

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Las proteasas en la progresión neoplásica

David Flores-Reséndiz,^{a,b*} Emilio Castellanos-Juárez^b y Luis Benítez-Bribiesca^b^aUniversidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D. F., México^bLaboratorio de Patología Celular y Molecular, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F., México

Recibido en versión modificada: 21 de agosto de 2008

Aceptado: 29 de agosto de 2008

RESUMEN

*La invasión y la metástasis son los eventos más importantes en la progresión del cáncer, en los cuales están implicadas muchas moléculas, entre ellas, las proteasas. Éstas desempeñan un papel importante en etapas tempranas de la carcinogénesis, en la invasión, en fenómenos asociados como la angiogénesis y en la metástasis, principalmente por su capacidad para degradar componentes de la matriz extracelular, aunque sus sustratos son de naturaleza diversa: citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento (*b*-FGF, HGF, VEGF) y de muerte celular, cistatina-C, galectina, procolágena y otras proteasas, que pueden favorecer o inhibir la progresión neoplásica. Las proteasas son también moléculas de señalización que modulan a otras moléculas; forman cascadas, circuitos e incluso redes, que en conjunto determinan parte del potencial maligno. Se sabe que tanto la célula tumoral como las del estroma secretan diversos factores que regulan directa e indirectamente la expresión de proteasas en el microambiente tumoral. Esta revisión proporciona un panorama breve y actualizado sobre la participación de las proteasas en la progresión neoplásica.*

SUMMARY

*Invasion and metastasis are the most important events in cancer progression. In these two phases, several molecules are implicated and have been long associated with several forms of cancer. Proteases play a critical role not only in tumor cell invasion, but also in the earliest stages of carcinogenesis and its associated changes: angiogenesis and metastasis. Aside from their ability to degrade the extracellular matrix, facilitate invasion and metastasis, proteases target a great variety of substrates that favor or inhibit cancer progression: *b*-FGF, HGF, VEGF, cell death receptors, cistatin-C, galectin, procollagen, and other proteases. Proteases are also signaling molecules that modulate other molecules by underlying pathways in addition to their degradative role. Proteases form interconnected cascades, circuits and networks that bring about the tumor's potential for malignancy. Although, proteases are regulated by diverse molecules, it is known that tumoral and stromal cells secrete several biological molecules, including cytokines and chemokines that directly or indirectly regulate the protease-expression within the tumor's microenvironment. The present review briefly summarizes some of the major aspects associated with the role of proteases in cancer progression.*

Key words:*Proteases, invasion, metastasis, cancer progression, extracellular matrix, microenvironment*

Introducción

El cáncer se caracteriza por la inestabilidad genética y acumulación de alteraciones moleculares que se traducen en proliferación celular incontrolada. El principal problema radica en que cuando la enfermedad es diagnosticada, en muchas ocasiones el tumor ha invadido y metastatizado, lo que complica el tratamiento y conduce al paciente a la muerte; así, invasión y metástasis son las características distintivas del cáncer y los mayores condicionantes del pronóstico de la enfermedad.¹ Sin embargo, existen condiciones fisiológicas en las que células embrionarias competentes invaden tejidos adyacentes y metastatizan para llevar

a cabo la formación de los diversos órganos de la economía, proceso conocido como organogénesis.² De manera similar, células de tejidos diferenciados pueden invadir y metastatizar, dando lugar a focos ectópicos de tejido funcional, desencadenando diversas patologías, entre ellas la endometriosis, enfermedad de mujeres jóvenes, la cual se ha asociado con infertilidad.³

En la invasión, las células neoplásicas migran al espacio contiguo atravesando la matriz extracelular (MEC); en la metástasis, dichas células se establecen en órganos distantes. En ambos procesos, las proteasas desempeñan un papel fundamental al facilitar el acceso de la célula a los sistemas vascular y linfático; los cuales, además de proveer

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: David Flores-Reséndiz. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, 06925 México D.F., México. Tel.: (55) 5627 6900, extensiones 22705 y 22710. Correo electrónico: docdflores@yahoo.com.mx

los elementos nutritivos, constituyen la ruta de transporte para la diseminación tumoral.^{4,5} Los sitios en los cuales ocurre más frecuentemente metástasis son los ganglios linfáticos, pulmón, hígado, cerebro y hueso, lo que orienta al médico en el seguimiento de la enfermedad.⁶ Un evento importante en el establecimiento de metástasis es la angiogénesis, en la que es indispensable la interacción célula endotelial-MEC, con modificación subsecuente de esta última. La acción proteolítica es también un requisito.^{7,8}

La invasión y la metástasis son particulares en cada tipo y subtipo de neoplasia. Un tumor que invade y metastatiza de manera rápida y extensa es altamente maligno, como los carcinomas mamario y esofágico, en los cuales se produce metástasis incluso antes de ser diagnosticada la enfermedad, en ocasiones desarrollándose en focos múltiples.⁹ Los tumores que rara vez metastatizan o son poco invasivos por lo general son curados quirúrgicamente, tal es el caso del glioblastoma y el carcinoma basocelular.^{10,11}

Aunque todavía no se sabe todo sobre los mecanismos biomoleculares de la invasión y la metástasis, el conocimiento ha avanzado rápidamente. Con la genómica y la proteómica se ha identificado un gran listado de moléculas implicadas en estos procesos, incluyendo componentes celulares y estromales, elementos encriptados de la MEC y proteasas no consideradas anteriormente.¹² Este conocimiento ha sido una estrategia en el desarrollo terapéutico antineoplásico. La atención se ha centrado en los inhibidores de serino y metaloproteasas, cuya actividad proteolítica es esencial en los procesos de invasión, metástasis y angiogénesis, distintivos de malignidad.¹³

Proteasas, carcinogénesis y transición epitelio-mesénquima

La carcinogénesis consiste en la transformación maligna y el crecimiento celular incontrolado. En los carcinomas, las células cambian su comportamiento biológico y perfil de expresión genética, lo que algunos autores han denominado *transición epitelio-mesénquima*; pierden características epiteliales como polaridad, contactos intercelulares y con la membrana basal, y adquieren otras que les dan más plasticidad, se vuelven fusiformes, con aspecto fibroblastoide, presentan cambios en el patrón de expresión de citoqueratinas, cadherinas, cateninas y vimentinas. También se pierde contacto con las células adyacentes y con la membrana basal, se altera la relación con la MEC por cambios en la expresión de integrinas y otras moléculas de adhesión;^{14,15} se activan receptores tirosincinasa y TGF β y proteínas intracelulares como Ras.^{16,17} Los cambios en el citoesqueleto permiten a la célula formar extensiones (invadopodia), confiriéndole motilidad por adhesión a componentes de la MEC. Las sustancias quimoatractantes son de gran importancia, como el factor de crecimiento epidérmico, secretado por macrófagos y células endoteliales. El factor de crecimiento epidérmico es reconocido por su receptor, expresado por la célula tumoral, la que secreta moléculas bioactivas como el factor estimulante de colonias 1, que estimula a los macrófagos a producir sustancias protumo-

rales y proteasas, facilitando la invasión neoplásica local y vascular y el establecimiento de metástasis; con ello se instituye un círculo de señalización.^{14,18}

Invasión y metástasis, procesos dinámicos

La invasión y la metástasis se han dividido en etapas para simplificar su comprensión: migración celular, invasión local, intravasación, extravasación y metástasis. Pero en realidad son dinámicas y complejas. Cada uno de estos procesos ha sido descrito detalladamente por Deryugina.¹⁹

El concepto generalmente aceptado es que una vez transformada la célula y completada la transición epitelio-mesénquima, ésta inicia la degradación de la MEC y de la membrana basal e invade el estroma adyacente, degradando la membrana basal vascular, y se introduce en los vasos sanguíneos o linfáticos para establecerse en órganos distantes.²⁰ Mediante microscopía multifotónica en tiempo real se ha demostrado que solo las células competentes para iniciar la intravasación aparecen orientadas y polarizadas hacia el vaso;²¹ las que carecen de capacidad metastásica presentan apoptosis al contacto vascular.²² En contraposición del concepto anterior, se ha demostrado que en los carcinomas renal, hepatocelular y de la tiroides puede haber metástasis sin actividad proteolítica. Según algunos estudios, células individuales o en grupo son rodeadas e introducidas por el endotelio vascular formando émbolos, lo que señala la participación activa del endotelio mediante el reconocimiento de moléculas de adhesión.²³ También se ha demostrado con imágenes intravitales, la importancia de la plasticidad celular (habilidad para deformarse) en la intravasación de células tumorales inyectadas en el corazón de ratones desnudos.^{24,25}

Dentro del vaso, las células interactúan con elementos sanguíneos y del lecho vascular de los órganos y se enfrenta a factores reológicos, deformación mecánica, ataque inmunológico, etcétera, por lo que manifiestan mecanismos de supervivencia como expresión y activación de proteasas;²⁶ la mayoría muere, otras quedan atrapadas en la red capilar por el tamaño y solo unas cuantas llegan a su destino final.²⁷ Mediante marcaje radiactivo se ha comprobado que menos de 0.1% logra colonizar órganos secundarios, por lo que la metástasis ha sido considerada un fenómeno ineficiente. Es sabido que las células agrupadas tienen mayor posibilidad de sobrevivir respecto a las que viajan individualmente.⁴ En cuanto a la extravasación, también se ha señalado el papel permisivo del endotelio vascular sin acción proteolítica, pero con la intervención de moléculas de adhesión,^{28,29} particularmente integrinas.⁹ Entre otras cosas, lo anterior explica la selectividad órgano-específica de la metástasis tumoral.^{4,5}

Matriz extracelular y membrana basal. Elementos clave en la progresión tumoral

El estroma comprende el elemento celular (fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y cebadas, macrófagos, linfocitos y adipocitos) que favorece la progresión

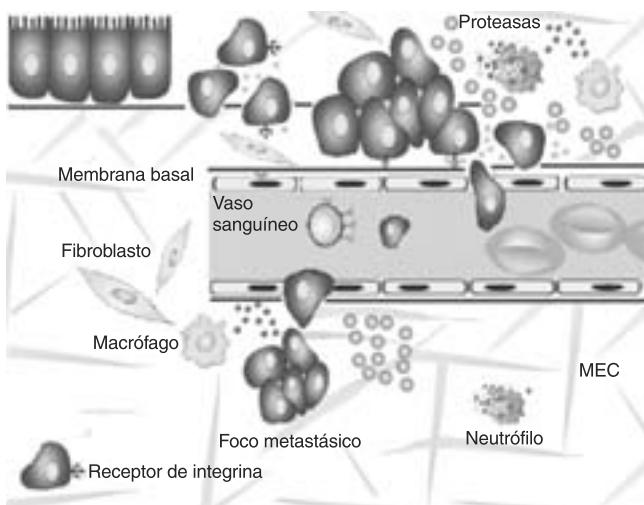


Figura 1. En la invasión, las células de cáncer migran a tejidos adyacentes a través de la MEC y la MB. Mientras que en las metástasis, se establecen en órganos distantes. Dentro de los vasos sanguíneos, la mayoría de las células mueren, otras quedan atrapadas en la red capilar de los órganos, principalmente por su tamaño y se enfrentan a diversas fuerzas hostiles como: factores reológicos, morfológicos, deformación mecánica, ataque inmunológico, etc. Por esta razón, expresan mecanismos de sobrevida, muchos de los cuales involucran la expresión y activación de proteasas y, finalmente, pocas, llegan a su destino final. Por lo cual, el proceso metastásico ha sido considerado como un fenómeno ineficiente.⁴⁵

neoplásica mediante la secreción de factores de crecimiento y proteasas;³⁰⁻³⁵ pero que puede tener efecto opuesto secretando sustancias inhibidoras del crecimiento e incrementando la respuesta inmune en contra de la célula tumoral.³⁶ El otro elemento, acelular está compuesto básicamente por MEC,³⁷ principal barrera a superar por la célula de cáncer para invadir y metastatizar. Tiene tres componentes principales: elementos fibrosos (colágena, elastina y reticulina), proteínas de unión (fibronectina y laminina) y moléculas intermedias (glucosaminoglicanos). La membrana basal es un elemento especializado de la MEC, compuesta básicamente por colágena IV dispuesta de manera organizada en una capa densa que limita las células epiteliales del estroma. Por mucho tiempo, la interacción célula tumoral-membrana basal se ha considerado el evento crítico inicial de la invasión y progresión tumoral, por lo que uno de los fundamentos para la clasificación histopatológica de las neoplasias es la valoración de la invasión tumoral a la membrana basal.³⁸

Para la invasión y metástasis es indispensable la interacción célula competente-MEC, así como la disminución en su adhesividad hacia el tejido tumoral y hacia la matriz adyacente, para iniciar así la migración celular. La proteólisis de uniones celulares es otro requisito. Durante la migración, la célula modifica su fenotipo, dependiendo de la MEC con la que interaccione y la acción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas provenientes del estroma.³⁹ En los cánceres, la degradación de la MEC y de la membrana basal

está dada por la acción de proteasas tales como metaloproteasas (MMP), catepsinas (Cat), activadores de plasminógeno (tisular [tPA] y tipo uroquinasa [uPA]) y enzimas con dominios múltiples (ADAM [*a disintegrin and metalloproteases*] y ADAMT [*a disintegrin and metalloproteases with thrombospondin type-1 modules*]).⁴⁰ Sin embargo, no solo degradan componentes de la MEC; son también moléculas de señalización que modulan a otras y en conjunto forman cascadas proteolíticas, circuitos y rutas dinámicas; también definen parte del potencial maligno y son moduladas por factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas.⁴¹ Además de ser importantes en condiciones patológicas, lo son en procesos fisiológicos (embriogénesis, desarrollo de la glándula mamaria, cicatrización, etcétera)^{12,42} (Figura 1).

Las proteasas en la progresión neoplásica

Como resultado del avance científico-tecnológico, particularmente en proteómica, los investigadores han centrado su atención en la búsqueda de marcadores tumorales que definen de manera más específica a las neoplasias. Aunque se ha aceptado a las proteínas como marcadores tumorales, el marcador ideal debe ser específico para cada neoplasia y detectarse fácilmente en el organismo enfermo (pero no en una persona sana), más aún, conviene que esto último sea en etapas iniciales o antes de que la enfermedad sea evidente. Las proteasas han sido propuestas para este fin.⁴³

Las MMP es el grupo más estudiado.⁴⁴⁻⁴⁶ En el cáncer tienen un papel indispensable en la permeabilización de la membrana basal y subsecuente incremento en el potencial maligno, evento relacionado con mayor probabilidad de metástasis.⁴⁷ Las MMP son una familia de más de 20 endopeptidasas que requieren cinco para su actividad. Históricamente se han dividido en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y matrilisininas (Cuadro I), según su actividad en la degradación de componentes específicos de la MEC. Actualmente se prefiere clasificarlas conforme a su estructura, reconociéndose ocho clases: cinco de matriz y tres que se insertan en membrana celular MT-MMP (*membrane type-matrix metallo proteinases*).⁴⁸ Las MMP degradan prácticamente todos los componentes de la MEC, aunque actualmente se considera que su participación en la regulación de la homeostasis del microambiente es más amplia. Mediante el uso de técnicas moleculares, como la espectrometría de masas, se han identificado múltiples sustratos que incluyen factores de crecimiento, receptores de muerte celular, citocinas, quimiocinas, cistatina-C, galectina, proteínas de choque térmico, procolágena; factores angiogénicos: VEGF (*vascular endothelial growth factor*), β FGF (*beta-fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), angiogenina; moléculas antiangiogénicas: endostatina, angiotatina, tumstatina; así como moléculas encriptadas de la MEC: factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y otras moléculas bioactivas.⁴⁹ La mayoría de las MMP permanece como proenzima y llega a activarse por diversos mecanismos que incluyen la acción autocatalítica y de otras proteasas, creando cascadas de activación.⁵⁰

Cuadro I. Metaloproteasas y sustratos^{48,49}

Nombre	Tipo	Sustratos
Colagenasa-1(colagenasa intersticial)	MMP1	Pro1L-1β, MCP1,-2,-3, α2-macroglobulina, DF1, proTNFα, L-selectina, α1-antiquimiotripsina, IGFBP2,-3,-5, perlecan, inhibidor de proteasa-α1, colágena I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, agregan, hialuronasa, tenastina C
Gelatinasa A(gelatinasa de 72 kDa)	MMP2	Pro1L-1β, SDF1, MCP3, α2-macroglobulina, endotelina-1, proTNFα, FGFR1, decorina, KiSS1/metastina, proTGFβ, IGFBP3,-5, inhibidor de proteasa-α1
Estromelisina-1	MMP3	Pro1L-1β, IGFBP3, Perlecan, caderina-E, proTNFα, SDF1, decorina, selectina-L, plasminógeno, proHB-EGF, MCP1,-2,-3,-4, endostatina, antitrombina III, α2-macroglobulina, α1-antiquimiotripsina, inhibidor de proteasa-α1
Matrilisina	MMP7	ProTNFα, FasL, decorina, α1-proteinase inhibitor, prodefensina-α, caderina-E, endostatina, integrina-β4, proHB-EGF, plasminogen, sindecan, α2-macroglobulina
Colagenasa-2(colagenasa de neutrófilos)	MMP8	ProTNFα, IP10, LIX, α2-macroglobulina, IGFBP, MIG, selectina-L, α2-antiplasmina, MCP1, inhibidor de proteasa-α1, colágena I, II, III, V, VIII y X
Gelatinasa B(gelatinasa de 92 kDa)	MMP9	Pro1L-1β, proTNFα, IP10, FGFR1, CTAP-III, endostatina, ENA-78, proIL8, GCP2, GROα, IFNβ, IL2Rα, proTGFβ, MIG, SDF1, KiSS1/metastina, t tumstatina, α2-macroglobulina, plasminógeno, inhibidor de proteasa-α1, colágena IV, V, VII, X y XIV, gelatina
Estromelisina-2	MMP10	Colágena III, IV y V, caseína, gelatina, agregan, elastina, MMP1, MMP8, proteína de unión a proteoglicanos,
Estromelisina-3	MMP11	IGFBP1, inhibidor de proteasa-α1, α2-macroglobulin, α1-antitripsina, α1-AT, α2M, caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágena IV, transferrina carboximetilada, GST-TNF, MBP
Metaloelastasa(elastasa de macrófagos)	MMP12	ProTNFα, plasminógeno, inhibidor de proteasa-α1, endostatina, colágena IV, gelatina, elastina, caseína, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, fibrina, proteoglicano, fibrinógeno, fibrina, plasminógeno
Colagenasa-3	MMP13	ProTNFα, endostatina, α1-antiquimiotripsina, MCP3, α2-macroglobulina, SDF1, colágena I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, PAI1, agregan, perlecan, tenastina C, fibronectina, osteonectina, MM9
MT1-MMP	MMP14	ProTNFα, SDF1, transglutaminasa tisular, α2-macroglobulina, integrina αvβ3, MCP3, Sindecan, KiSS1/metastina, CD44, inhibidor de proteasa-α1, colágena I, II y III, gelatina, caseína, finonectina, laminina, vitronectina, tenastina C, entactina
MT2-MMP	MMP15	ProTNFα, transglutaminasa tisular, fibronectina, tenastina C, laminina, agregan, perlecan, GST-TNF, MMP2
MT3-MMP	MMP16	ProTNFα, transglutaminasa tisular, sindecan, KiSS1/metastina, colágena III, gelatina, caseína, fibronectina, MMP2
MT4-MMP	MMP17	ProTNFα
MT5-MMP	MMP24	KiSS1/metastina
MT6-MMP(leucolisina)	MMP25	Inhibidor de proteasa-α1
Matrilisina-2(endometasa)	MMP26	IGFBP1, inhibidor de proteasa-α1

EGF=epidermal growth factor, MT-MMP=metaloproteasa de membrana, TGF=transforming growth factor.

La forma más común de inactivación de las MMP es por acción de sus inhibidores específicos o TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), de los cuales se han reconocido cuatro tipos (del 1 al 4). El balance MMP-TIMP determina parcialmente la capacidad degradativa de la célula maligna.^{51,52} En los carcinomas mamario, de vejiga urinaria, pancreático, colorrectal, pulmonar, gliomas, epidermoide, cervicouterino, melanomas y linfomas, se encontró asociación positiva entre expresión aumentada de MMP (tanto en el tumor primario como en las metástasis) y otros parámetros de progresión tumoral, como bajo grado de diferenciación,

alta invasividad, pronóstico pobre, metástasis y sobrevida corta.¹⁹

En otros estudios, niveles plasmáticos elevados de gelatinas (MMP2 y MMP9) se correlacionaron con mayor incidencia de metástasis, por lo que se les consideró de valor pronóstico.⁵²⁻⁵⁴ En modelos de metástasis espontáneas de carcinoma mamario, niveles plasmáticos y séricos aumentados de MMP, se asociaron positivamente con el desarrollo y extensión de metástasis pulmonares y ganglionares en los animales de experimentación,⁵⁵ mientras que en estudios clínicos en pacientes afectados con carcinoma pulmonar,

Jumper y colaboradores informaron como incierta la acción de las MMP en los estadios avanzados de dicho carcinoma, debido a que estas proteasas se encontraron en su mayoría como zimógenos o asociadas a TIMP y α 2-macroglobulina.⁵⁶ Otra investigación demostró que la sobreexpresión de MMP individuales se acompaña de un incremento en la expresión de TIMP y se asoció con mayor agresividad y capacidad metastásica de diversas neoplasias.⁵⁷ Sin embargo, informes recientes señalan como dudosa la acción de algunas MMP en diversas neoplasias, con resultados incluso contradictorios.⁵⁸⁻⁶⁰

Las Cat son el segundo grupo de enzimas más estudiado en el cáncer. Investigaciones de la década de 1970 evidenciaron su participación en los procesos de invasión y metástasis.^{61,62} Actualmente han resurgido junto con sus inhibidores, como componentes importantes de la progresión neoplásica. Además de degradar la MEC, participan en procesos especializados como escisión de prodominios y activación de factores de crecimiento y citocinas. Las familias de las Cat comprende 11 miembros: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X, que conservan un sitio activo compuesto por residuos de cisteína, histidina y asparagina. Son sintetizadas como proenzimas y se activan en el medio ácido intralisosomal (por lo que han sido llamadas enzimas ácidas), en donde son importantes para la homeostasis intracelular, incluyendo el reciclado y la degradación proteica. Participan en procesos fisiológicos como la organogénesis cardiaca, cerebral y cutánea, la reabsorción ósea y la presentación de antígenos; al igual que en procesos patológicos como la osteoporosis, la artritis y, particularmente, el cáncer. Su expresión y actividad han sido relacionadas positivamente con la progresión neoplásica *in vitro* e *in vivo*, siendo consideradas moléculas de valor pronóstico.⁶³

Las Cat B y L son dependientes de cisteína, mientras que la D y la E lo son de aspartato; han sido las más estudiadas en el cáncer, aunque recientemente, también se ha reconocido la participación de Cat-K en el proceso metastásico.⁶⁴ La Cat-L, reconocida por su acción lisosomal, participa en otros procesos celulares, como degradación proteica, morfogénesis del folículo piloso, diferenciación epitelial y generación de epitopes antigenicos.⁶⁵ Goulet y colaboradores describieron una isoforma de dicha proteasa, la cual escinde un factor de transcripción CDP/Cux, acelerando el paso hacia la fase S del ciclo celular. En células transformadas con el oncogen Ras, se encontró también incremento en los niveles de la Cat-L y en el procesamiento de los genes CDP/Cux; mediante el uso de anticuerpos anti Cat-L se bloqueó la progresión hacia la fase S del ciclo celular, por ende, la proliferación celular; mientras que con un inhibidor no permeable de Cat-L no se presentó cambio, confirmándose su acción intranuclear.⁶⁶ Waltz y su grupo encontraron efecto negativo de Cat-L en la progresión neoplásica. En estudios en queratinocitos murinos sobreexpresaron la urpina (serpina B13, proteína de 44 kDa expresa por los queratinocitos); observaron que hubo resistencia a la apoptosis inducida por UV. Interesantemente, en un modelo murino de carcinogénesis química se presentó susceptibilidad aumentada para el desarrollo de cáncer cutáneo. Otros estudios con microarreglos sobreexpresaron genes relacio-

nados con presentación antigenica y angiogénesis;⁶⁵ en líneas celulares y en diversas neoplasias (carcinomas papilar de tiroides, renal, testicular, pulmonar, mamario, ovárico, colorrectal y de vejiga urinaria), se asociaron niveles aumentados de Cat-L y de su mRNA con potencial maligno mayor.⁶⁷⁻⁶⁹ Svatek y colaboradores asociaron positivamente niveles urinarios aumentados de Cat-L con estados invasivos de cáncer de vejiga urinaria y menor sobrevida de los pacientes, por lo que se le consideró un predictor de malignidad, situación que no se presentó para Cat-B, aunque las bases estadísticas del estudio carecen de solidez.⁷⁰

Cat-B es una hidrolasa lisosomal con actividad endopeptidasa, aunque se le ha encontrado en la membrana celular de algunas neoplasias e incluso en líneas celulares;^{61,62} junto con Cat-L degrada prácticamente todos los componentes de la MEC; también activa al pro-uPA y a su receptor, participando en la generación de la cascada proteolítica.⁷¹⁻⁷⁴ Se han asociado niveles séricos aumentados de Cat-B con la progresión del cáncer cervicouterino; también se ha encontrado incremento en su actividad y en los niveles del mRNA en las primeras etapas del cáncer cervicouterino y en el tejido cervical normal, así como en otros cánceres;⁷⁵ al igual que en líneas celulares de cáncer colorrectal.⁷⁶ Sitabkhan y Frankfater, en su estudio en modelo murino, describieron que Cat-B contribuye a la invasividad de la línea celular de melanoma, B16 (de alta invasividad), incrementando de seis a ocho veces respecto a la línea celular B16F1 (poco metastásica), la expresión del mRNA y a actividad de esta proteasa, señalando como responsable de este efecto al factor de transcripción Sp1, el cual actúa sobre la región promotora del gen.⁷⁷

La Cat-D es también una hidrolasa lisosomal importante en el desarrollo neoplásico,⁷⁸ con actividad mitogénica sobre células de adenocarcinoma mamario dependiente de estrógenos⁷⁹ y de carcinoma endometrial,⁸⁰ considerándose también de valor pronóstico en el carcinoma cervicouterino.⁸¹ Se ha correlacionado niveles aumentados de Cat-D con potencial maligno mayor en carcinomas cervicouterino y mamario;^{81,82} este mismo hallazgo se presentó en líneas celulares de cáncer mamario.⁸³ En modelos animales se correlacionó con aumento de los niveles enzimáticos con mayor agresividad tumoral y mayor número de metástasis.^{84,85} Merseburger y colaboradores correlacionaron niveles de Cat-D en pacientes con carcinoma renal, con el grado histológico, sin encontrar significancia estadística ni importancia clínica.⁸⁶ Actualmente sigue en duda su acción en el desarrollo neoplásico.

Cat-E es una aspartilproteasa intracelular implicada tanto en procesos fisiológicos como en patológicos *in vitro*. Su función *in vivo* no se conoce del todo. Es expresada principalmente por macrófagos y sus sustratos no han sido identificados con claridad, por lo que su participación en procesos celulares normales es incierta. Kawakubo y colaboradores demostraron que Cat-E detiene el crecimiento y promueve la apoptosis de líneas celulares de cáncer de próstata a través de la interacción con TRAIL, sin afectar células normales, por lo que se le consideró con acción antitumoral. En murinos transplantados con células de melanoma humano y en ratones deficientes de Cat-E, se

encontró que esta proteasa desempeña un papel sustancial en la defensa del huésped contra la célula tumoral a través de apoptosis dependiente de TRAIL, así como en la citotoxicidad mediada por macrófagos asociados a la neoplasia.⁸⁷ Shin y colaboradores encontraron que Cat-E genera endostatina por fragmentación de colágena XVIII en medio ácido, además de interleucina 12. Ratones heterotrasplantados con la línea celular de cáncer de próstata ALVA101 presentaron menor crecimiento tumoral y mayor actividad de macrófagos asociados al tumor, inducida por Cat-E; y por ELISA se encontró que la expresión de Cat-E detiene el crecimiento tumoral por inhibición de la angiogénesis e incremento de la respuesta inmune.⁸⁸

Podgorski y colaboradores hallaron que Cat-K desempeña un papel importante en el desarrollo de metástasis óseas de los cánceres prostático y mamario a través de la activación del VEGF y reclutamiento de macrófagos y adipocitos, con aumento en la actividad osteoclástica.⁸⁹ Le Gall y su grupo corroboraron lo anterior en ratones heterotrasplantados con la línea celular BT474 de cáncer mamario, tratados mediante un inhibidor de Cat-K, los cuales presentaron lesiones óseas 79% más pequeñas que el grupo control. En investigaciones en ratones trasplantados con líneas de cáncer mamario B01 y B02 tratados con la combinación del inhibidor de Cat-K y de osteoclastos (ácido zoledrónico), se encontró que el inhibidor de Cat-K solo no bloqueó el crecimiento tumoral en el modelo heterotransplantado con la línea B01, pero la masa tumoral se redujo en 62%.⁹⁰

Husmann y colaboradores detectaron disminución en la expresión de Cat-B y H e incremento de Cat-D, K y L en la línea celular LM5 (con capacidad metastásica alta) en comparación con SAOS-2 (poco metastásica). La inmunohistoquímica de osteosarcomas de bajo grado y niveles bajos de Cat-K fueron relacionados con mejor pronóstico en comparación con los de expresión enzimática alta, por lo que se le consideró de valor pronóstico.⁶⁴ De las Cat H y S se ha informado acción positiva y negativa en ciertas neoplasias.^{91,92} Su localización en la célula neoplásica es en la superficie, por lo que su excreción y activación en el medio extracelular se ve favorecida por la acidez; mientras que en células normales es generalmente lisosomal;⁹³ hallazgos que han contribuido al diseño de pequeñas moléculas anti-neoplásicas, aunque sin obtener efecto terapéutico óptimo, probablemente por la acción dual de las proteasas.⁶³

Las Cat se regulan a través de inhibidores endógenos pertenecientes a la familia de las cistinas (estefinas, cistatinas y cinógenos),⁹⁴ bloqueándolas por unión no covalente al sitio activo, siendo el desbalance proteasa/inhibidor lo que determina en parte la progresión neoplásica. Se ha encontrado correlación inversa entre inhibidores y agresividad en algunas neoplasias,⁹⁵⁻⁹⁷ aunque estos hallazgos son contradictorios en otras.⁹⁸

Las serinoproteasas son el tercer grupo más estudiado en el cáncer. Son también moléculas de señalización que participan en diversos procesos fisiológicos vía PAR (*proteases-activator receptors*, moléculas implicadas en la motilidad leucocitaria, en la producción de citocinas y en la expresión de moléculas de adhesión).⁹⁹ Se han relacionado

con enteropatías, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas así como con procesos alérgicos, incluyendo inflamación de vía aérea. A esta familia pertenecen los activadores del plasminógeno tisular (tPA) y el tipo uroquina (uPA), productos de diferentes genes; degradan al plasminógeno en su forma activa, la plasmina, cuyos sustratos son fibrina, fibronectina, colágena IV, vitronectina, laminina, MMP2 y MMP9, además de proactivadores del plasminógeno, generando cascadas proteolíticas.¹⁰⁰⁻¹⁰³ En diversas patologías, incluyendo el cáncer y procesos asociados como la adhesión y la migración celular, el uPA y su receptor (uPA-R) degradan componentes de la MEC, promueven la angiogénesis estimulando la proliferación endotelial¹⁰⁴ y participan en diversas condiciones fisiológicas como remodelación tisular y cicatrización; contribuyen también en la disolución de coágulos y el mantenimiento de la hemostasia vascular. El tPA es expresado principalmente durante el desarrollo cerebral, interviniendo en la migración neuronal;¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ según ciertos autores, su papel en el cáncer es controversial e irrelevante.^{109,110} Li y Cozzi informaron niveles aumentados de uPA y su receptor en el cáncer prostático, pero no en tejido prostático normal ni en lesiones benignas, por lo que se le consideró un marcador tumoral de valor pronóstico.¹¹¹ En el cáncer esofágico, Shiomi y colaboradores señalan que esta serinoproteasa se encuentra en el borde tumoral pero no en las células estromales normales;¹¹² mientras que otros investigadores indican que la mayoría de las células del organismo expresa receptores de superficie tanto para uPA como para tPA.¹¹³ El uPA tiene otras funciones relacionadas con la respuesta celular a infecciones virales y bacterianas, incidiendo en el control de la apoptosis y protegiendo a las células normales de las micobacterias, constituyendo junto con su receptor, un sistema asociado a mayor potencial metastásico de los carcinomas esofágico, colorrectal, pulmonar de células pequeñas, pancreático, mamario, mesotelioma, etcétera.¹¹⁴

PAI1, PAI2, PAI3 (*plasminogen activator inhibitors 1, 2 y 3*) y PN (nexina) constituyen el sistema de inhibición de los activadores del plasminógeno, inhibiendo tanto a la molécula libre como a la unida a su receptor. Con excepción de PAI1 y PAI2, la actividad de PAI es poco clara. Investigadores han demostrado que PAI1 es el principal regulador del sistema uPA-uPA-R y es secretado por células neoplásicas, principalmente en los carcinomas de colon, de mama y en algunas neoplasias experimentales.¹⁰⁴ Otros investigadores informaron niveles aumentados tanto de la proteína del uPA como del mensajero en el estroma tumoral, pero no en el tejido normal; así como variación en la localización de uPA, uPA-R y PAI1, dependiendo del modelo en estudio.^{115,116} También se ha demostrado que PAI1 inhibe a tPA por unión no covalente. En investigaciones clínicas en pacientes con carcinomas gástrico, colorrectal y de vejiga urinaria, se encontraron niveles aumentados de uPA y PAI1, por lo que fueron consideradas marcadoras de daño celular;¹¹⁷⁻¹¹⁹ en tumores sólidos se asoció niveles aumentados de uPA y PAI con pronóstico pobre. Biermann y colaboradores encontraron niveles aumentados de uPA y PAI1 en cánceres mamarios con receptores estrogénicos positivos y ganglios linfáticos negativos.¹²⁰ PAI2 expresado en tumores; la placenta,

monocitos/macrófagos y queratinocitos también lo expresan regulado a su vez por diversos mecanismos celulares y moleculares. Se han informado niveles plasmáticos aumentados de PAI2 en extractos celulares de pacientes con leucemia y carcinomas endometrial, ovárico, gástrico, pancreático y prostático, y en el neuroblastoma, siendo considerada con acción antitumoral.^{104,115,117}

Las ADAM son una familia de glicoproteínas transmembranales tipo 1 con dominios de MMP y de desintegrinas, implicadas en la fusión e interacción célula-célula, en la proteólisis de membrana celular, así como en la escisión de prodominios de otras proteasas. En condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo al cáncer, contribuyen en la generación de cascadas proteolíticas.¹²¹ Valkovskaya y colaboradores encontraron por inmunohistoquímica, correlación positiva entre sobreexpresión de ADAM8 e invasividad, con reducción de la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático, y fue considerada posible blanco terapéutico.¹²² Estos resultados fueron confirmados mediante RT-PCR, espectrometría de masas y ensayos de silenciamiento con RNA antisentido.^{123,124} En microarreglos de cADN de tumores humanos, se encontró sobreexpresión de ADAM15 en estados avanzados de cáncer prostático, mientras que disminuyeron al regularse negativamente su acción en líneas celulares del mismo cáncer, la migración, la adhesión celular, y la escisión de N-cadherina en la superficie celular. Otro estudio informó reducción en la expresión de integrina αV y de CD44 (proteínas relacionadas con metástasis), tal como sucedió en ratones SCID inyectados con línea de cáncer de próstata PC13, correlacionando la pérdida de ADAM15 con la atenuación de las metástasis óseas.¹²⁵

La familia de las ADAMT incluye 19 enzimas relacionadas con las MMP y las ADAM; son de estructura compleja y de actividad autocatalítica. Generan fragmentos amino y carboxilo terminal y un dominio de trombospondina.¹²⁶ Fisiológicamente se les ha relacionado con maduración de colágena, organogénesis, angiogénesis, reproducción e inflamación; y la deficiencia y sobreexpresión de algunas de éstas con diversas enfermedades, incluyendo al cáncer, informándose nuevas funciones de algunas de ellas. Llamaraz y colaboradores encontraron que ADAMT12 previene el efecto tumorigénico causado por el factor de crecimiento derivado de hepatocitos, por bloqueo de la vía Ras-MAPK, por acción de su dominio de trombospondina; encontrándose también que ADAMT12 proveniente de células del endotelio bovino, bloquea la habilidad de éstas últimas para formar túbulos por estimulación del VEGF. Adicionalmente, tumores inducidos en ratones SCID con la línea celular A549, sobreexpresaron ADAMT12 y presentaron reducción del crecimiento tumoral, por lo que se consideró una proteasa con acción antitumoral.¹²⁷

Proteasas, angiogénesis y progresión neoplásica

Folkman describió a la angiogénesis como "la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes",¹²⁸ pero el origen

de los neovasos tumorales continúa siendo objeto de intensas investigaciones.^{129,130} Si bien la angiogénesis depende de la proliferación y migración endotelial, evidencias recientes han demostrado la movilización e incorporación funcional de células endoteliales progenitoras (CEP).¹³¹⁻¹³⁴ Lyden y colaboradores señalaron que precursores endoteliales plasmáticos y células hematopoyéticas promueven en conjunto la angiogénesis, evidencia constatada en murinos en los cuales se restauró la angiogénesis y el crecimiento tumoral mediante el trasplante de médula ósea rica en precursores hematopoyéticos.¹³⁵ Reyes y colaboradores encontraron mayor potencial angiogénico en células endoteliales derivadas de células progenitoras totipotenciales CD133+ (MAPC), las cuales influyen en el desarrollo de tumores espontáneos y derivados de heterotransplantes en ratones SCID.¹³⁶ Las CEP, además de provenir de médula ósea, tienen alta capacidad proliferativa y otras características distintivas.¹³⁷ Las endoteliales son maduras, diferenciadas, con poco potencial proliferativo, entran en circulación cuando hay daño traumático vascular y contribuyen en la neoangiogénesis en menor escala que las CEP. En murinos se ha observado inhibición del crecimiento tumoral con diversos fármacos antiangiogénicos, aunque en humanos no se ha encontrado el mismo efecto, quizás porque la angiogénesis es regulada por un grupo más complejo de moléculas, como VEGF, FGF (*fibroblast growth factor*), TGF (*transforming growth factor*) y PDGF (*platelet derived growth factor*), que inciden sobre células con características especializadas todavía no reconocidas, así como por receptores de membrana presentes en la célula tumoral, estromal o endotelial.^{138,139}

La angiogénesis puede describirse como una secuencia de eventos ocurridos en el endotelio en los que se requiere la acción proteolítica, como son activación, migración, proliferación, fusión y formación de tubos capilares, formación membrana basal vascular y reclutamiento de pericitos.¹⁴⁰ El desarrollo de un sistema vascular es también un suceso temprano en la etapa embrionaria y muchos de sus eventos se recapitulan en la edad adulta de manera fisiológica y en ciertas patologías, tales como cicatrización y cáncer, reactivándose también rutas y sistemas de señalización como VEGF/VEGF-R (*vascular endothelial growth factor/receptor*), angiopoietina/Tie, PDGF, TGF, efrina-semaforina, netrinas y noch.¹⁴¹ La transformación maligna demanda un ambiente fértil que propicie la formación de un tejido con características invasivas y metastásicas.^{7,142} Se sabe que la masa tumoral no crecería más de 1 mm de diámetro si careciera de vasos sanguíneos;¹⁴³ la vascularidad es importante para el desarrollo neoplásico. En estudios clínicos se encontró relación positiva entre densidad vascular y la progresión tumoral.¹³⁸⁻¹⁴⁴ Los neovasos no son del todo funcionales, por lo que es frecuente observar áreas de necrosis, sobre todo cuando el crecimiento es rápido o el tumor es de grandes dimensiones. El tamaño del tumor depende también de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y proteasas.¹⁴⁵ Fang y colaboradores señalaron a la MMP2 como un requerimiento para el "switch angiogénico";¹⁴⁶ mientras que Zijlstra y su grupo resaltaron la importancia de MMP13 para la promoción angiogénica;¹⁴⁷ aunque

también se ha informado la acción de otras proteasas,¹⁴⁸ así como de los TIMP.¹⁴⁹ Desde 1971, Folkman señaló “al bloqueo de la angiogénesis como una estrategia terapéutica contra cáncer”,¹⁵⁰ concepto que continúa vigente,¹⁵¹ aunque con interrogantes respecto al uso de los fármacos con acción antiangiogénica: ¿cómo lograr la mejor combinación farmacológica?, ¿es posible combinarlos con quimioterápicos y otros agentes biológicos?, ¿cómo seleccionar a los pacientes que responderán al tratamiento? Por lo que es fundamental el entendimiento de las rutas moleculares que median la angiogénesis tumoral.¹⁵²

Acción antitumoral de las proteasas

El conocimiento de la acción proteolítica ha permitido el desarrollo de fármacos inhibidores, identificándose agentes citostáticos y antiangiogénicos (aunque sin obtener el efecto ideal),^{153,154,63} y ha permitido ampliar el concepto de las proteasas en la progresión neoplásica,¹⁵⁵ encontrándose además acción antitumoral en algunas de ellas, lo que ha revolucionado el concepto convencionalmente aceptado sobre estas enzimas y, apoya el concepto nuevo de su papel paradójico en el cáncer.¹² En algunos estudios no hubo relación entre ciertas proteasas y la progresión de los carcinomas mamario, pulmonar, ovárico, epidermoide y del glioblastoma.¹⁹ En otros disminuyó MMP8 y MMP3 en células metastásicas de carcinoma mamario; y en un modelo murino fue mayor la susceptibilidad para el desarrollo de tumores cutáneos, en ausencia de dichas proteasas.¹⁵⁶ También se han observado resultados controversiales para MMP12 y MMP 26 según el modelo estudiado y del estadio de la enfermedad. En otras originalmente reconocidas por su acción protumoral, se ha informado efecto opuesto en ciertas circunstancias, tal sucede con MMP3, MMP9, MMP11 y MMP19.¹⁵⁷ Balbin y colaboradores identificaron que la pérdida de MMP8 incrementa la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer cutáneo murino, indicando su acción antitumoral; contrariamente al trasplantar médula ósea rica en neutrófilos (fuerente principal de MMP8), el crecimiento tumoral disminuyó al restaurarse la acción de esta proteasa. También se encontraron anomalías en la respuesta inflamatoria inducida por carcinógenos, propiciando un mejor medio para el desarrollo neoplásico.¹⁵⁸

En líneas celulares de carcinoma mamario de bajo potencial metastásico, Montel y colaboradores identificaron que la regulación a la baja de MMP8 conlleva al incremento en el potencial metastásico de dichas células, mientras que la sobreexpresión en células con potencial metastásico alto trae consigo disminución de este último.¹⁵⁹ Gorrín y su grupo señalaron que la expresión de MMP12 reduce el tamaño tumoral en un modelo murino de melanoma, debido quizás a su acción antiangiogénica,¹⁶⁰ hallazgo corroborado por Dong,¹⁶¹ quien informó que la acción antitumoral de esta proteasa, pudiera deberse a la generación de angiotensina. Posteriormente, Gorrín-Rivas y colaboradores corroboraron dicha actividad.¹⁶² En otros estudios se encontró actividad protectora de MMP12 en neoplasias pulmonares,¹⁶³ así

como para el desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas e inducidas experimentalmente.¹⁶⁴ Otros estudios han asociado la expresión de MMP12 con sobrevida mayor en pacientes con carcinomas hepatocelular y de colon.¹⁶¹⁻¹⁶⁶ Ahora se conoce que el efecto protector de la MMP12 varía dependiendo del tipo de neoplasia y de la fuente celular de la cual provenga. Kerkelä y colaboradores informaron mayor sobrevida de los pacientes cuando MMP12 es secretada por macrófagos del estroma normal, sucediendo lo contrario cuando era secretada por macrófagos asociados al tumor.¹⁶⁷

Zhang y su grupo informaron hallazgos similares para MMP3 al correlacionar la presencia de la enzima con estados tumorales invasivos de cáncer mamario y mal pronóstico, cuando las células tumorales eran la fuente de esta proteasa, pero no cuando provenía de células del estroma.¹⁶⁸ También se ha informado la acción antitumoral de MMP26 en el carcinoma mamario dependiente de estrógenos, lo que podría estar dado por la acción reguladora de estas hormonas.¹⁶⁹ La MMP26, secretada por macrófagos y polimorfonucleares, es importante para la respuesta inflamatoria antitumoral,¹⁷⁰ mientras que MMP3 es reconocida por su acción protumoral,¹⁷¹ McCawley y su grupo encontraron acción antitumoral en el cáncer cutáneo,¹⁷² lo que condujo a su estudio en ratones con tumores mamarios desarrollados por la exposición al carcinógeno DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno). Al sobreexpresar la enzima, hubo reducción importante del tamaño tumoral y aumento de la apoptosis de células transformadas; mientras que en ratones Mmp3-/- se presentó mayor crecimiento tumoral y menor diferenciación histológica respecto al grupo control.¹⁷³ De igual forma, en ratones Mmp9-/- existió mayor crecimiento tumoral y mayor agresividad de ciertos carcinomas, sugiriendo el efecto antitumoral de esta proteasa.

En estudios clínicos también se asoció sobreexpresión de MMP9 y mejor pronóstico en pacientes con cáncer mamario y ganglios linfáticos negativos, con correlación inversa entre presencia de la proteasa y metástasis hepáticas en pacientes con cáncer colorrectal.^{174,175} Pozzi y Hamano informaron que la acción antitumoral de MMP9 pudiera estar dada por la generación de angiotensina y tumstatina.^{176,177} Andarawewa encontró efecto dual en MMP11: promoviendo el crecimiento del tumor primario y disminuyendo las metástasis.¹⁷⁸ Pendás, por su parte, informa menor susceptibilidad para el desarrollo de tumores cutáneos en ratones Mmp-19-/- en un modelo de cáncer inducido químicamente;¹⁷⁹ mientras que Jost, que el efecto antitumoral de MMP19 está dado por su acción antiangiogénica en los primeros estadios de la enfermedad.¹⁸⁰

De las ADAMT también se ha identificado efecto paradójico en diversas neoplasias. ADAMT1 inhibe la angiogénesis y reduce el crecimiento tumoral y la formación de metástasis de ciertos tumores,^{181,182} debido quizás a la acción de productos de escisión con acción antimetastásica generados a partir de componentes de la MEC;¹⁸³ resultados avalados por otros investigadores quienes encontraron que su efecto antitumoral se debe a la formación de trombospondina y al secuestro del VEGF.^{184,185} También se ha informado mecanismos de hipermetilación del promotor del gen de diversas ADAMT (1, 8, 9,

15 y 18), con actividad antiangiogénica en los carcinomas mamario, colorrectal y pulmonar,¹⁸⁶⁻¹⁹⁰ por lo que han sido propuestas como genes supresores de tumores; también se encontraron mutaciones en diversos cánceres.¹⁹¹⁻¹⁹³

El efecto antitumoral de Cat-L ha sido informado por Walz y colaboradores en sus estudios en queratinocitos; la sobreexpresión de urpina y disminución de Cat-L aumentó la resistencia a la apoptosis tumoral e incrementó el desarrollo de tumores cutáneos.⁶⁵

Conclusiones

A pesar del conocimiento científico-tecnológico y del amplio conocimiento respecto a los eventos relacionados con la progresión neoplásica, todavía no se tienen los elementos suficientes para el entendimiento de esta enfermedad y, por consiguiente, de su erradicación. Se sabe poco acerca de la proteómica del cáncer y continúa la búsqueda del marcador pronóstico y predictivo ideal, así como del blanco terapéutico clave que, a decir verdad, es prácticamente imposible si consideramos que la complejidad del cáncer va más allá que el entendimiento de una sola molécula, porque el cáncer es una enfermedad en la cual interactúan numerosos elementos, cuyo resultado final es particular para cada tipo y subtipo de neoplasia.

Centrándonos en el estudio de las proteasas, podemos decir que no solo se trata de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular; son también moléculas de señalización y moduladores específicos de otras moléculas de señalización, así como de sus rutas relacionadas, actividad adicional a su papel degradativo. Las proteasas no actúan solas, forman cascadas, circuitos e incluso rutas moleculares; están interconectadas de manera dinámica para formar una red de señalización, que resulta en el potencial maligno de la neoplasia, el cual a su vez se encuentra modulado por factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, entre otros elementos, definiendo el potencial proteolítico celular o tisular en condiciones específicas. Es importante considerar que el entendimiento de esa red de señalización y de su perturbación en el cáncer, nos ayudará a desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad.

Referencias

- Woodward J, Holen I, Coleman R, Buttle D. The roles of proteolytic enzymes in the development of tumour-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone* 2007;41:912-927.
- Greenlee K, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 2007;87:69-98.
- Gaetje R, Holtrich U, Engels K, Kourtis K, Cikrit E, Kissler S, et al. Expression of membrane-type 5 matrix metalloproteinase in human endometrium and endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:567-573.
- Chambers A, Groom A, MacDonald I. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-572.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003;83:337-376.
- Weigelt B, Peterse J, van 't Veer L. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5:591-602.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
- Stacker S, Achen M, Jussila L, Baldwin M, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:573-583.
- Janes S, Watt F. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2006;6:175-183.
- Reardon D, Wen P, Desjardins A, Batchelor T, Vredenburgh J. Glioblastoma multiforme: an emerging paradigm of anti-VEGF therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:541-553.
- Xie J. Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:241-251.
- López-Otín C, Overall C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:509-519.
- Atkinson J, Siller C, Gill J. Tumour endoproteases: the cutting edge of cancer drug delivery? *Br J Pharmacol* 2008;153:1344-1352.
- Huber M, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548-558.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-374.
- Comoglio P, Trusolino L. Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest* 2002;109:857-862.
- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 2004;566:9-20.
- Prindell G, Zipori D. Environmental guidance of normal and tumor cell plasticity: epithelial-mesenchymal transitions as a paradigm. *Blood* 2004;103:2892-2899.
- Deryugina E, Quigley J. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34.
- Steeg P. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006;12:895-904.
- Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, et al. Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer Res* 2005;65:4246-4252.
- Overall C, Dean R. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:69-75.
- Sugino T, Yamaguchi T, Ogura G, Saito A, Hashimoto T, Hoshii N, et al. Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers. *BMC Med* 2004;2:9.
- Tsuji K, Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Bouvet M, Endo H, et al. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res* 2006;66:303-306.
- Condeelis J, Segall J. Intravital imaging of cell movement in tumors. *Nat Rev Cancer* 2003;3:921-930.
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J, Segall J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:559-564.
- Wyckoff J, Jones J, Condeelis J, Segall J. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 2000;60:2504-2511.
- Brandi B, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Rötger A, Kemming D, et al. 3D-extravasation model — selection of highly motile and metastatic cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2005;15:387-395.
- Condeelis J, Singer R, Segall J. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:695-718.
- Bhowmick N, Neilson E, Moses H. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-337.
- Liang P, Hong J, Ubukata H, Liu G, Katano M, Motohashi G, et al. Myofibroblasts correlate with lymphatic microvessel density and lymph node metastasis in early-stage invasive colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:2705-2712.
- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992;3:65-71.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:71-78.
- Metcalfe D, Baram D, Mekori Y. Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-1079.
- Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867.
- Mueller M, Fusenig N. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:839-849.
- Liotta L, Rao C, Barsky S. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983;49:636-649.
- Kleinman H, Jacob K. Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol* 2001;Chapter 12:Unit 12.2.
- Jodele S, Blavier L, Yoon J, DeClerck Y. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:35-43.
- Arribas J, Bech-Serra J, Santiago-Josefat B. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:57-68.
- Auf Dem Keller U, Doucet A, Overall C. Protease research in the era of systems biology. *Biol Chem* 2007;388:1159-1162.
- Hinck L, and Silberstein G. Key stages in mammary gland development: The mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res* 2005;7:245-251.
- Chatterjee S, Zetter B. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol* 2005;1:37-50.

44. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1755:37-69.
45. Hofmann U, Houben R, Bröcker E, Becker J. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005;87:307-314.
46. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:101-117.
47. Singleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci* 2006;11:479-491.
48. Folgueras A, Pendás A, Sánchez L, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. 1: Int J Dev Biol 2004;48:411-424.
49. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.
50. Hojilla C, Wood G, and Khokha R. Inflammation and breast cancer. Metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10:1-9.
51. Chirco R, Liu X, Jung K, Kim H. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:99-113.
52. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005;87:287-97.
53. Balbín M, Fueyo A, Tester A, Pendás A, Pitiot A, Astudillo A, et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003;35:252-257.
54. Mook O, Frederiks W, Van Noorden C. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705:69-89.
55. Nakajima M, Welch D, Wynn D, Tsuruo T, Nicolson G. Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:5802-5807.
56. Jumper C, Cobos E, Lox C. Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. *Respir Med* 2004;98:173-177.
57. Wu Z, Wu Q, Yang J, Wang H, Ding X, Yang F, et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2050-2056.
58. Acuff H, Carter K, Singleton B, Gorden D, Matrisian L. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* 2006;66:259-266.
59. Deryugina E, Zijlstra A, Partridge J, Kupriyanova T, Madsen M, Papagianopoulos T, et al. Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res* 2005;65:10959-10969.
60. López-Otín C, Matrisian L. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007;7:800-808.
61. Sloane B, Honn K, Sadler J, Turner W, Kimpson J, Taylor J. Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: a possible marker for metastatic potential. *Cancer Res* 1982;42:980-986.
62. Chinni SR, Falchetto R, Gercel-Taylor C, Shabanowitz J, Hunt DF, Taylor DD. Humoral immune responses to cathepsin D and glucose-regulated protein 78 in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1997;3:1557-1564.
63. Palermo C, Joyce J. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:22-28.
64. Husmann K, Muff R, Bolander ME, Sarkar G, Born W, Fuchs B. Cathepsins and osteosarcoma: Expression analysis identifies cathepsin K as an indicator of metastasis. *Mol Carcinog* 2008;47:66-73.
65. Walz M, Kellermann S, Bylaite M, Andréé B, Rüther U, Paus R, et al. Expression of the human Cathepsin L inhibitor hurpin in mice: skin alterations and increased carcinogenesis. *Exp Dermatol* 2007;16:715-723.
66. Goulet B, Sansregret L, Leduy L, Bogyo M, Weber E, Chauhan S, et al. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Mol Cancer Res* 2007;5:899-907.
67. Joseph L, Chang L, Stamenkovich D, Sukhatme V. Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest* 1988;81:1621-1629.
68. Shuja S, Murnane M. Marked increases in cathepsin B and L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest* 1988;81:6121-6129.
69. Foucré D, Bouchet C, Hacène K, Pourreau-Schneider N, Gentile A, Martin PM, et al. Relationship between cathepsin D, urokinase, and plasminogen activator inhibitors in malignant vs benign breast tumours. *Br J Cancer* 1991;64:926-932.
70. Svatek R, Karam J, Karakiewicz P, Gallina A, Casella R, Roehrborn C, et al. Role of urinary cathepsin B and L in the detection of bladder urothelial cell carcinoma. *J Urol* 2008;179:478-484.
71. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Calvete J, Kramer M, et al. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem* 1991;266:5147-5152.
72. Falcón O, Chirino R, León L, López-Bonilla A, Torres S, Fernández L, et al. Low levels of cathepsin D are associated with a poor prognosis in endometrial cancer. *British Journal of Cancer* 1999;79:570-576.
73. Chauhan S, Goldstein L, Gottesman M. Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res* 1991;51:1478-1481.
74. Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, et al. Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* 1992;297:112-118.
75. Benítez-Bribiesca L, Villanueva C, Freyne R, Amezcuia J, De la Huerta R, Luevano E, et al. Serum proteinase levels platelet functional and morphological alterations in patients with cervix uteri carcinoma. Correlation with the degree of progression of the malignancy. *Arch Invest Med* 1986;17:211-242.
76. Van der Stappen J, Williams A, Maciewicz R, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 1996;67:547-554.
77. Sitabkhan Y, Frankfater A. Differences in the expression of cathepsin B in B16 melanoma metastatic variants depend on transcription factor Sp1. *DNA Cell Biol* 2007;26:673-682.
78. Rocheftor H, Capony F, García M. Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:321-331.
79. Rocheftor H, Capony F, García M, Cavaillès V, Freiss G, Champon M, et al. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? *J Cell Biochem* 1987;35:17-29.
80. Bradley W, Lima P, Rodgers L, Blomquist C, Downs L. Endometrial carcinoma expresses an increased cathepsin B/D ratio. *Gynecol Oncol* 2008;108:84-89.
81. Kristensen G, Holm R, Abeler V, Tropé C. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 1996;78:433-440.
82. Rocheftor H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992;28A:1780-1783.
83. Johnson M, Torri J, Lippman M, Dickson R. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1993;53:873-877.
84. García M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet J, et al. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996;14:642-650.
85. Jiang W, Puntis M, Hallett M. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* 1994;81:1576-1590.
86. Merseburger A, Hennenlotter J, Stenzl A, Beger G, Rinnab L, Kuczky M, et al. Cathepsin D serum levels are not a valid serum marker in renal cell carcinoma. *Urol Int* 2007;79:41-43.
87. Kawakubo T, Okamoto K, Iwata J, Shin M, Okamoto Y, Yasukochi A, et al. Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Res* 2007;67:10869-10878.
88. Shin M, Kadouraki T, Iwata J, Kawakubo T, Yamaguchi N, Takii R, et al. Association of cathepsin E with tumor growth arrest through angiogenesis inhibition and enhanced immune responses. *Biol Chem* 2007;388:1173-1181.
89. Podgorski I, Linebaugh B, Sloane B. Cathepsin K in the bone microenvironment: link between obesity and prostate cancer? *Biochem Soc Trans* 2007;35:701-703.
90. Le Gall C, Bellahcène A, Bonnelye E, Gasser J, Castronovo V, Green J, et al. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res* 2007;67:9894-9902.
91. Fröhlich E, Schlagenhauft B, Möhrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2001;91:972-982.
92. Ishibashi O, Mori Y, Kurokawa T, Kumegawa M. Breast cancer cells express cathepsins B and L but not cathepsins K or H. *Cancer Biochem Biophys* 1999;17:69-78.
93. Wang B, Sun J, Kitamoto S, Yang M, Grubb A, Chapman HA, Kalluri R, Shi GP. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 2006;281:6020-6029.
94. Järvinen M, Rinne A, Hopsu-Havu V. Human cystatins in normal and diseased tissues—a review. *Acta Histochem* 1987;82:5-18.
95. Jiang W, Hallett M, Puntis M. Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastasis. *Br J Surg* 1993;80:1368-1373.
96. Lah T, Kokalj-Kunovar M, Drobnić-Kosorok M, Babnik J, Golouh R, Vrhovec I, et al. Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:595-604.
97. Lah T, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, Pungercar J, Barlic-Maganja D, Drobnić-Kosorok M, et al. Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:36-44.
98. Sheahan K, Shuja S, Murnane M. Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989;49:3809-3814.
99. Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg M, Luger T, Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol* 2008;83:1309-1322.

100. Gravilovicc J, Murphy G. The role of plasminogen activator in cell-mediated collagen degradation. *Cell Biol Int* 1989;13:367-375.
101. Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986;261:3486-3489.
102. Liotta L, Goldfarb R, Brundage R, Siegal G, Terranova V, Garbisa S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res* 1981;41:4629-4636.
103. Summaria L, Hsiem B and Robbins K. The specific Mechanism of Activation of Human Plasminogen to Plasmin. *The Journal of Biological Chemistry* 1967; 242:4279-4283.
104. Dass K, Ahmad A, Azmi A, Sarkar S, Sarkar F. Envolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* 2008;34:122-136.
105. Bachmann F, Kruithof I. Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemost* 1984;10:6-17.
106. Gething M, Adler B, Boose J, Gerard R, Madison E, McGookey D, et al. Variants of human tissue-type plasminogen activator that lack specific structural domains of the heavy chain. *EMBO J* 1988;7:2731-2740.
107. Hsueh A, Liu Y, Cajander S, Peng X, Dahl K, Kristensen P, et al. Gonadotropin-releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: studies on ovarian tissue-type plasminogen activator activity, messenger ribonucleic acid content, and cellular localization. *Endocrinology* 1988;122:1486-1495.
108. Verrall S, Seeds N. Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *J Cell Biol* 1989;109:265-271.
109. Hajjar K, Hamel N. Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *J Biol Chem* 1990;265:2908-2916.
110. Saito K, Nagashima M, Iwata M, Hamada H, Sumiyoshi K, Takada Y, et al. The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb Res* 1990;58:355-366.
111. Li Y, Cozzi P. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treat Rev* 2007;33:521-527.
112. Shiomi H, Eguchi Y, Tani T, Kodama M, Hattori T. Cellular distribution and clinical value of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2000;156:567-575.
113. Gottesman M. The role of proteases in cancer. *Sem Cancer Biol* 1990;1:97-100.
114. DeClerck YA, Laug WE. Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 1996;49:72-84.
115. Saksela O, Rifkin D. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:93-126.
116. Shi Z, Stack M. Urinary-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Biochem J* 2007;407:153-159.
117. Grøndahl-Hansen J, Christensen I, Rosenquist C, Brünner N, Mouridsen HT, Danø K, et al. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993;53:2513-2521.
118. Ito H, Yonemura Y, Fujita H, Tsuchihara K, Kawamura T, Nojima N, et al. Prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in gastric cancer. *Virchows Arch* 1996;427:487-496.
119. Schmitt M, Wilhelm O, Jänicke F, Magdolen V, Reuning U, Ohi H, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (CD87): a new target in tumor invasion and metastasis. *J Obstet Gynaecol* 1995;21:151-165.
120. Biermann J, Holzscheiter L, Kotzsch M, Luther T, Kiechle-Bahat M, Sweep FC, et al. Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA. *Int J Mol Med* 2008;21:251-259.
121. Wolfsberg T, Primakoff P, Myles D, White J. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 1995;131:275-278.
122. Valkovskaya N, Kayed H, Felix K, Hartmann D, Giese NA, Osinsky SP, et al. ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* 2007;11:1162-1174.
123. Naus S, Richter M, Wildeboer D, Moss M, Schachner M, Bartsch J. Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metallo-proteinase-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem*. 2004;279:16083-16090.
124. Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, Shimizu E, Kataoka M, Hijiyama N, Matsuurra K. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today*. 1999;20:278-84.
125. Najy A, Day K, Day M. ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res* 2008;68:1092-1099.
126. Gee J, Knowlden J. ADAM metalloproteases and EGFR signalling. *Breast Cancer Res* 2003;5:223-224.
127. Llamazares M, Obaya A, Moncada-Pazos A, Heljasvaara R, Espada J, López-Otín C, et al. The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits anti-tumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway. *J Cell Sci* 2007;120:3544-3552.
128. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989;339:58-61.
129. Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.
130. Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiegand S, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-248.
131. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
132. Moore P. Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:313-315.
133. Gehling U, Ergün S, Schumacher U, Wagenr C, Pantel K, Otté M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-3112.
134. Davidoff A, Ng C, Brown P, Leary M, Spurbeck WW, Zhou J, et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res* 2001;7:2870-2879.
135. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194-1201.
136. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie C. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-346.
137. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001;86:289-297.
138. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:826-835.
139. Roche W. Mast cells and tumour angiogenesis: the tumor-mediated release of an endothelial growth factor from mast cells. *Int J Cancer* 1985;36:721-728.
140. Chantrain CF, Henriet P, Jodele S, Emonard H, Feron O, Courtoij PJ, DeClerck YA, Marbaix E. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer*. 2006;42:310-8.
141. Coults L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*. 2005;438:937-945.
142. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.
143. Bergers G, Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.
144. Hansen S, Grabau D, Sørensen F, Bak M, Vach W, Rose C. Department of Oncology, Odense University Hospital, Odense University, Denmark. Vascular grading of angiogenesis: prognostic significance in breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:339-347.
145. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-739.
146. Fang J, Shing Y, Wiederschain D, Yan L, Butterfield C, Jackson G, Harper J, Tamvakopoulos G, Moses MA. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3884-3889.
147. Zijlstra A, Aimes R, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, et al. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *J Biol Chem* 2004;279:27633-27645.
148. Rundhaug J. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9:267-285.
149. Handsley M, Edwards D. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005;115:849-860.
150. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
151. Carmeliet P. Review article Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-936.
152. Ferrara N and Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-974.
153. Overall C, Kleifeld O. Tumour microenvironment-opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:227-239.
154. Baker A, Edwards D, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727.
155. Palermo C, Joyce J. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:22-28.
156. Sternlicht M, Lochter A, Sympon C, Huey B, Rougier J, Gray J, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999;98:137-146.

157. Savinov A, Remacle A, Golubkov V, Krajewska M, Kennedy S, Duffy M, et al. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:2716-2724.
158. Balbin M, Fueyo A, Tester A, Pendás A, Pitiot A, Astudillo A, et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003;35:252-257.
159. Montel V, Kleeman J, Agarwal D, Spinella D, Kawai K, Tarin D. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression. *Cancer Res* 2004;64:1687-1694.
160. Gorrin-Rivas M, Arii S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, et al. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:1647-1654.
161. Dong Z, Kumar R, Yang X, & Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997;88:801-810.
162. Gorrin-Rivas M, Arii S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, et al. Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000;231:67-73.
163. Acuff H, Sinnamon M, Fingleton B, Boone B, Levy S, Chen X, et al. Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7968-7975.
164. Houghton A, Grisolano J, Baumann M, Kobayashi D, Hautamaki R, Neuhring L, et al. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. *Cancer Res* 2006;66:6149-6155.
165. Yang W, Arii S, Gorrin-Rivas M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer* 2001;91:1277-1283.
166. Hofmann H, Hansen G, Richter G, Taeghe C, Simm A, Silber R, et al. Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:1086-1092.
167. Kerkelä E, Ala-aho R, Klemi P, Grénman S, Shapiro S, Kähäri V, et al. Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J Pathol* 2002;198:258-269.
168. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:83-90.
169. Uría J, López-Otín C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res* 2000;60:4745-4751.
170. Savinov A, Remacle A, Golubkov V, Krajewska M, Kennedy S, Duffy MJ, et al. Matrix metalloproteinase 26 proteolysis of the NH2-terminal domain of the estrogen receptor beta correlates with the survival of breast cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:2716-2724.
171. Sternlicht M, Lochter A, Sympson C, Huey B, Rougier J, Gray J, et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999;98:137-146.
172. McCawley L, Crawford H, King L, Mudgett J, Matrisian L. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:6965-6972.
173. Witty J, Lempka T, Coffey R, Matrisian L. Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:1401-1406.
174. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardashian A, Bassilopoulos P, Trangas T, et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001;84:1488-1496.
175. Takeha S, Fujiyama Y, Bamba T, Sorsa T, Nagura H, Ohtani H. Stromal expression of MMP-9 and urokinase receptor is inversely associated with liver metastasis and with infiltrating growth in human colorectal cancer: a novel approach from immune/inflammatory aspect. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:72-81.
176. Pozzi A, LeVine W, Gardner H. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:272-281.
177. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively J, Maeshima Y, Yang C, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 2003;3:589-601.
178. Andarawewa K, Boulay A, Masson R, Mathelin C, Stoll I, Tomasetto C, et al. Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression. *Cancer Res* 2003;63:5844-5849.
179. Pendás A, Folgueras A, Llano E, Caterina J, Frerard F, Rodríguez F, et al. Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2004;24:5304-5313.
180. Jost M, Folgueras A, Frérart F, Pendás A, Blacher S, Houard X, et al. Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice. *Cancer Res* 2006;66:5234-5241.
181. Irueña-Arispe M, Carpizo D, Luque A. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:183-190.
182. Kuno K, Bannai K, Hakozaiki M, Matsushima K, Hirose K. The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1327-1333.
183. Liu Y, Xu Y, Yu Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 2006;25:2452-2467.
184. Luque A, Carpizo D, Irueña-Arispe M. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem* 2003;278:23656-2365.
185. Lee N, Sato M, Annis D, Loo J, Wu L, Mosher D, et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J* 2006;25:5270-5283.
186. Porter S, Scott S, Sasoon E, Williams M, Jones J, Girling A, et al. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2429-2440.
187. Rocks N, Paulissen G, Quesada F, Polette M, Gueders M, Munaut C, et al. Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC). *Br J Cancer* 2006;94:724-730.
188. Lind G, Kleivi K, Meling G, Teixeira M, Thiis-Evensen E, Rognum T, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol* 2006;28:259-272.
189. Dunn J, Panutsopoulos D, Shaw M, Heighway J, Dorner R, Salmo E, et al. METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC. *Br J Cancer* 2004;91:1149-1154.
190. Dunn J, Reed J, du Plessis D, Shaw E, Reeves P, Gee A, et al. Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br J Cancer* 2006;94:1186-1193.
191. Lo P, Leung A, Kwok C, Cheung W, Ko J, Yang L, et al. Identification of a tumor suppressive critical region mapping to 3p14.2 in esophageal squamous cell carcinoma and studies of a candidate tumor suppressor gene, ADAMTS9. *Oncogene* 2007;26:148-157.
192. Sjöblom T, Jones S, Wood L, Parsons D, Lin J, Barber T, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-274.
193. Jin H, Wang X, Ying J, Wong A, Li H, Lee H, et al. Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas. *Oncogene* 2007;26:7490-7498.