Lipscomb, 1982; Brown *et al.*, 1989; Brown & Wüthrich, 1992; Montelione *et al.*, 1992; Ullner *et al.*, 1992; Groenen *et al.*, 1994; Nogata *et al.*, 1994; Picot *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1994; Barbacci *et al.*, 1995; Jacobsen *et al.*, 1996; McInnest *et al.*, 1996).

Relationships between members of the same family in a cluster.

Two large families of Cluster 3 have been selected for a more in-depth analysis: the EGF-like family and the Defensin-like family, previously defined by SCOP (Murzin *et al.*, 1995). Proteins in each of these families show low sequential homology within themselves, in spite of belonging to the same disulphide topology cluster. Proteins from both families have been

independently compared after disulphide bridge superimposition (Figure 4). By visual inspection, the location of relevant and homologous side-chain chemical groups has been established. It is worth mentioning that many residues from distinct members of each family conserve related physico-chemical groups in similar positions of 3D space, these residues being described as functionally important elsewhere. In this sense, 7 amino acid locations have been found as consensus (percentage of appearance greater than 55%) upon superimposition of the members of the Defensin-like family (Hill *et al.*, 1991) and 15 in the case of the EGF-like family. Figure 4 shows amino acid residues from the EGF-like family which, from experimental data, i.e., by site-directed mutagenesis, have been unambiguously related to function (Groenen *et al.*, 1994; Nogata *et al.*, 1994; Barbacci *et al.*, 1995; McInnest *et al.*, 1996). Other conserved positions are more related to structure than function (as Pro37 of EGF) or more probably its functional role is still unknown.

DISCUSSION

The increasing number of known tertiary structures makes it useful and necessary to design methods for protein structure comparison, paralleling those of sequence alignment. This is because the resemblance of protein 3D structures can provide clues upon structural and functional properties or evolving trends previously hidden from current sequence-alignment algorithms. An example of using structure for obtaining hints upon function is the product of the *Obese* gene which, upon modelling, has been predicted to be a helical cytokine, thus having important biological and clinical consequences (Madej *et al.*, 1995). Here, a method and a program, KNOT-

MATCH has been developed, designed to automatically classify proteins by their disulphide-bridge topology, which facilitates further studies of their structure and function. Although other approaches and classifications based upon disulphide bridges have been previously reported (Richardson, 1981; Thornton, 1981; Harrison & Sternberg, 1996), our procedure does not additionally require the presence of regular secondary structures in the proteins (Harrison & Sternberg, 1996) or the knowledge of the sequence of linked cysteines (Richardson, 1981; Thornton, 1981) to perform the analysis, and it only relies upon the topology of their disulphide bridges. Therefore, in order to compare similarities between two proteins, neither the connectivity nor the relative positions of Cys (i and j) of the Cys(i)-Cys(j) disulphide are considered, a fact which allows the versatile detection of similar spatial positioning of cysteine residues even in the absence of similar disulphide disposition in sequence. This feature of the KNOT-MATCH program and its analysis of disulphide-bridge topologies could have particular value where the disulphide bond connectivity may be ambiguous.

The KNOT-MATCH program is user-friendly and can be handled by inexperienced users to identify from the PDB a sorted list of proteins with similar disulphide-bridge topology than a given one. Moreover, it allows us to split a series of proteins from an initial set -i.e, a functional family- into groups or clusters with different disulphide-bridge topologies. The program also facilitates a disulphide-based 3D overlapping of proteins to visualise them with a graphical program or to perform other computer-based analyses.

The preferential occurrence of certain disulphide-bridge topologies has been observed when the program has been applied to a non-redundant database of proteins with more than two disulphides. It has been investigated

whether these preferences can be used to group proteins and to study the possible relationships among them. The criteria for splitting proteins into classes was the particular disulphide-bridge topology and the functional and structural features of the proteins in each class. These classes contain proteins of different families although it is very common to find all members of a family in one class as, for example, the Phospholipase A2 family in Class A or EGF-like family in Class G. The classification relates proteins classified by other authors into overlapping fold families defined by conventional protein classifications (Murzin et al., 1995; Orengo et al., 1997). In our opinion, the latter conventional classifications are unable to deal with disulphide-rich proteins, especially for small proteins with low content in regular secondary structures, as previously observed by Harrison & Sternberg (1996) with their approach. These proteins often are obviated or specially treated in traditional approaches for protein classification. For example, proteins such as 1bnb, 1dec, 1dfnA, 1erp, 1mtx, 1pnh, 1prhA, 2crd, among others, are not catalogued by automatic methods like CATH (Orengo et al., 1997) probably because they have not got a large enough number of residues. Nevertheless, it has been possible to automatically classify them into different groups using our approach. Taking into account the information about their structure and function (Murzin et al, 1995; Orengo et al., 1997; Bernstein et al., 1977) each one of them has been grouped with related proteins. This is the case of -1dfnA-, which is included in Cluster 3 (Class G) with the rest of the defensins. It has also been shown that in many cases the superimposition by disulphide-bridge topology allows for a correct alignment of regular secondary structures even when proteins from different families, but with related folds, are compared (i.e., when comparing PCI and EGF or PCI and defensins). In this respect, it should also be mentioned that preferences for a certain disulphide-bridge topology may be useful in structure prediction (Cohen et al., 1989) for

filtering some of the matches in fold-recognition procedures (Rufino & Blundell, 1994; Murzin et al., 1995; Orengo et al., 1997). This could be an additional application of our program or related ones.

Structural comparisons of members of the same families show that the disulphide-bridge topology can be useful in aligning important residues for proteins within these families and expanding this alignment to members of related families in the classification. A good example is found for the T-Knot motif (Narasimhan et al., 1994; Sun & Davies, 1995; Isaacs, 1995). Several authors have described the T-Knot structural motif as an intrinsic, linked pattern between cysteines in a given protein sequence (1-4, 2-5 and 3-6) (Lin & Nussinov, 1995). The definition given for some of these proteins by other authors (Harrison & Sternberg, 1996) is based upon the known disulphide β -cross, which is represented by two disulphide bridges and a β -sheet. In contrast, our approach is based upon the topology of three disulphide bridges, without taking into account either the linkage pattern or the presence of one β -sheet. It is worth mentioning that there are a larger number of proteins simultaneously defined as T-knot by our approach. For example, EGF and PCI, which have been grouped together by our methodology, do not have a common pattern of linked cysteines (1-3, 2-4, 5-6 for the EGF and 1-4, 2-5, 3-6 for the PCI). Moreover, EGF has a β -sheet (Sun & Davies, 1995), and PCI lacks this secondary structure (Rees & Lipscomb, 1982). Nevertheless, some loops of both proteins are similar and present several residue locations conserved in the space (see Results). Our definition/detection of T-knot motif could be complementary to the approaches given by other authors, and even more general.

The lack of sequence similarity does not allow us to establish a clear evolutionary relationship of many protein groups clustered by our approach and in our classification. To what extent are the proteins of a cluster related in an evolutionary way or, on the contrary, do they represent a case of structural convergence? We cannot provide an answer for now. Most of the groups obtained contain homologues (proteins with a high percentage of sequential identity) or remote homologues (at around 11% of sequence identity), likely to be the result of evolutionary divergence (same superfamily), but analogues (proteins with the same fold belonging to different superfamilies) and even apparently unrelated proteins to be grouped with them were also found. This agrees with the analysis performed by Rost (1997) aligning protein structures, which shows that only 3-4% of all residues can be considered crucial for protein structure and function (anchor residues). It has been suggested that some of the disulphide-bridge topologies may have diverged from a common ancestor, such as the small and large α and β scorpion toxin fold (Harrison & Sternberg, 1996). However, most of the structural relationship between proteins related by disulphide topology may be explained by universal structural rules, preferences for close cysteine packing or kinetics effects in the folding process (Harrison & Sternberg, 1996). In any case, comparative taxonomy of protein structures are useful for gaining insight into evolutionary relationships.

Do the proteins of the clusters shown in Figures 1 and 2 share functional characteristics? Most of them are eukaryotic extracellular hydrolases and inhibitors, toxins, hormones and growth factors and, in general, proteins whose functional category could be classified as cell-to-cell recognition, cell signalling, cell defense, etc., that is functions not devoted to basic metabolism. This category of proteins is prone to shuffling and sharing entire

domains (for example there are several kringle modules on the list). In any case, a number of them share at least the disulphide-bridge core. It is probable that our clusters encode more structural and functional relationships which escape our analysis and interpretation and that likely will be further disclosed when improved algorithms and experimental data will be available. It should be noted that many of these proteins are targets for biotechnological applications. The knowledge of the common determinants of its 3D structure and fold -where the disulphides play a key role- may facilitate the rationale for its redesign and minimisation, a clear biotechnological goal.

As stated above, one of the potential merits of the programs for protein structure superimposition is that they can find unsuspected structural relationships, which can lead to the discovery of important functional properties. This could be the case of PCI, the potato carboxypeptidase inhibitor, which we have above shown that it shares a similar three-dimensional distribution in certain amino acid residues with growth factors which are functionally important for these. This suggests that PCI -a molecule with unknown function *in vivo*- could play a peptide hormone/ growth factor-like role in plants, like other small disulphide-rich proteins, especially a plant insulin-like 38-mer peptide (Watanabe et al., 1994). Overall, this could imply that the design of novel algorithms for structure superimposition, based upon disulphides, can be helpful in the assignment of potential functions to proteins, an issue of great interest nowadays. Finally, a general conclusion is that the present, and elsewhere-reported methods for protein classification based upon structure superimposition can further reduce the threshold of 25%-30% of pairbase sequence identity used in sequence-alignment algorithms as being indicative of a structural/functional relationship between proteins, this being reduced to some selected residues in specific positions.

METHODS AND ALGORITHMS

The set of proteins

The set of proteins used for this analysis and classification here performed is extracted from the whole PDB (Hobohm et al., 1992; Hobohm & Sander, 1994), reducing the number of proteins by means of:

a) Removal of redundant structures, and those of less than 30 residues and a 3D resolution lower than 3.5 Å. The set of protein structures corresponding to the non-redundant PDB at 65% of sequential homology has been used for such approach (Hobohm *et al.*, 1992; Hobohm & Sander, 1994). The non-redundant database was obtained from World Wide Web (<http://www.embl-heidelberg.de>) and dated in 1996.

b) Removal of proteins with less than three disulphide bridges. Three is the most frequent number of disulphide bridges in proteins with known 3D structures (Thornton, 1981). Proteins with more than three cystines has been classified using the best possible alignment of three of its disulphide bridges. Nevertheless, the program can be used for those with two or more disulphide-bridges.

Topology of three-disulphide bridge knots.

We wish to define the three-disulphide bridge knot of a protein independently of the sequence orientation (from N terminus to C terminus or viceversa) . This implies that one disulphide bridge has to be described as a segment with no orientation (beginning and end of a vector) in the three-dimensional space. Therefore, the segment which defines one disulphide

bridge is characterised by the co-ordinates in cartesian space (\mathbf{R}^3) of both ends. The C_α co-ordinates of each cysteine residue forming the disulphide bridge are taken as the end co-ordinates which define the segment. As a consequence, a vector in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ space describes one disulphide-bridge segment. The "i" disulphide vector of protein A is defined in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ as $r_{C_\alpha}^{SS(A,i)} = (x, y)$, where "x" and "y" are the C_α co-ordinates of the cysteine residues which form the disulphide bridge.

The comparison between topological knots formed by three disulphide bridges has to be performed in cartesian space, therefore, the transformation between both spaces $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ and \mathbf{R}^3 has to be constructed. This implies some mathematical definitions in the $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ space:

1. Scalar product: The scalar product in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ of two vectors $a = (a_1, a_2)$ and $b = (b_1, b_2)$ is defined as:

$$\langle a | b \rangle = \langle a_1 | b_1 \rangle + \langle a_2 | b_2 \rangle$$

where $\langle | \rangle$ defines the scalar product in \mathbf{R}^3 .

2. Rotation: Let T be a rotation transform in \mathbf{R}^3 space ($T: \mathbf{R}^3 \rightarrow \mathbf{R}^3$).

Therefore, the extension in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ space is given by T' , where:

$$\begin{aligned} T' : \mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3 &\rightarrow \mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3 \\ T'(x, y) &= (T(x), T(y)) \end{aligned}$$

3. Distance: The distance of a vector x in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ is defined as

$$|x| = \sqrt{\langle x | x \rangle}$$

With these definitions the rotation of a set of disulphide-bridge segments of

one protein can be obtained from the rotation in \mathbf{R}^3 space of the whole protein. Therefore, the superimposition and RMSD between two proteins can be extended to three-disulphide bridge knots of two proteins by representing each disulphide bridge as vectors in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ space.

The next problem in the task of comparing the knot topologies of two proteins appears when one (or both) protein(s) has/have more than three disulphide bridges. For such a task it is necessary to choose the best set of disulphide bridges forming the three-disulphide bridge knot. This comparison is done by calculating the RMSD of the $C\alpha$ atoms defining the disulphide bridge segments of the knot topology. Due to the number of disulphide bridges, larger than three, each combination of three-disulphide bridges for each protein has to be checked. The best set of three-disulphide bridges for two proteins is the one for which the RMSD of $C\alpha$ atoms is the smallest. An algorithm to obtain this RMSD value has been developed.

Assuming a set of N disulphide-bridges for protein A, this is $S_{A_N}^i = \{ r_{C_\alpha}^{SS(A,i)} \}_{i=1..N}$, and N for protein B, this is $S_{B_N}^j = \{ r_{C_\alpha}^{SS(B,j)} \}_{j=1..N}$, we define the $cRMS(S_{A_N}^i, S_{B_N}^j)$ as:

$$cRMS(S_{A_N}^i, S_{B_N}^j) = \min \left\{ x \in R; x = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^3 \left| \overline{\overline{R}}' (r_{C_\alpha}^{SS(A,a(k))}) - r_{C_\alpha}^{SS(B,b(k))} \right|^2}{6}} \quad \forall \overline{\overline{R}}' \right\}$$

where $\overline{\overline{R}}'$ is the extension in $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$ of the rotation transform $\overline{\overline{R}}$ in \mathbf{R}^3 and $a(k)$ and $b(k)$ are a chosen combination of three-disulphide bridges of protein A and B, respectively.

We define the set of RMSs, $\mathfrak{S}_N^{A,B}$, as:

$$\mathfrak{S}_N^{A,B} = \left\{ x; x = \text{cRMSD}(S_{A_N}^i, S_{B_N}^j) \forall \text{ combining sets } S_{A_N}^i \text{ and } S_{B_N}^j \right\}$$

The calculation of $\mathfrak{S}_N^{A,B}$ involves all possible combinations of disulphide bridges of the two proteins to compare, taking into account that each pair of disulphide bridges presents two different manners to locate its four cysteines (parallel and antiparallel). This allows the superimposition of the disulphide-bridge segments, neglecting of the sequence orientation, by means of the superimposition in \mathbf{R}^3 of its ends.

This procedure implies that the number of calculations and the computer time increase exponentially with the number of disulphide bridges. To prevent this, a strategy was designed which allows the removal of those comparisons with high RMS. Therefore, $\mathfrak{S}_N^{A,B}$ is reduced to a new set $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B} \subseteq \mathfrak{S}_N^{A,B}$ defined as:

$$\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B} = \left\{ x; x \in \mathfrak{S}_N^{A,B}, \text{ such that } \forall y \in \mathfrak{S}_N^{A,B} \Rightarrow x \leq y \right\}$$

where the total number of elements in $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B}$ is obliged to be smaller than 30.

The $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B}$ set can be constructed by means of a comparative analysis of the disulphide-bridge segments, avoiding the calculations of all $\text{cRMS}(S_{A_N}^i, S_{B_N}^j)$. The algorithm to reduce the number of calculations is based upon the Basic Interatomic Distance Matching method (Taylor & Orengo, 1989), applied to the internal co-ordinates defined by a pair of disulphide bridges.

The internal co-ordinates for locating the disulphide bridges of a protein are obtained from each disulphide bridge segment being considered as a vector in \mathbf{R}^3 . This vector is taken as $v_i = x - y$ where, $(x, y) = r_{C_a}^{SS(A,i)}$. The set of disulphide-bridge segments of a protein is grouped into pairs of disulphide bridges. After that, angles and distances (internal co-ordinates) between these cystine pairs were calculated (see Figure 5). The results of these calculations are stored in a square matrix which contains the information of the internal co-ordinates for the comparison between pairs of disulphide bond segments. This matrix, named $\bar{S}_{i,k}$, is defined according to the Basic Interatomic Distance Matching method, each element in the matrix being :

$$S_{i,k} = \sum_{m=1}^N \frac{A_d}{\left(\left| \frac{d_{i,i+m}^A - d_{i,i+m}^B}{\max_d} \right| + B_d \right)} + \frac{A_\alpha}{\left(\left| \frac{\alpha_{k,k+m}^A - \alpha_{k,k+m}^B}{\max_a} \right| + B_\alpha \right)}$$

where $S_{i,k}$ is the calculated value of similarity for the comparison of the cystine pair (i) in protein A and the cystine pair (k) in protein B. "d" and "a" are, respectively, the values of distances and angles for each disulphide-bridge pair (see Figure 1), "max_d" (57.0 Angstroms) and "max_a" (π radians) being the maximum expected values for distance and angles. "A_d" and "A_a" allows us to establish the ratio of distance/angle (values of 75.0 and 25.0, respectively, were used). Finally, "B_d" and "B_a" prevent errors of dividing by zero, and their best estimated value is 1.0.

Any pair of cystines with good structural similarity between two proteins (large value) is identified from matrix $\bar{S}_{i,k}$. For proteins with a low number of

cystines the whole set $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B}$ can be computed, but for a high number of disulphide bonds only the 30 disulphide-bond segments with the highest score of each protein, set $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B}$, have been chosen from matrix $\bar{\mathfrak{S}}_{i,k}$. Only those combinations of three-disulphide bridges of proteins A and B, using the disulphide bond segments which give the highest 30 similarity values identified in $\bar{\mathfrak{S}}_{i,k}$, are taken into account to calculate $\bar{\mathfrak{S}}_N^{A,B}$, therefore reducing the total number of combinations.

Clustering of disulphide-bridge knots.

A double-clustering technique has been used. First, a Density Search Technique (DST) (Everitt, 1974) was applied to group proteins by the elements of $\bar{\mathfrak{S}}_3^{A,B}$ between each pair of proteins in the group. For a clustered group of proteins the relation between two proteins (A & B) is not given by the minimum in $\bar{\mathfrak{S}}_3^{A,B}$ but rather by the element in $\bar{\mathfrak{S}}_3^{A,B}$ for which the superimposition of cysteines gives the smallest RMSD value when A and B are compared with themselves and with the rest of the proteins in the cluster. The average of the chosen elements in $\bar{\mathfrak{S}}_3^{A,B}$ (\forall A and B in the cluster) is defined as ssRMSD. This is done by iteration upon each new member in the cluster. Applying the DST method, a new member was accepted in the cluster only if this did not shift the cluster centromer over the limit chosen. To make this classification, a 0.3 Å cut-off was used as the limit because a lower tolerance within this limit would produce many small clusters, whilst a higher limit value would produce a small number of large clusters with a large number of disulphide-bridge topologies. The smallest cluster was obliged to contain at least three proteins to be considered by the DST.

A Hierarchical Technique (HT) (Everitt, 1974) was used to calculate the relationships between the groups defined by Density Search as a second clustering technique. The method uses a square matrix with all ssRMSD between the DST clusters and the individual, ungrouped proteins. This gives rise to a dendrogram which allows us to classify proteins using the topologic information of the disulphide-bridge knot. This dendrogram has been used for grouping the set of proteins into several classes.

Program

The program KNOT-MATCH runs in Silicon Graphics computers and is available from the World Wide Web (WWW) by ftp. The ftp site is: <ftp://luz.uab.es/pub/Knot-Match>.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been supported by Grants BIO95-0848, BIO97-0511, and IN94-0347 from the CICYT (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain) and by the CERBA (Centre de Referència en Biotecnologia) de la Generalitat de Catalunya. J. M. Mas is a pre-doctoral fellowship recipient of the CIRIT-CERBA (Generalitat de Catalunya). The authors gratefully acknowledge Drs. T. Blundell and R. Sowdhamini (University of Cambridge) and Dr. M. J. E. Sternberg (Imperial Cancer Research Fund, London) for their critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

REFERENCES

- Alexandrov, N. N., Takahashi, K. & Go, N. (1992) Common spatial arrangements of backbone fragments in homologous and non-homologous proteins. *J. Mol. Biol.* **225**: 5-9.
- Avilés, F. X., Vendrell, J., Guash, A., Coll, M. & Huber, J. (1993). Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and the activation process. *Eur.J. Biochem.*, **211**, 381-389.
- Barbacci, E.G., Guarino, B.C., Stroh, J.S., Singleton, D.H., Rosnack, J.K. & Moyer, J.D., (1995). The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J. Biol. Chem.* **16**, 9585-9589.
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanovich, T., & Tasumi, M. (1977). The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.
- Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci.* **2**, 1551-1558
- Bork, P., Ouzounis, C. & Sander, C., (1994). From genome sequences to protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 393-403.
- Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7290-7294.
- Brown, S.C., Mueller, L. & Jeffs, P.W. (1989). ¹H assignment and secondary structure of human transforming growth factor α . *Biochemistry*, **28**, 593-599.
- Brown, L.R. & Wüthrich, K. (1992). Nuclear magnetic resonance solution structure of the α -neurotoxin from Black Mamba. *J. Mol. Biol.* **227**, 1118-1135.

- Chatrenet, B. & Chang, J. (1992). The folding of hirudin adopts a mechanism of trial and error. *J. Biol. Chem.* **267**, 3038-3043.
- Chang, J., Canals, F., Shindler, P., Querol, E. & Avilés, F.X. (1994) The disulfide folding pathway of potato carboxypeptidase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **269**, 33087-33094.
- Chang, J., Shindler, P., Ramseier, U. & Lai, P. (1995). The disulfide folding pathway of human epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **270**, 9207-9216.
- Chothia, C. & Lesk, A.M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**, 823-826.
- Cohen, F. E., Gregoret, L., Presuell, S. B. & Kuntz, I. D. (1989). Protein structure prediction: new theoretical approaches. **289**, 75-85.
- Everit, B (1974) *Cluster analysis*, chapt. 3,. Heinemann Educational Books Ltd. London.
- Groenen, L.G., Nice, E.C. & Burgess, A.W. (1994). Structure-function relationships for the EGFT/TGF- α family of mitogens. *Growth Factors*, **11**, 235-257.
- Harrison, P. M. & Sternberg, M. J. E. (1994). Analysis and classification of disulphide connectivity in proteins. The entropic effect of cross-linkage. *J. Mol. Biol.* **244**, 448-463.
- Harrison P. & Sternberg M.J.E. (1996) The disulphide β -cross: from cysteine geometry and clustering to classification of small disulphide-rich protein folds. *J. Mol. Biol.* **264**, 603-623.
- Hill, C.P., Yee, J., Slested, M.E. & Eisenberg, D. (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Mechanism of membrane permeabilization. *Science*, **251**, 1481-1485.
- Hobohm, U., Scharf, M., Schneider, R. & Sander C. (1992). Selection of a representative set of structures from the Brookhaven Protein Data Bank.

- Protein Sci.* **1**,409-417.
- Hobohm, U. & Sander, C. (1994). Enlarged representative set of protein structures. *Protein Sci.* **3**, 522-524.
- Holm, L., Ouzounis, C., Sander, C., Tuparev, G. & Vriend, G. (1992) A database of protein structure families with common folding motifs. *Prot. Sc.* **1**,1691-1698, 1992.
- Holm, L., Sander, C., Schnarr, M., Rüterjans, H. , Fogh, R., Boelens, R. & Kaptein, R (1993). LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Prot. Eng.* **7**: 1449-1453.
- Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **223**, 123-138.
- Holm, L., Murzin, A. G. & Sander, C. (1994). Three sisters, different names: 3 α ,20 β -dihydroxysteroid dehydrogenase, dihydropteridine reductase and UDP-galactose 4-epimerase. *Nature Structural Biology* **1**: 146-147.
- Holm, L. & Sander, C. (1994). The FSSP database of structurally aligned protein fold families. *Nucleic Acid Res.* **22**, 3600-3609.
- Holm, L. & Sander, C. (1996). The FSSP database: fold classification based on structure-structure alignment of proteins. *Nucleic Acid Res.* **24**, 206-209.
- Hrabal, R., Chen, Z., James, S., Bennet, H.P.J. & Feng, N. (1996). The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nature Struct. Biol.* **3**, 747-752.
- Isaacs, N.W. (1995). Cysteine knots. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 391-395.
- Jacobsen, N.E., Abadi, N., Sliwkowski M.X., Reilly, D., Skelton N.J. & Fairbrother, W.J. (1996). High-resolution structure of the EGF-like domain of heregulin- α . *Biochemistry*, **35**, 3402-3417.
- Johnson M. S., Srinivasan, N., Swdhanini, R. & Blundell, T. L. (1994).

- Knowledge-based protein modeling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 1-68.
- Levitt, M. & Chothia, C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature*, **261**, 552-558.
- Lin, S. L. & Nussinov, R. (1995). A disulphide-reinforced structural scaffold shared by small proteins with diverse functions. *Nature Struct. Biol.* **2**, 835-837.
- Madej, T., Boguski, M. S. & Bryant, S. H. (1995). Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* **373**, 356-359.
- Matthews, B. W. & Rossmann, M. G. (1985). Comparison of protein structures. *Meth. Enzymol.* **115**: 397-420.
- McInnes, C., Hoyt, D. W., Harkins, R. N., Pagila, R. N., Debanne, M. T., O'Connor-McCourt, M. & Sykes D. (1996). NMR study of the transforming growth factor- α (TGF- α)-Epidermal growth factor complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 32204-32211.
- Molina, M.A., Marino, C., Oliva, B., Avilés, F.X. & Querol, E. (1994). The C-tail valine is a key residue for the stabilization of the complex between potato inhibitor and carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21467-21472.
- Montelione, G.T., Wüthrich, K., Burgess, A.W., Nice, E.C., Wagner, G., Gibson, K.D. & Sheraga, H.A. (1992). Solution structure murine epidermal growth factor determined by NMR spectroscopy and refined by energy minimization with restraints. *Biochemistry*, **31**, 236-249.
- Murray-Rust, J., McDonald, N.Q., Blundell T.L., Hosang M., Oefner, C., Winkler, F. & Bradshaw, R. A. (1993). Topological similarities in TGF-beta2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polipeptide growth factors. *Structure*. **1**, 153-159.

- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995). SCOP a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- Narasimhan, L., Singh, J., Humblet, C. & Blundell, T. L. (1994). Snail and spider toxins share a similar tertiary structure and cystine motif. *Nature Struct. Biol.* **1**, 850-852.
- Nogata K., Kohda, D., Hatanaka, H., Saori, I., Matsuda, S., Yamamoto, T., Suzuki, A. & Inagaki, F. (1994). Solution structure of the epidermal growth factor-like domain of heregulin- α , a ligand for p180erbB-4. *EMBO J.* **13**, 3517-3523.
- Oliva, B., Wastlund, M., Cardenas, R., Querol, E., Avilés, F.X. & Tapia, O. (1991a). On the stability and fluctuations of the potato carboxypeptidase inhibitor fold: A molecular dynamics study. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 616-621.
- Oliva, B., Wastlund, M., Nilsson, O., Cardenas, R., Avilés, F. X., Querol, E. & Tapia, O. (1991b). Aspects of model building applied to carboxypeptidase inhibitor protein: A molecular dynamics study of a putative Pro36/Gly mutant. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 627-637.
- Oliva, B., Daura, X., Nilsson, O., Querol, E., Avilés, F. X. & Tapia, O. (1995). Structure and fluctuation patterns of potato carboxypeptidase A inhibitor protein in aqueous solution. A molecular dynamics study. *Eur. Biophys. J.* **24**, 1-12.
- Oliva, B., Bates, P., Querol, E., Avilés, F. X. & Sternberg M. J. E. (1997) An automatic classification of the structure of protein loops. *J. M. Biol.* **267**, 1-17.
- Orengo, C. A., Brown, N. P., Taylor, W. T. (1992) Fast structure alignment for protein databank searching. *Proteins* **14**: 139-167.

- Orengo C. A., Michie, A. D., Jones, D. T., Swindells, M. B. & Thornton, J. M. (1997). CATH- A hierarchical classification of protein domain structures. *Structure*. **8**, 1093-1108.
- Pascarella, S. & Argos, P. (1992a). Analysis of insertions/deletions in proteins structures. *J. Mol. Biol.* **224**, 461-471.
- Pascarella, S. & Argos, P. (1992b). A data bank merging related protein structures and sequences. *Prot. Eng.* **5**, 121-137.
- Picot, D., Loll, P.J. & Garavito, R.M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, **367**, 243-249.
- Rees, D. C. & Lipscomb, W. N. (1982). Refined crystal structure of the potato carboxypeptidase inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **160**, 475-498.
- Richardson, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advan. Prot. Chem.* **34**. 167-339.
- Rossmann, M. G. & Argos, P. (1976). Exploring structural homology of proteins. *J.Mol. Biol.* **105**: 75-95.
- Rost B. (1997) Protein structures sustain evolutionary drift. *Folding Design*, **2**, S19-20.
- Roussel, A., Inisan A., & Knoop-Mouthy, E. (1994). TURBO FORBO (version 5.0a) Manual, BIOGRAPHICS, Technopole de Chateaux-Gombert, Marseille, France.
- Rufino, S.D. & Blundell T. L. (1994). Structure-based identification and clustering of protein families and superfamilies. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8**: 5-27.
- Russell, R. B. & Barton, G. J. (1994). Structural features can be unconserved in proteins with similar fold: An analysis of side-chain to side-chain contacts, secondary structure and accessibility. *J Mol. Biol.* **244**, 332-350.
- Russell, R. B., Saqi, M. A. S., Sayle, R. A., Bates, P. A. & Sternberg, M. J. E.

- (1997). Recognition of analogous and homologous protein folds: Analysis of sequence and structure conservation. *J. Mol. Biol.* **269**, 423-439.
- Sali, A. & Blundell, T. L (1990). Definition of general topological equivalence in protein structures. *J. Mol. Biol.* **212**: 403-428.
- Srinivasab, N., Bax, B., Blundell, T. L. & Parker, P. J. (1996). Structural aspect of the functional modules in C-alpha deduced from comparative analysis. *Proteins.* **26**, 217-235.
- Srinivisan, N., Sowdhamini, R., Ramakrishnan, C. & Balaram, P. (1990). Conformations of disulfide bridges in proteins. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **36**, 147-155.
- Subbarao, N. & Haneef, I. (1991). Defining topological equivalences in macromolecules. *Protein Engin.* **4**: 877-884.
- Sun, P.D & Davies, D. R. (1995). The cystine-knot growth factor superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 269-291.
- Taylor, W.R. & Orengo, C. (1989). Protein structure alignment. *J. Mol. Biol.* **208**, 1-22.
- Thornton, J.M., (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **151**, 261-287.
- Ullner, M., Selander, M. Persson, E., Stenflo, J., Drakenberg, T. & Teleman, O. (1992). Three-dimensional structure of the apo form of the N-terminal EGF-Like module of blood coagulation factor X as determined by NMR spectroscopy an simulated folding. *Biochemistry*, **31**, 5974-5983.
- Vita, C., Toma, F. & Menez, A. (1995). Scorpion toxins as natural design scaffolds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 6404-6408.
- Vriend, G. & Sander, C (1991) . Detection of common three-dimensional substructures in proteins. *Proteins* **11**: 52-58.
- Watanabe, Y., Barbashov, S. F., Komatsu, S., Hemmings, A. M., Miyagi, M., Tsunasawa, S. & Hirano, H. (1994). A peptide that stimulates

phosphorylation of the plant insulin-binding protein. Isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.* **224**, 167-172.

Zuker, M. & Somorjai, R. L. (1989) The alignment of protein structures in three dimensions. *Bull. Math. Biol.* **51**: 55-78.

FIGURE 1.

Dendrogram of the proteins classified according to their disulphide-bridge topology. Seven classes are obtained, some of them divided into sub-classes using topological characteristics of the disulphide bonds and considering functional/structural relationships among the proteins. ssRMSD (in Å) are shown in the vertical bar. At the top of the figure the clusters including more than one protein are shown in bold. The rest of the numbers refer to clusters with a protein non-grouped with others by the first clustering technique (DST).

FIGURE 2.

Protein classification using the disulphide-bridge topology. This figure shows the seven classes (A to G) obtained. Some information about them has been indicated, such as the number of proteins in the class, representative fold types and a representative member of each class, including a ribbon-like sketch of its structure. Several clusters (or groups of proteins joined by the first clustering technique) are included in a class, their numbers being indicated in bold. The PDB code of the proteins included in each cluster is shown.

FIGURE 3.

Structural comparison between EGF and PCI structures. They are superimposed by their disulphide-bridge topology and displayed using van der Waals surfaces and ribbon-like representations. In the van der Waals surface representation, several residues have been coloured according to their physicochemical properties using the following code: magenta for aromatic, green for polar, blue for basic and orange for non-polar residues. The ribbon-like representations superimpose the α -carbon chains of the PCI (red) and EGF (green). Three regions have been encircled: Region 1 includes

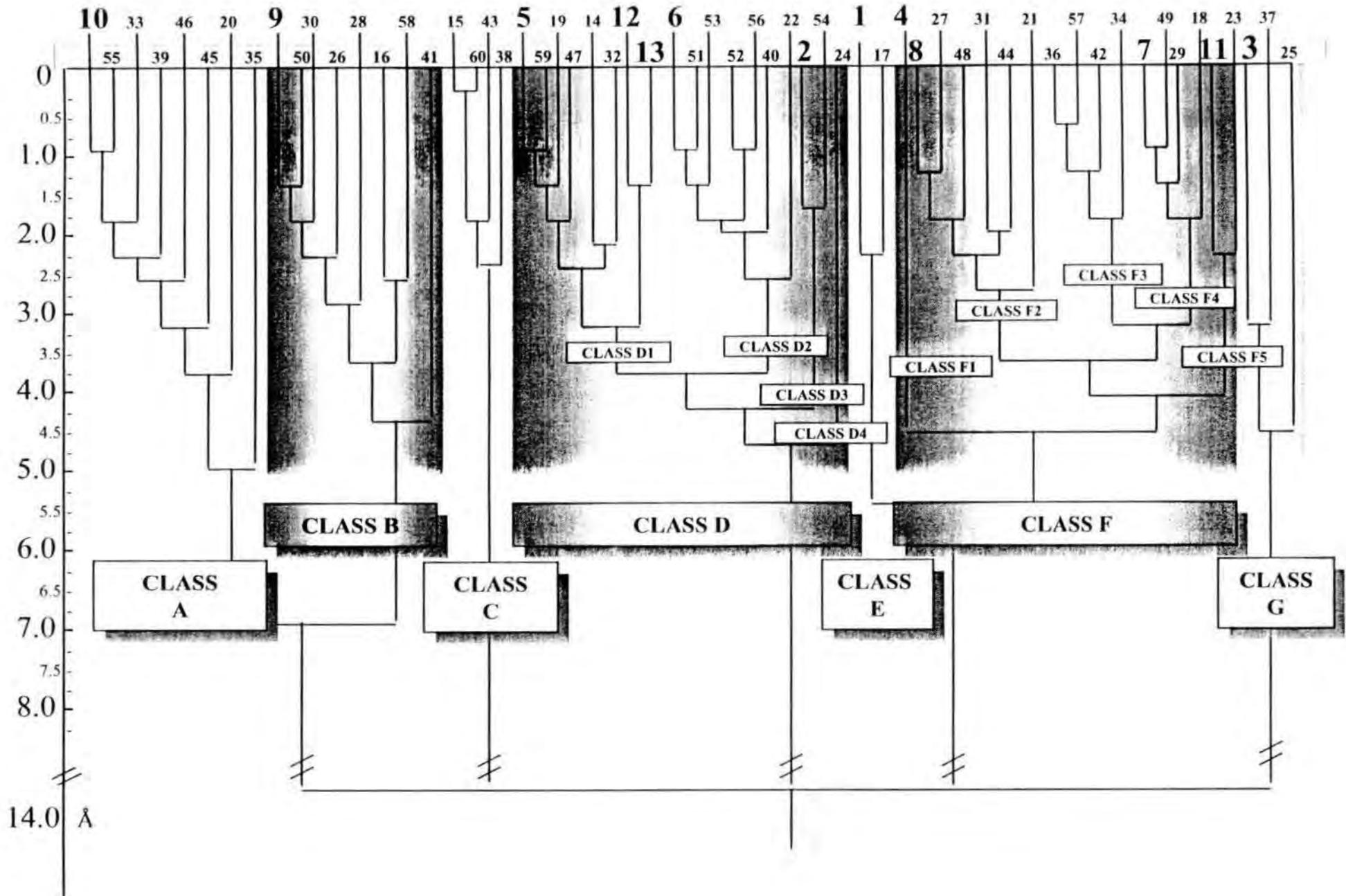
residues L15 and R41 for EGF and I7 and K10 for PCI. Region 2 includes residues V19, L26, S25 and T30 for EGF and A26, S30, A31 and T33 for PCI. Region 3 includes the aromatic residues Y37 and W50 for EGF and W22 and F23 for PCI. The residues are separated by less than 0.7 Å, on average, between equivalent residues in both structures. An exception of this are residues S25, L26 in EGF and S30, A31 in PCI, included in two loops, whose structural relationships have been more deeply analysed in the text.

FIGURE 4

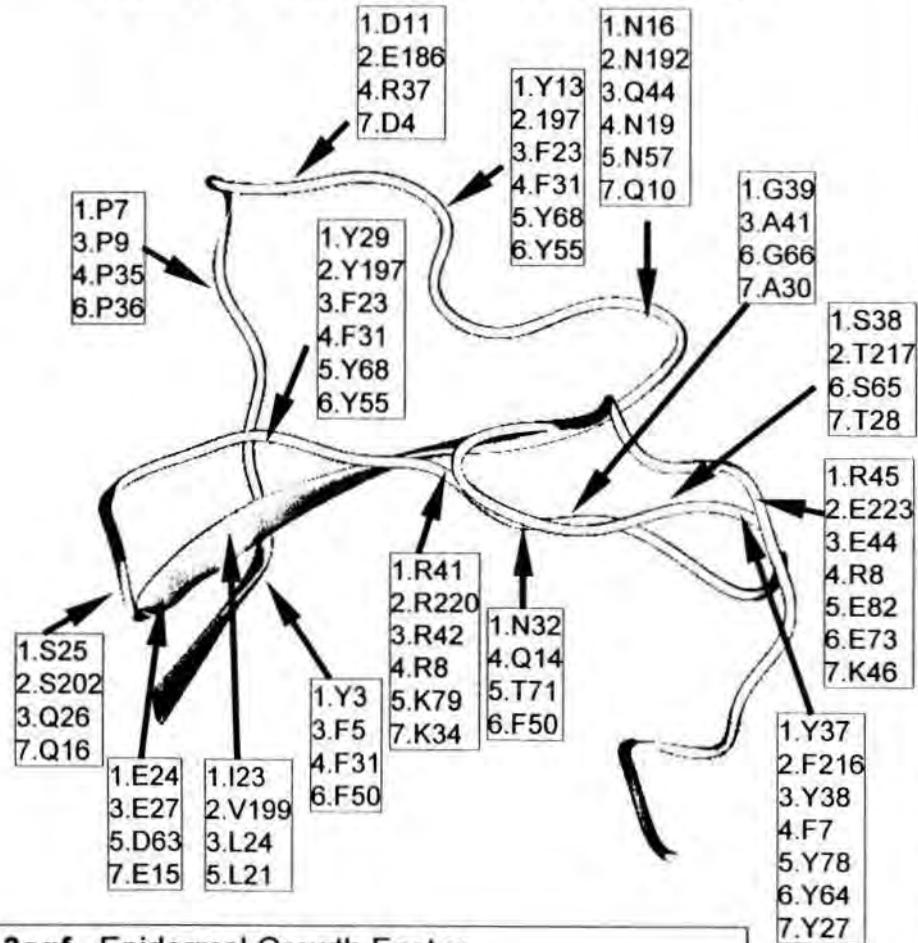
The EGF (3egf) and defensin (1dfn) scaffolds are shown. The members of EGF and defensin families have been overlapped by their disulphide-bridge topologies. A set of positions in the space with conserved physicochemical properties has been found for several members of each family. These positions are indicated in the figure with the number of the involved residue in each protein. Some of these residues, particularly for the EGF-like family, have been reported as functionally or structurally important for these proteins.

FIGURE 5

Procedure followed in the alignment of disulphide bridges. A disulphide bridge is represented as a vector which connects the two C α of the cysteines involved in it. The distances between the middle points (d) and the angle (α) of each pair of disulphide bridges have been calculated. The set of distances and angles of all pairs of disulphide bridges in a protein defines its particular topology.

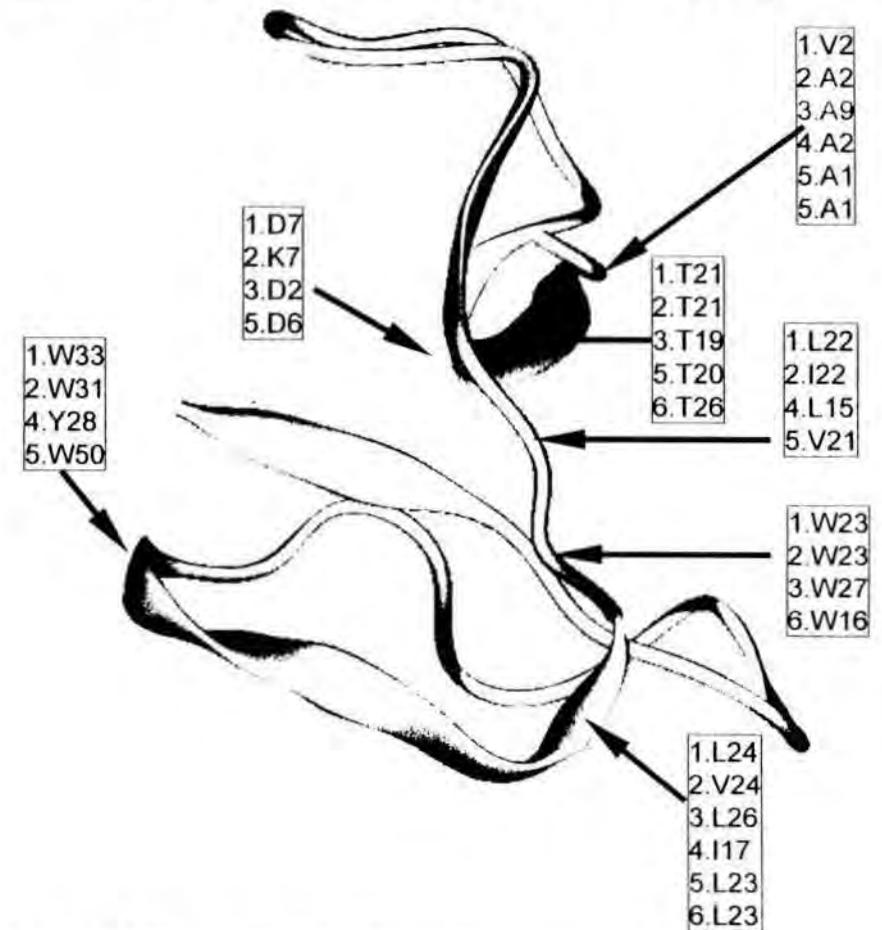


EGF-LIKE FAMILY

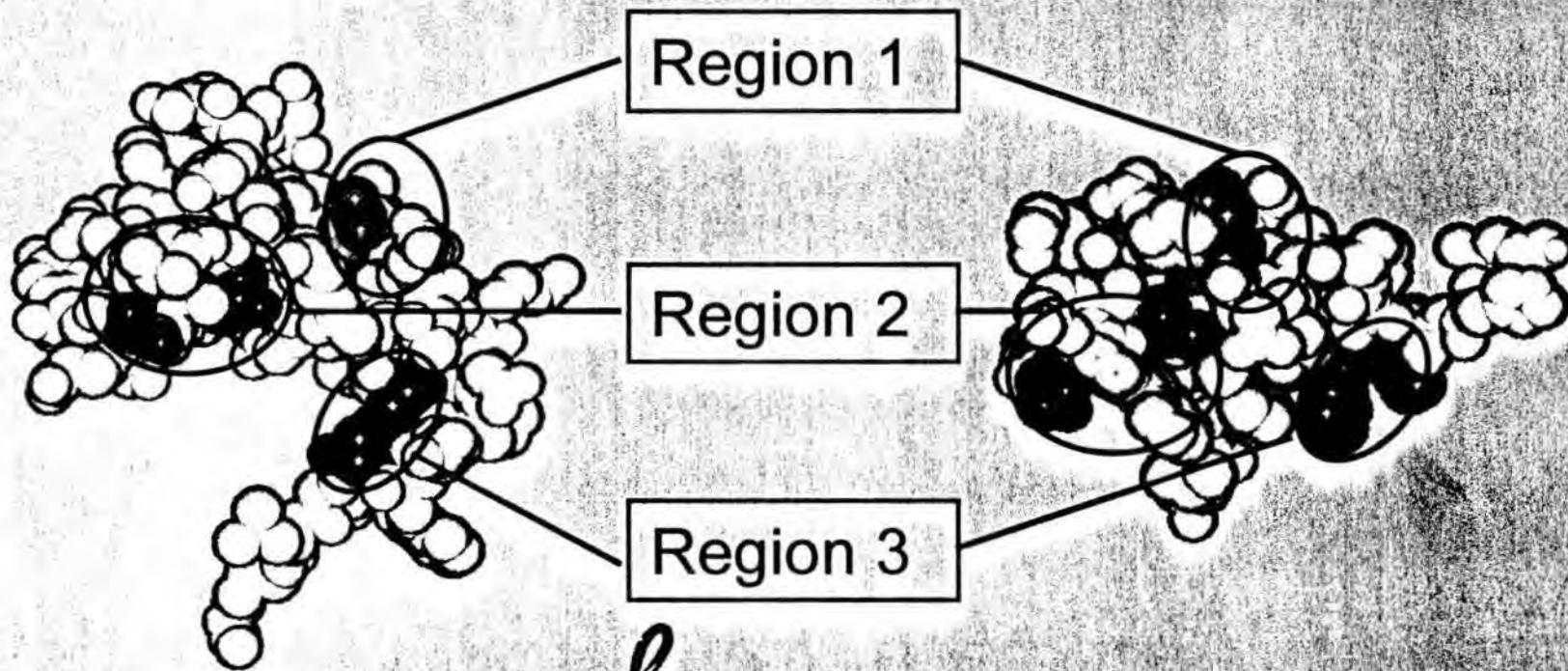


1. **3egf** Epidermal Growth Factor
2. **1hrf** Heregulin Alpha
3. **4tgf** Transforming Growth Factor
4. **1zaq** Forth EGF-like Domain of Thrombomodulin
5. **1ccf** Blood Coagulator Fx
6. **1prh** Prostaglandin H2 Syntase I
7. **1hcg** Blood Coagulator Fxa

DEFENSIN-LIKE FAMILY

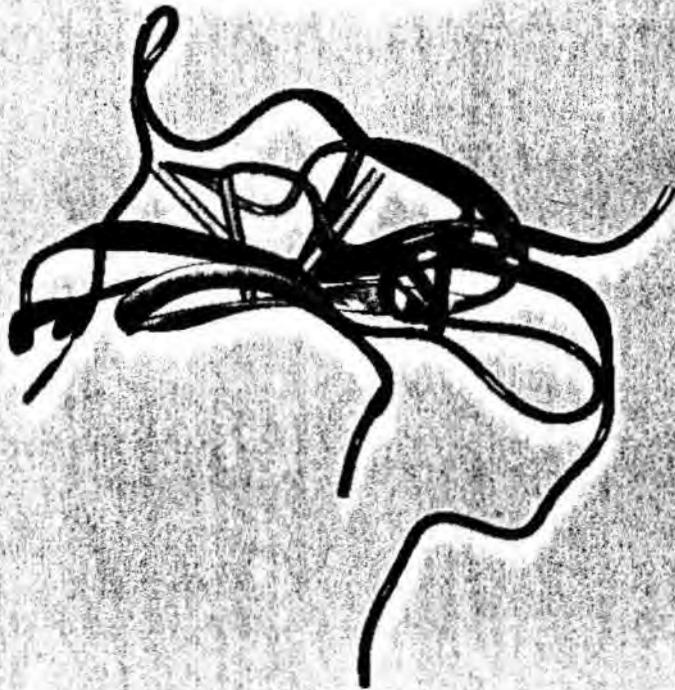


1. **1ahl** Anthopleurin A
2. **1atx** Sea Anemona Toxin
3. **1dfn** Defensin
4. **2bds** Antihypertensin
5. **2sh1** Neurotoxin I
6. **1bnb** Beta-Defensin 12



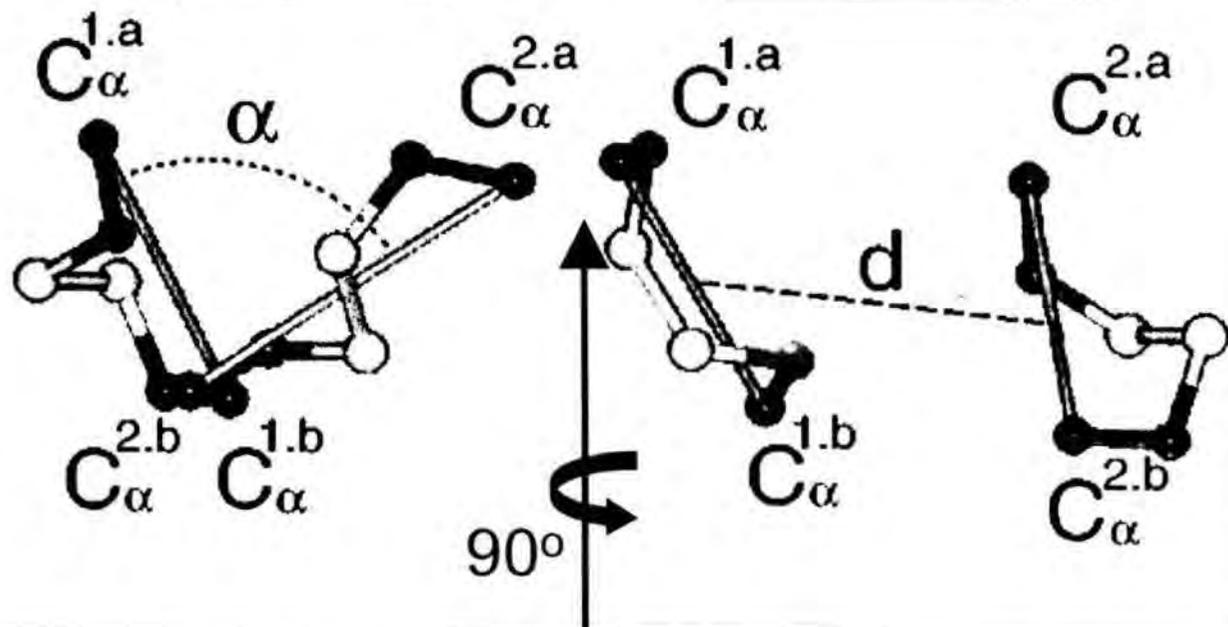
EGF

PCI



ANGLE

DISTANCE



CLASS A

3pgs
Pepsin-like



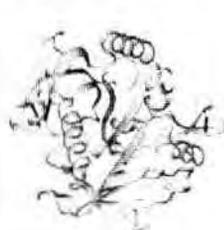
Number of Proteins : 11
Main Folds: • Acid Proteases.
• α/β Hydrolases.

CLUSTER:CODES

10:1hrnA, 3psg, 3cms;
55:1htrB; 33:1mhlC; 39:1tca
45:6taa; 46:1ack; 20:1cnsA;
35:1ppi

CLASS B

1tib
Fungal Lipase



Number of Proteins : 11
Main Folds : • α/β Proteins
• All β Proteins

CLUSTER:CODES

9:1lct, 1nnt, 1tfd; 50:1tib, 30:1lk
26:1hgeA; 28:1hvm; 16:1aozA;
58:2fbjH; 41:1vcaA

CLASS C

1rcb
Short Chain



Number of Proteins : 4
Main Folds: β -Trefoil

CLUSTER:CODES

15:1abr; 60:2aaiB; 43:3gly
38:1rcb

CLASS D

1hylA
Eukaryotic Protease



Number of Proteins : 35
Main Folds:

- D1:** Trypsin Like Serine Proteases.
- D2:** Insulin-Like & Kringle Modules.
- D3:** Eukaryotic Proteases
- D4:** Hemocyanin

CLUSTER:CODES

- D1** 5:1hylA, 1sgt, 3gctA, 1try; 59:2kaiB; 19:1bw4;
47:1ate; 14:2alp, 1ncsA, 1poa; 32:1lpt;
12:3sgbl, 1pce, 2bus; 13: 1pce, 1hpt, 1kpt;
- D2** 6:1pk4, 2pfl, 1pml, 1pkr; 51: 2hpqP; 52:6ins;
53:1kdu; 56:1igl; 40:1thv; 22: 1fbr;
- D3** 2:1poc, 1ppa, 1poa, 1pp2L, 1bp2, 1pod;
54:1pmc;
- D4** 24: 1hc4;

CLASS E

1pk4
Kringle Module



Number of Proteins : 10
Main Folds: • Trypsin Like
• Serine Proteases

CLUSTER:CODES

1: 1lmwB, 3gctA, 1ton, 3rp2A,
4ptp, 3est, 1ppfE, 1bit,
1hcgA;
17:1arb;

CLASS G

4cpal
Plant Inhibitor
Proteinase



Number of Proteins : 66
Main Folds:
• Cysteine-Knot Cytokines
• Epidermal Growth Factor-like.
• Small Inhibitor Toxins and Lectins
• Snake Toxin Like.
• Defensin Like.

CLUSTER:CODES

3:1bet, 1hcnA, 1hcnB, 1pdgA, 2tgi, 1prhA, 1tpg,
1hcgB, 1zaq, 4tgf, 1hrf, 3egf, 1ccf, 1erp, 1erl,
1erd, 1ica, 1pnh, 2crd, 1mtx, 1nrb, 1gps, 1lpbA,
1oaw, 4cpal, 1hev, 1hyp, 1dec, 4hctI, 1pi2, 2bbi,
4sgbl, 1tgxA, 1coe, 1ntx, 1fas, 1kbaA, 2abx,
1ntn, 1cvo, 3ebx, 1tfs, 1drs, 1atx, 1dfnA, 2shl,
1bnb, 2bds, 1ahl, 1c5a, 1cbn, 1esl, 1pp2L,
1ncsA, 2madL, 1vmoA, 1lct;
37:1prtB; 25:1hfh;

CLASS F

1dtx
Small Kumitz-type
inch BPTI-like.



Number of Proteins : 27
Main Folds:
F1: Cytochrome C Peroxidase Like Family.
F2: Hydrolases.
F3: Proteinases
F4: Protein Inhibitors

CLUSTER:CODES

- F1** 4:1lgaA, 1arv, 1mnp;
- F2** 8:193l, 2eql, 1lzt, 1hml; 27:1hucB; 48:1cpy;
31:1lpbB; 44:3tg; 21:1esc;
- F3** 36:1ppn; 57:2act; 42:3aahA; 34:1pgs;
- F4** 7: 1dtx, 1kzt, 1dtk, 1aapA, 1shp; 49:1tap;
29:1hxn; 18: 1bp;
- F5** 11:1onc, 7rsa, 1ang; 23:1hbq;