

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACION INMUNOBIOLOGICA DE LINEAS TUMORALES MURINAS
OBTENIDAS EXPERIMENTALMENTE (MCG3, GRA1, GRC3):
CARCINOGENESIS INDUCIDA POR TUMORES

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR EL LICENCIADO
D. CARLOS MUÑOZ RUIZ

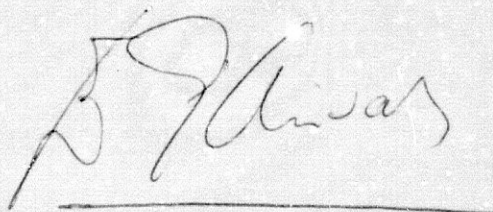
DIRECTORES:

D. CARLOS OSORIO PELAEZ

D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES

DON ENRIQUE GARCIA OLIVARES, PROFESOR TITULAR DE FISIOLOGIA
Y BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICA: Que D. Carlos Muñoz Ruiz, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Caracterización inmunobiológica de líneas tumorales murinas obtenidas experimentalmente (MCG3, GRAl, GRC3): carcinogénesis inducida por tumores"; que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que designe la Facultad de Medicina de Granada.



Granada a 21 de Abril de 1986

DON CARLOS OSORIO PELAEZ, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA GENERAL
QUIMICA BIOLOGICA Y FISIOLOGIA ESPECIAL, DE LA FACULTAD DE_
MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICA: Que D. Carlos Muñoz Ruiz, Licenciado en Medicina
y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Te-
sis Doctoral titulado: "Caracterización inmunobiológica de_
líneas tumorales murinas obtenidas experimentalmente (MCG3,
GRAL, GRC3): carcinogénesis inducida por tumores"; que ha -
finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada
la presente y estando conforme con su presentación para ser
juzgada por el tribunal que designe la Facultad de Medicina
de Granada.



Granada a 21 de Abril de 1986

A mis hijos: Carlos y Ma Angeles
por los dulces momentos que paso
junto a ellos.

A mi mujer: Ma Angeles
Especialmente a mi mujer por
estar junto a mí desde siempre

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor D. Carlos Osorio Peláez, no sólo porque se -
brindó amablemente a dirigirme esta Tesis, sino también -
por el apoyo que repetidamente obtuve de él a lo largo de
todo este tiempo.
- Al Doctor Enrique García Olivares, porque aparte de ser -
el alma de este trabajo, ha sido otras muchas cosas para -
mí, mi amigo, mi maestro y mi más inmediato mentor en es-
te arduo campo de la Inmunología.
- Al Doctor Francisco Gutiérrez Gea, porque nunca me dejó -
perder en vanos empeños y sobre todo por la libertad de -
que siempre disfruté trabajando a su lado, algo que muy -
pocos maestros saben dar.
- A mis amigos Ana, Marcos y Emilio, sobre todo a Emilio -
quien soportó el peso de prácticamente todo el mecanogra-
fiado de esta Tesis.
- Al Doctor Federico Garrido, por las facilidades que me -
brindó de poder realizar parte del trabajo experimental -
en su laboratorio. Y junto a él a Ignacio Algarra por su -
ayuda técnica.
- A Ricardo Sola, por las muchas horas que pasó junto a mí -
guiándome en la realización de las técnicas hematológicas
- Finalmente a todos mis compañeros de la Sección de Inmuno -
logía, porque de una forma o de otra siempre se interesa-
ron por mi trabajo.

INDICE GENERAL

PAGS.

<u>INTRODUCCION</u>	1
I.- Prólogo	1
II.- Biología molecular de las células tumorales ..	4
A.- Aspectos estructurales de las membranas celu- lares tumorales	4
1.- Antígenos tumorales	4
1.1.- Antígenos específicos de tumor (TSA) en tumores inducidos por carcinógenos quí- micos	9
1.2.- Antígenos asociados a proteínas vira - les	13
1.3.- Antígenos específicos de tejido	15
1.4.- Marcadores fenotípicos de función celu- lar	16
1.5.- Antígenos retrogenéticos	17
1.6.- Antígenos del desarrollo, específicos - de estadio	18
1.7.- Antígenos específicos de estirpe celu - lar	19
1.8.- Antígenos crípticos	22
1.9.- Antígenos heterotópicos	24
1.10- Pérdida y aparición de antígenos en las células tumorales	25
2.- Glicolípidos y glicoproteínas en la membra- na de las células tumorales	27
2.1.- Estructura y propiedades biológicas de_ los GSL y GP de la membrana celular ...	28

2.1.1.- Carbohidratos de la superficie celular	28
2.1.2.- Propiedades biológicas	29
2.2.- Cambios en los carbohidratos de la superficie celular que acompañan a la transformación maligna	30
2.2.1.- Cambios en los glicosfingolípidos.	30
2.2.2.- Cambios en las glicoproteínas	34
2.3.- Los carbohidratos de la superficie celular y la regulación del crecimiento tumoral	36
2.4.- Cambios del ácido siálico en la transformación neoplásica y su papel en la expresión antigénica tumoral	37
3.- Fluidez de la membrana y su función en la regulación del proceso tumoral	39
4.- Regulación del metabolismo proteico en la membrana de las células tumorales	44
5.- Productos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en la membrana de las células tumorales	47
5.1.- Expresión variable de Antígenos del CMH en células tumorales	52
5.1.1.- Expresión variable de Antígenos H-2K, H-2D e Ia en tumores murinos.	52
5.1.2.- Antígenos del CMH inducibles en tumores humanos	59
5.2.- Expresión anormal de Antígenos del CMH en células tumorales	60

5.2.1.- Alteraciones cuantitativas en la expresión de antígenos del CMH por células tumorales murinas	60
5.2.2.- Cambios bioquímicos (cualitativos) en los antígenos CMH de células tumorales murinas	64
5.2.3.- Cambios cuantitativos y bioquímicos en la expresión antigénica CMH de células tumorales humanas	68
B.- Aspectos bioquímicos de la célula tumoral ...	71
1.- El ciclo celular en la célula normal	71
1.1.- Fases del ciclo celular	71
1.2.- Bioquímica del ciclo celular	77
1.3.- La lógica del ciclo celular	86
2.- El ciclo celular en las células tumorales .	93
3.- Enzimología de las células neoplásicas	97
3.1.- Enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos	99
3.2.- Enzimas del metabolismo de los carbohidratos	102
3.3.- Enzimas específicas de tejido	106
3.4.- Isoenzimas en los tumores	107
3.4.1.- Lactatodeshidrogenasa	109
3.4.2.- Piruvatokinasa	111
3.4.3.- Hexokinasa	113
3.4.4.- Aldolasa	115
3.4.5.- Fosfatasa alcalina	115
4 . - La célula tumoral frente a los factores reguladores del crecimiento	117

4.1.- TGF	117
4.2.- Chalonas	118
4.3.- Prostaglandinas	119
4.4.- Poliaminas	119
5.- Carcinógenos: clases, mecanismos de acción_ y tipos de lesión inducidos sobre el DNA ..	120
6.- Sistemas básicos de reparación del DNA	123
6.1.- Reparación directa por inversión	124
6.2.- Reparación por excisión	127
6.3.- Reparación postreplicación	131
7.- Oncogenes	131
7.1.- Introducción	131
7.2.- Productos de la transcripción oncogénica	135
7.2.1.- Proteinkinasa	137
7.2.2.- Proteínas que se fijan al guanositri-fosfato (GTP-binding)	138
7.2.3.- Proteínas que se fijan al DNA (DNA-binding)	139
7.2.4.- Factores del crecimiento	139
7.2.5.- Receptores para factores de creci-miento	143
7.3.- Mecanismos de la disregulación de los oncogenes	143
7.3.1.- Mutación puntual en un exón codifi-cador	145
7.3.2.- Translocación de oncogenes	146
7.3.3.- Pérdida de secuencias reguladoras .	150
7.3.4.- Amplificación oncogénica	153
7.3.5.- Otros mecanismos	154

III.- El proceso tumoral: carcinogénesis	157
A.- El estadio de iniciación	158
1.- Factores genéticos	158
2.- Factores epigenéticos	159
B.- El estadio de promoción	160
1.- Factores genéticos	160
2.- Factores epigenéticos	161
C.- El estadio de progresión	162
D.- El estadio de regresión tumoral : una primera vía alternativa en la historia natural del - proceso neoplásico	163
E.- La formación de lesiones "preneoplásicas": - una segunda vía alternativa en la historia na tural del proceso neoplásico	165
F.- Expresión oncogénica durante los estadios del desarrollo neoplásico	165
IV.- El control endógeno del proceso neoplásico: <u>in</u> munovigilancia	167
A.- La hipótesis de la inmunovigilancia	167
B.- Posibles mecanismos efectores de la inmunovi- gilancia	171
1.- Células T	171
2.- Células "Natural Killer"	174
3.- Macrófagos	179
4.- Células citotóxicas naturales	182
5.- Anticuerpos naturales	184
6.- Mecanismos no inmunológicos	187
7.- Mecanismos moleculares de lisis tumoral me- diados por células de estirpe linfoidea ...	189
7.1.- Etapas del proceso lítico	190

7.2.- Antígenos de las células efectoras que intervienen en el proceso lítico	191
7.2.1.- En los linfocitos T citotóxicos ...	191
7.2.2.- En los linfocitos granulares grandes	194
7.3.- Posibles mediadores moleculares de las lesiones en la célula diana	194
7.3.1.- Especies moleculares de oxígeno, altamente reactivas	194
7.3.2.- Factores líticos solubles	195
7.3.3.- Mediadores que no requieren secreción	198
7.3.4.- Componentes de los gránulos citoplasmáticos	199
7.4.- El papel de los gránulos citolíticos en la lisis celular mediada por linfocitos	201
7.4.1.- Formación de lesiones de membrana por gránulos aislados	204
7.4.2.- Desintegración nuclear de las células diana durante el ataque citolítico de las células T	206
C.- El crecimiento de tumores primarios y su control	207
1.- Reactividad inmunológica "in situ" frente a los tumores primarios	208
2.- Control local no inmunológico del crecimiento de tumores primarios	213
D.- La invasión tumoral y las metástasis: su control	214
1.- Invasión tumoral	215

2.- Embolización de células tumorales	217
3.- Asentamiento y crecimiento de la célula tumoral metastásica	218
4.- Control mediado por linfocitos T de las metástasis tumorales	219
5.- Control por macrófagos y células NK de las metástasis tumorales	221
V.- Mecanismos de escape tumoral	223
A.- Cinética tumoral: camuflaje	224
B.- Modulación antigénica	225
C.- Enmascaramiento del antígeno	225
D.- Liberación del antígeno	225
E.- Tolerancia	226
F.- Atrapamiento de linfocitos	227
G.- Factores genéticos	227
H.- Factores bloqueantes	228
I.- Productos tumorales	229
J.- Factores de crecimiento	230
<u>OBJETIVO</u>	231
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	235
I.- Materiales	236
A.- Ratones	236
B.- Líneas celulares tumorales y células normales	236
C.- Material instrumental	237
D.- Soluciones y medios de cultivo	239
E.- Reactivos y componentes especiales	240
II.- Métodos	245

A.- Inoculación tumoral alogénica	245
B.- Estudios serológicos	245
1.- Antisueros	245
2.- Absorciones	246
3.- Prueba de citotoxicidad	251
C.- Adaptación de las células ascíticas a culti - vos "in vitro" y establecimiento como líneas_ celulares continuas	252
D.- Clonación de las células tumorales	253
1.- Preparación de los timocitos	253
2.- Proceso de clonación	254
E.- Análisis de isoenzimas mediante migración - electroforética en gel de almidón	255
1.- Líneas celulares y cepas murinas control ..	255
2.- Preparación de los extractos celulares	256
3.- Cuantificación de proteínas en los extrac - tos	257
4.- Electroforesis	258
4.1.- Protocolo general del estudio electrofo rético para isoenzimas	258
4.1.1.- Montaje de la placa soporte	258
4.1.2.- Preparación del gel de almidón	259
4.1.3.- Disposición de las muestras y migra ción eléctrica	259
4.1.4.- Revelado de las isoenzimas	260
4.2.- Condiciones específicas de migración de isoenzimas	260
4.2.1.- Electroforesis en gel de almidón pa ra isoenzimas de Dipeptidasa I	260

4.2.2.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de Malatodeshidrogenasa o Enzima M _á lico	261
4.2.3.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de Isocitratodeshidrogenasa	263
4.2.4.- Electroforesis en gel de almidón para isoenzimas de Glucosafosfato-isomerasa	264
F.- Determinación de receptores de membrana en las células MCG3, GRA1 y GRC3	265
1.- Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Rosetas Fc gamma)	265
2.- Receptores para la fracción C3b del Complemento (Rosetas EACb)	267
3.- Receptores para la fracción C3d del Complemento (Rosetas EACd)	268
4.- Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina M (Rosetas Fc mu)	269
5.- Determinación del isotipo específico de IgG reconocido por el receptor Fc gamma sobre las células GRA1 y GRC3 (Rosetas linfocito-célula tumoral)	271
5.1.- Aislamiento de linfocitos T mediante rosetas con hematíes de carnero tratados con AET	271
5.2.- Optimización de la densidad de anticuerpos sobre la membrana de los linfocitos T	272
5.3.- Técnica de las rosetas linfocito-célula	

tumoral	274
G.- Rosetas espontáneas tumor-tumor	274
H.- Detección de inmunoglobulinas de membrana ...	277
1.- Determinación de Ig de membrana mediante an ti-Ig fluoresceinada	277
2.- Determinación de Ig de membrana mediante Ig fijada a bolitas de poliestireno	278
I.- Detección de inmunoglobulina intracitoplasmá- tica	278
J.- Estudio de la actividad celular citotóxica - Anticuerpo-dependiente en células MCG3c, GRA1 y GRC3	279
K.- Estudio de la actividad "natural killer" de - células MCG3c, GRA1 y GRC3	283
L.- Actividad "natural killer" y ADCC en células_ GRA1 y GRC3 frente a MCG3	285
M.- Actividad fagocítica en MCG3c, GRA1 y GRC3 ..	285
N.- Estudio citoquímico de las células tumorales_ MCG3c, GRA1 y GRC3	286
1.- Tinción de Fosfatasa Acida	287
2.- Tinción de Fosfatasa Alcalina	287
3.- Tinción de Alfa-naftil-acetatoesterasa	287
4. Tinción de Naftol AS-D acetatoesterasa	288
5.- Tinción de Cloroacetatoesterasa	288
6.- Tinción de las Peroxidasas	288
7.- Tinción de Negro Sudan B	289
8.- Tinción del PAS	290
Ñ.- Capacidad fagocítica de IgG agregada en célu- las GRA1 y GRC3	290
1.- Purificación de Clq humano	291

2.- Marcaje de Clq con I ¹²⁵	293
3.- Aislamiento de Polimorfonucleares de sangre periférica	294
4.- Titulación de la actividad fagocítica de IgG agregada en Polimorfonucleares humanos.	295
5.- Actividad fagocítica de A1, C3 y MCG3	298
O.- Detección de inmunoglobulinas en los extractos y sobrenadantes del cultivo de A1 y C3 mediante enzimoanálisis	300
P.- Actividad bioquímica de Arilsulfatasa en extractos de A1, C3 y MCG3	301
Q.- Detección de antígenos de membrana en MCG3, GRAl y GRC3 con anticuerpos monoclonales	302
1.- Citotoxicidad directa con anticuerpos monoclonales mediada por Complemento	304
2.- Prueba de roseteo indirecto para detección de anticuerpos fijados a membranas celulares	306
3.- Enzimoanálisis cuantitativo para antígenos de superficie	307
<u>RESULTADOS</u>	310
I.- Clonaje de células tumorales MCG3	311
II.- Inoculación tumoral alogénica	311
III.- Estudio del haplotipo H-2 en células C3R ascíticas	313
IV.- Estudio del haplotipo H-2 en células C3R cultivadas	313
V.- Antígenos Thy-1 y específicos de tumor en células	

las C3R	315
VI.- Caracterización de antígenos H-2 de superficie en células MCG3	319
A.- Con antisueros poliespecíficos	319
B.- Con antisueros monoespecíficos	319
C.- Con sueros anti-Ia	322
VII.- Antígenos de diferenciación en células tumora les MCG3	322
VIII.- Antígenos específicos de tumor en MCG3	322
IX.- Caracterización de antígenos H-2 de superficie en células GRC3	322
X.- Antígenos de diferenciación (Thy-1) y específi cos de tumor (BALB/c α MCG3) en células GRC3 ..	328
XI.- Antígenos H-2 de superficie en células GRAl ..	328
XII.- Antígenos de diferenciación (Thy-1) y específi cos de tumor (BALB/c α MCG3) en células - GRAl	337
XIII.- Receptores de membrana: RFc , RFc , RC3b y - RC3d en MCG3, GRAl y GRC3	337
XIV.- Caracterización de RFc en GRAl y GRC3	342
XV.- Rosetas espontáneas tumor-tumor	343
XVI.- Inmunoglobulina de membrana y citoplasmática_ en MCG3, GRAl y GRC3	343
XVII.- Actividad celular citotóxica dependiente de_ anticuerpo y Natural Killer en MCG3, GRAl y_ GRC3	345
XVIII.- Actividad celular citotóxica dependiente de anticuerpo y Natural Killer en GRAl y GRC3_ frente a MCG3	347
XIX.- Isoenzimas en MCG3, GRAl y GRC3	347

XX.- Citoquímica enzimática de GRA1, GRC3 y MCG3 ..	354
XXI.- Actividad fagocítica en MCG3, GRA1 y GRC3 ...	360
XXII.- Enzimoinmunoanálisis de los extractos celulares y sobrenadantes de MCG3 y GRA1	366
XXIII.- Niveles de Arilsulfatasa en MCG3, GRA1 y - GRC3	371
XXIV.- Detección de antígenos de membrana en MCG3, - GRA1 y GRC3 con anticuerpos monoclonales ...	373
XXV.- Análisis estadístico	382
<u>DISCUSION</u>	383
<u>CONCLUSIONES</u>	412
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	414

I N T R O D U C C I O N

I. - PROLOGO

La inmunología tumoral comenzó con el descubri-
miento por Foley en 1953 de que tumores inducidos químicamente en un animal podían dar lugar a respuestas inmunes, cuando se trasplantaban a otro animal singénico. Este autor demostró que una vez eliminado un tumor, implantado subcutáneamente, del animal receptor, quedaba en éste un estado de inmunidad adquirida que evitaba el crecimiento de nuevos implantes de células del tumor extirpado, pero no de otros. El hallazgo fue pronto confirmado por otros investigadores, quienes evidenciaron que la inmunización frente a un implante de células tumorales podía conseguirse con la excisión quirúrgica del tumor o mediante inyecciones repetidas de células tumorales no proliferantes. Estos hallazgos acerca de la inmunogenicidad tumoral dieron paso enseguida a investigaciones sobre el tipo de inmunidad que inducían los tumores. Así, pronto se hizo evidente que la inmunidad frente a tumores singénicos podía transferirse pasivamente de ratones inmunizados frente a un tumor a receptores normales, con células linfoides pero no con suero (Klein, 1966).

Todo este corpus de investigación en lo que podríamos llamar primer periodo de la Inmunología Tumoral, dejaba sentadas las bases de dos hechos fundamentales. Por una parte, que los tumores químicamente inducidos podían ser inmunogénicos; y por otra, la paradoja central de la inmunología tumoral: el crecimiento progresivo de un tumor inmunogénico en un huésped inmunocompetente.

A esta primera época siguió otra caracterizada esencialmente por el análisis de la inmunidad antitumoral in vitro y por los intentos para conseguir la regresión de tumores mediante inmunoterapia. Los estudios in vitro demostraron que el cocultivo de células tumorales, cuya replicación había sido inhibida, con células linfoides de ratones inmunizados con células neoplásicas de la misma estirpe que las primeras, daba lugar a la génesis de células T citolíticas frente a las células tumorales diana (Burton y cols., 1975; Wagner y cols., 1980). Además, esas células T eran capaces de neutralizar el crecimiento de las células tumorales cuando se inoculaban in vivo (Burton y Wagner, 1977).

Sin embargo, excepto casos excepcionales, los numerosos intentos hechos para producir la regresión de tumores establecidos mediante inmunoterapia resultaron fallidos. La conclusión más generalizada era, por tanto, que la mayor parte de los tumores, inmunogénicos o no, cuando se trasplantaban en un animal singénico, eran refractarios a los intentos de producir su regresión por medio de inmunoadyuvantes con capacidad conocida para incrementar la respuesta inmune en general. La incapacidad de un receptor para rechazar un tumor inmunogénico, incluso después de la inyección intratumoral de agentes inmunopotenciadores, llevó al planteamiento y consiguientes intentos de explicar los mecanismos de "escape" tumoral (Kano y Friedman, 1977).

De acuerdo con ciertas evidencias experimentales (Old y cols., 1968; Pike y Snyderman, 1976) se sugirió que los tumores podrían evitar su destrucción por el sistema in

mune ocultando sus antígenos (Ags.) de superficie frente a un mecanismo dado de inmunidad antitumoral, o bien mediante la secreción de factores antiinflamatorios que bloquearían la migración de las células inmunocompetentes del huésped - desde la sangre al lugar de crecimiento extravascular del tumor.

Esta necesidad de encontrar una explicación sobre los mecanismos de escape tumoral se hizo más acuciante cuando se demostró que las células neoplásicas podían ser destruidas no sólo por células T citolíticas, sino también por macrófagos (Fink, 1976) y por células Natural Killer (Herberman y Holden, 1978).

La mayor parte de las explicaciones y mecanismos de escape tumoral propuestos en los primeros momentos han ido perdiendo vigencia a raíz de que en varios laboratorios (Fujimoto y cols., 1976; Small y Trainin, 1976; Reinisch y cols., 1977) se demostrara que ratones con tumores establecidos podían generar células T supresoras.

Han sido varios los ensayos aplicados para demostrar la producción de células T supresoras inducidas por un tumor y, colectivamente, estos ejemplos parecen sugerir la posibilidad de que un huésped no pueda desarrollar uno o varios mecanismos de inmunidad frente a un tumor inmunogénico debido a la presencia de células T con potencialidad probada para suprimir respuestas inmunes en general.

Puede postularse, sin embargo, que las células T

supresoras son productos de una respuesta inmune y por tanto existe la posibilidad de que sean generadas como elementos reguladores de una respuesta inmune antitumoral precedente. Un hecho que apoya este último punto de vista es la expresión paradójica de inmunidad específica frente a un tumor reimplantado en un huésped que ya portaba ese mismo tumor en progresión en otra parte de su organismo. Este aspecto de la expresión de una inmunidad antitumoral concomitante ha recibido poca atención en la literatura especializada en inmunología tumoral y apenas existen análisis experimentales al respecto.

Los ejemplos e implicaciones de la inmunidad antitumoral concomitante han sido revisados por Gorelik en 1983 y de esta revisión se desprende que el análisis de la generación, mantenimiento y pérdida progresiva de la inmunidad concomitante es esencial para conocer por qué tumores inmunogénicos crecen progresivamente en sus huéspedes inmunocompetentes y no se produce su regresión en respuesta a una inmunoterapia activa o pasiva.

II.- BIOLOGIA MOLECULAR DE LAS CELULAS TUMORALES

A.- ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LAS MEMBRANAS CELULARES TUMORALES

1.- Antígenos tumorales.

La superficie de la membrana celular tumoral contiene una mezcla compleja y heterogénea de moléculas (Vid.-

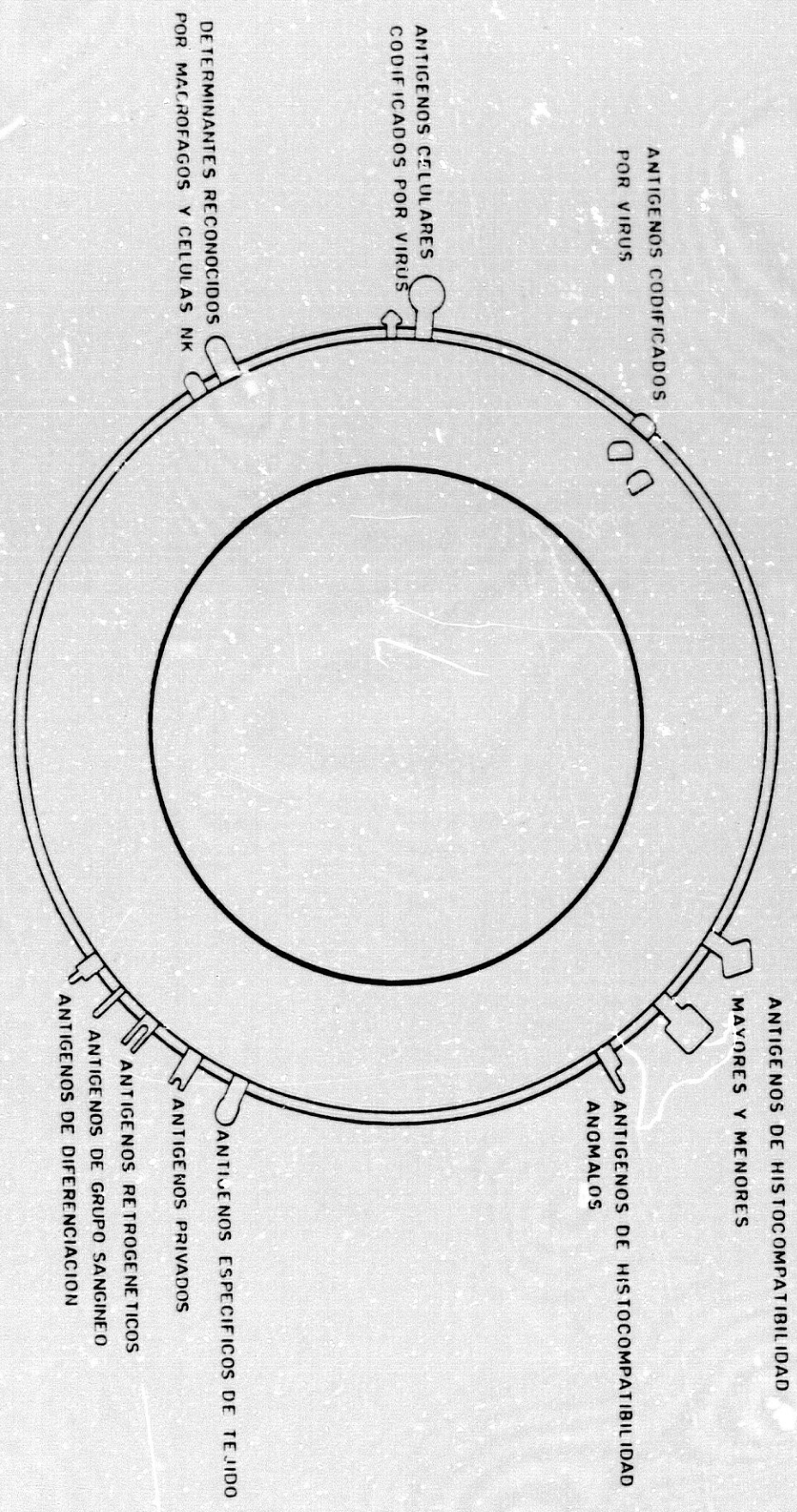
Fig. 1). Estas moléculas pueden ser representativas de las células o tejido normales donde se originó el tumor, o bien de la función y nivel de diferenciación de la célula tumoral; pueden también reflejar diversos cambios asociados a la malignidad del tumor o estar codificados por un virus relacionado o asociado con el tumor en cuestión. Como esas moléculas han sido identificadas principalmente por anticuerpos, se les denomina antígenos asociados con tumores. Además de estos antígenos asociados con tumores, de especificidad definida, muchas células tumorales expresan otros determinantes antigénicos, tales como antígenos de grupos sanguíneos, antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad u otros de mayor ubicuidad específicos de especie o bien conservados filogenéticamente.

En relación con los antígenos tumorales parece conveniente discutir el término "antígenos de trasplante asociados con tumores" o "TATA". Este término engloba una serie de antígenos que provocan el rechazo de las células tumorales que los llevan si se inoculan en huéspedes singénicos preinmunizados. La expresión de estos antígenos es un rasgo de muchos tumores experimentales. El término TATA es, pues, puramente funcional de tal forma que esa capacidad de rechazo tumoral podría deberse, al menos teóricamente, a diferentes tipos de antígenos de la superficie celular (p. ej. embrionarios, virales, de diferenciación, de histocompatibilidad alterados, etc.).

Los TATA de mayor importancia en los tumores experimentales químicamente inducidos parecen ser únicos ("pri-

FIGURA 1: Antígenos tumorales y otras estructuras _
antigénicas de la superficie celular.

FIGURA 1



vados") para cada tumor. Sin embargo, hay dificultades inherentes para definir o considerar un antígeno como específico de un tumor, con independencia del tipo de anticuerpos utilizados en su análisis: en primer lugar un tumor puede expresar anómalamente antígenos de superficie, que no se encuentran en la célula normal de la que aquél deriva, pero que sí están en la membrana de otros tipos celulares normales del mismo individuo. Este hecho podría derivar de la capacidad de un tumor para elaborar productos inapropiados para un mismo estadio de diferenciación en sus correlatos normales. En segundo lugar, debido a que muchos tumores tienen su origen en la expansión clonal de una sola célula, frecuentemente manifiestan antígenos de diferenciación (antígenos que normalmente sólo se encuentran en fases particulares de la diferenciación de un tipo celular normal y que por tanto son expresados por un número muy reducido de células); el ejemplo más característico de lo anterior serían los cuatro fenotipos principales de las leucemias agudas humanas: el perfil antigénico de las células leucémicas es cualitativamente similar a las características de las correspondientes células hematopoyéticas normales. En estas circunstancias, antígenos normales expandidos clonalmente pueden quedar enmarcados como específicos de tumor, especialmente si la célula diana normal que sufre la transformación representa una mínima proporción de las células normales del tejido en que se origina la neoplasia.

Una vez expuesta esta breve introducción sobre algunos aspectos terminológicos de los antígenos tumorales, pasaremos a comentar las distintas clases de ellos que es

posible encontrar en la superficie y el citoplasma de las células transformadas.

1.1.- Antígenos específicos de tumor (TSA) en tumores inducidos por carcinógenos químicos.

La expresión de este tipo de antígenos en tumores inducidos por carcinógenos químicos, representa en cierto modo una paradoja. Sin embargo, estos antígenos que provocan el rechazo solamente de las células tumorales viables provenientes del tumor inmunizante, se han demostrado en tumores inducidos en ratas, ratones y cobayos por una gran variedad de agentes (Baldwin y Price, 1982). Se desconoce si estos antígenos son productos de genes que existen en el genoma de todas las células normales, que en circunstancias normales están reprimidos, de forma que su derrepresión como consecuencia de la transformación maligna por los carcinógenos químicos pudiera llevar a la expresión de productos en la superficie celular que serían reconocidos como antígenos tumorales. Alternativamente, estos genes podrían ser expresados normalmente en una parte muy pequeña de líneas celulares en el organismo, o quizás en estadios específicos de diferenciación, llegando a estabilizarse con la transformación maligna (Graves, 1979). Evidentemente, de estos postulados se infiere que estos antígenos tumorales serían productos celulares normales expresados en un tiempo o en un tejido inapropiados. La hipótesis contraria a la anterior afirma que efectivamente tales Ag específicos de tumor son nuevos productos celulares codificados por genes modificados por el carcinógeno o por mecanismos de control epigené-

ticos alterados que gobiernan la expresión de los genes.

En 1981, Lennox y cols. avanzaron una nueva hipótesis. Este grupo intentó producir anticuerpos monoclonales (Ac Mo) específicos para sarcomas inducidos por 3-Metilcolantreno en ratones B10. Inicialmente, seleccionaron cinco Ac Mo que parecían ser específicos cada uno para un tumor en particular (MC6A), y eligieron uno de estos Ac Mo (4B1) para continuar con el estudio. Sin embargo, cuando incrementaron la sensibilidad de los tests para la detección del TSA, elevando el número de células diana y la cantidad de antiglobulina radiomarcada, demostraron que el Ac 4B1 se unía a otros varios tumores provenientes de B10. Este mismo Ac reaccionaba también con otros tumores de B10 provenientes de células transformadas *in vitro* con carcinógenos químicos o con virus, de tal forma que llegaron a demostrar que los Ags reconocidos por este Ac Mo correspondían a los reconocidos por otro Ac Mo anti-gp70 (Stone y Nwinski, 1980). Además, demostraron que 4B1 se unía a una proteína con un Pm de aproximadamente 70.000 daltons. Estas observaciones sugerían que el Ag definido por 4B1 en las células del sarcoma MC6A estaba relacionado con las moléculas gp70 del virus de la leucemia murina, y puesto que la especificidad de 4B1 parecía indicar que estaba definiendo el TSA de MC6A, se postuló que este tipo de Ags (los TSA) no eran otra cosa que glicoproteínas de superficie recombinantes de los virus de la leucemia murina (MuLV).

Sin embargo, cuando Koch y Smith compararon, mediante estudios electroforéticos bidimensionales en gel,

las glicoproteínasectoras de Concanavalina A del sarcoma MC6A (el tumor descrito por Lennox en 1961) con las de otro sarcoma B10 (MC6B), encontraron que esas glicoproteínas - eran muy similares, si no idénticas, en ambos tumores. Tampoco encontraron diferencias entre ambos tumores en la región de 70.000 daltons, que podían representar los TSA en este caso. Hay evidencias de que esos posibles TSA no son glicoproteínasectoras de Con-A (Sikora y cols., 1979). Ha habido y hay una gran reticencia a aceptar que los TSA - los tumores químicamente inducidos sean glicoproteínas de superficie recombinantes de virus de la leucemia murina, puesto que en tumores con un período de trasplante largo, productos de virus que infectan de forma pasajera dichos tumores, frecuentemente han llevado a confusión la identificación serológica de TSA.

En 1977, Browa y cols. examinaron en una serie de sarcomas murinos inducidos con Metilcolantreno su capacidad para inducir rechazo del trasplante tumoral y la respuesta humoral específica, tras la inmunización de ratones singénicos con células tumorales irradiadas. En cada caso, se demostraron respuestas de rechazo que fueron individualmente específicas para el tumor inmunizante, aunque sólo en una pequeña proporción de huéspedes se detectó la producción de anticuerpos. Estos Ac producían reacciones cruzadas y tanto los tumores que indujeron respuesta humoral como los que reaccionaban con los Ac, eran todos MuLV positivos. Estaba claro que aunque los ratones eran capaces de producir una respuesta de rechazo frente a TSA individuales, elaboraban predominantemente Ac frente a los Ag virales.

Simrell y Klein en 1979 intentaron clarificar esta situación mediante la producción de Ac Mo, realizando gran número de fusiones con esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados con tumores singénicos inducidos químicamente. Obtuvieron Ac que reaccionaban con el tumor inmunizante y varias preparaciones de virus. Uno de los Ac Mo que reaccionaba intensamente con el tumor inmunizante, no lo hacía con preparaciones de MuLV; sin embargo, este Ac reaccionó con otros sarcoma, de forma que no pudo establecerse una especificidad única para el tumor inmunizante.

Ante estas dificultades, Hellström y cols. en 1982 adoptaron un método de aproximación diferente en la preparación de Ac Mo frente a tumores. En lugar de células linfoides de ratones inmunizados frente a tumores singénicos, inmunizaron una rata frente a un carcinoma vesical murino, inducido por Metilcolantreno y más tarde inocularon en el animal un pool de carcinomas vesicales de BALB/c, así como tejidos normales de vejiga urinaria de BALB/c. De esta forma, los posibles Ac Mo serían productos de una inmunización xenogénica y como tales era de esperar que la mayoría de ellos no reconocería Ag inmunogénicos en un huésped singénico. De los Ac Mo obtenidos, uno de ellos precipitaba una proteína de 140.000 daltons, que solamente fue detectada en lisados de células cancerosas de la mucosa de transición vesical, y más débilmente en células vesicales normales. Este estudio demostró la posibilidad de producir Ac Mo de especificidad restringida y, en este caso, "específicos de tejido", de forma similar a la preparación de Ac Mo frente a tumores humanos.

En definitiva, estos estudios ilustran las dificultades existentes para definir y aislar TSA en tumores murinos químicamente inducidos, de forma que no hay pruebas contundentes aún de la existencia real de este tipo de antígenos.

1.2.- Antígenos asociados a proteínas virales.

Son Ag relacionados con las proteínas del virus infectante. Aparecen tanto en los tumores inducidos por virus como en aquellos inducidos por carcinógenos químicos o espontáneos.

En tumores de origen vírico, lógicamente, se detectan antígenos asociados con proteínas codificadas por el virión oncógeno insertado en el genoma celular. Sin embargo en los tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos químicos, posiblemente, su aparición sea debida a la infección por un virus ocurrida posteriormente al origen de las células tumorales. Otra posibilidad es que el genoma de las células normales de ratón contenga material genético viral, normalmente reprimido, que se exprese al producirse la transformación neoplásica (Grant, 1974).

El tipo de proteínas virales varía con el virus inducido en el genoma. Vamos a analizar los antígenos codificados por los MuLV o virus C, que aparte de ser los más conocidos, son virus endógenos de la especie murina.

a) Antígenos grupo-específicos (Aoki y cols.,

1973).- El antígeno gs-1, detectado en la superficie de la célula tumoral (VCSA, Viral Cell Surface Antigens), es especie-específico, encontrándose sólo en la raza murina. El gs-3, también VCSA, es interespecie-específico, detectándose en tumores de ratón y otros mamíferos. El GCSA (b) (Gross Cell Surface Antigens) parece ser idéntico al gs-1.

Todos estos antígenos están probablemente ligados a la proteína viral p30.

Otras proteínas virales presentes en la membrana con determinantes grupo-específicos son la p5, p10, p12 y p70, aunque todas ellas también presentan antígenos tipo-específicos.

b) Antígenos subgrupo-específicos (Old y cols., - 1964).- Se han definido dos VCSA: el EMRGi, común a los virus Friend, Moloney, Rauscher y Graffi y el GCSA (a), característico del virus Gross. Ambos se encuentran ligados a la proteína viral p15.

c) Antígenos tipo-específicos (Eckner-Steeves, - 1972). El antígeno GIX, detectado en células normales y tumorales, se encuentra asociado con la proteína gp70. Esta proteína, aparte de determinantes grupo-específicos, presenta también determinantes tipo-específicos dependientes del tipo de virus: G-VEA (Gross, M-VEA Moloney), R-VEA (Rauscher), F-VEA (Friend) y Gi-VEA (Graffi). Todos estos antígenos se detectan en la membrana celular y en la envuelta del virus (VEA: Viral Enveloppe Antigens).

Los determinantes asociados a las proteínas virales pueden inducir reacciones inmunes celulares y humorales y ser la causa de reacciones cruzadas "in vivo" e "in vitro" entre los distintos tumores, pero no parecen comportarse como auténticos TSTA (Liu y cols., 1977).

1.3.- Antígenos específicos de tejido.

Los marcadores de diferenciación restringidos a células maduras representan normalmente componentes citoplasmáticos o productos secretorios únicos (Gairacross y cols., 1982; Gusterson y cols., 1982). Por ejemplo, las inmunoglobulinas son sintetizadas exclusivamente por células plasmáticas y, por tanto, son buenos marcadores de células plasmáticas maduras, linfocitos B y células malignas de esta estirpe (Greaves, 1981). La fosfatasa ácida prostática y el antígeno prostático son marcadores específicos del carcinoma de próstata (Lillehoj y cols., 1982); la serotonina para las células neuroendocrinas de los tractos digestivo y respiratorio (Cuello y cols., 1982) y la mioglobina para las células musculares estriadas (Neville y cols., 1982). Excepto éstos y algunos otros productos celulares, la mayor parte de las moléculas estructurales o secretorias que inicialmente se consideraban como específicas de células o tejidos no tienen una distribución tan restringida como en un comienzo se pensó. Los Ac Mo producidos frente a glóbulos grasos de la leche humana no sólo han reaccionado con células de mama y células de carcinoma de mama, sino también, en proporciones diversas, con células de epitelio colónico y gástrico, de hígado y páncreas (Foster y cols., 1982a; -

Foster y cols., 1982b). Ac Mo que en su día fueron propuestos como específicos para células de melanoma, reaccionaron posteriormente con otros tipos de células (Hellström y cols. 1982), al igual que ocurrían con los Ac Mo frente a tumores gastrointestinales (Atkinson y cols., 1982; Herlyn y cols., 1979).

1.4.- Marcadores fenotípicos de función celular.

La utilización de Ac Mo para caracterizar fenotípicamente diversas poblaciones celulares funcionalmente distintas, ha tenido su máxima utilidad y expansión en la subclasificación de linfocitos y tumores originados de los diversos tipos de células linfoides (Koziner y cols., 1982; - Marshall-Clarke y cols., 1982; Reinherz y cols., 1979; - Reinherz y Schlossman, 1980; Ritz y Schlossman, 1982; - Ruitter y cols., 1982; Rumbold y cols., 1982).

Goldstein, Lifter y Mittler han obtenido grupos - de Ac Mo conocidos como Anticuerpos OKT, que han sido utilizados para definir subgrupos de linfocitos T humanos normales, sobre la base de su fenotipo de superficie (Ac Mo OKT3 OKT4, OKT5 y OKT8). Otros anticuerpos de esta serie, además de reaccionar con células de la serie T, lo hacen con otras de estirpe no linfoblastoide. Por ejemplo, OKT6 reacciona - con las células de Langerhans de la piel y ciertos neuro - blastomas (Goldstein, Lifter y Mittler, 1982), mientras que OKT9 reconoce el receptor para transferrina y con células - en periodo de división de muchos tejidos (Goding y Burns, - 1981). A pesar de estas reacciones cruzadas, estos y otros

Ac Mo han sido utilizados con éxito para la clasificación - de linfocitos en diversas enfermedades y para diseccionar - la ontogenia de las diferentes neoplasias linfoides (Beverley, Lindh y Delia, 1980; Tidman y cols., 1981).

1.5.- Antígenos retrogenéticos.

Ciertos tumores exhiben antígenos o sintetizan - proteínas que normalmente son expresados o sintetizados en - cantidades similares por los tejidos fetales y se pensaba - que no lo eran por los tejidos maduros del adulto. Este fe- nómeno, conocido como "expresión retrogenética", dio lugar - a la acuñación del término "antígenos oncofetales" para de- signar estos antígenos y puntualizar las a menudo llama- das similitudes entre las células neoplásicas y las feta- les en diversos estadios de su desarrollo y maduración.

Los antígenos oncofetales clásicos eran productos secretorios tales como la alfa-fetoproteína, producida por - las células del hígado fetal y hepatomas (Van Heyningen y - cols., 1982; Uotila, Engvall y Ruoslahti, 1980), o bien mar- cadores de superficie de las células fetales, tales como el CEA, encontrado en las células intestinales fetales (Gold y Freedman, 1965), o las proteínas oncoplacentarias SP1 y - PALP en las células de la placenta (Engvall, Miyashita y - Ruoslahti, 1982; Fishman, 1974). Subsecuentemente se descu- brió que todos estos antígenos oncofetales eran expresados - en pequeñas cantidades sobre células maduras, apuntando a - diferencias cuantitativas más que cualitativas con respecto a la expresión de moléculas específicas en las células tumo

rales y órganos fetales por una parte y los tejidos adultos maduros por otra (Goldstein, Rogers y Harris, 1982; Lennox y Sikora, 1982).

1.6.- Antígenos del desarrollo, específicos de estadio.

Durante muchos años los embriólogos han investigado la presencia de moléculas particulares en la superficie celular, que pudieran definir las células de un estadio específico del desarrollo embrionario. Con la utilización de Ac Mo se han caracterizado diversos determinantes antigénicos que aparecen en determinadas fases de la embriogénesis. Estas moléculas o haptenos, además de marcar distintas fases del desarrollo, podrían también tener algo que ver con la comunicación célula a célula y por tanto tener importantes funciones morfogenéticas (Solter y Knowles, 1979). Teóricamente, los tumores provenientes de células en determinado estadio del desarrollo, podrían expresar los antígenos embrionarios específicos de ese estadio característicos de esas células. Un ejemplo de esta hipótesis lo constituyen las células de carcinoma embrionario murino, que parecen ser el contrapunto tumoral de las células embrionarias del blastocisto y las del botón embrionario en los primeros estadios de la implantación (Damjanov y Solter, 1974; Solter y Damjanov, 1979). Utilizando células de un carcinoma embrionario como inmunógeno, Damjanov y Solter obtuvieron un Ac Mo que reaccionaba no sólo con las células inmunogénicas originales, sino también con determinadas células embrionarias normales de la primera etapa del desarrollo. La presencia de este supuesto antígeno embrionario específico de es-

tadio, tanto en las células tumorales como en sus precursores normales en el embrión, hace suponer que las características de la superficie celular tumoral podría realmente ser muy similar a la de su célula de origen. Comparando la superficie de las células embrionarias y tumorales, podría determinarse el grado exacto de desarrollo embrionario en el cual tuvo lugar la transformación maligna, lo que supondría la inmortalización de células de un fenotipo embrionario particular.

La experiencia acumulada hasta ahora es que los Ac Mo frente a antígenos embrionarios específicos de un estadio determinado, reconocen determinantes antigénicos que no están restringidos a las células embrionarias. La experiencia con Ac Mo frente a antígenos embrionarios de ratón (SSEA-1 y SSEA-3) ha demostrado que esos determinantes (o determinantes que tienen reacción cruzada con aquéllos) aparecen en determinadas poblaciones celulares de embriones más desarrollados, en el feto y en el animal adulto (Fox y cols., 1982a; Fox y cols., 1982b)

1.7.- Antígenos específicos de estirpe celular.

Con algunas excepciones, la mayor parte de los tumores humanos parecen originarse de una célula única o un pequeño grupo de células que han sufrido transformación maligna (Friedman y Fialkow, 1976). Incluso en los casos documentados de malignización multiclonal, puede retrotraerse el origen de la mayor parte de esos tumores hasta un componente de ese tejido, tal como el epitelio o el mesénquima.

En un esfuerzo para determinar la histogénesis exacta de los tumores, los patólogos han comparado las células neoplásicas con las células normales del mismo tejido, intentando probar la existencia de un continuum genealógico entre las células normales y las malignas. De forma similar los embriólogos han intentado establecer la clonalidad de los tejidos normales en el desarrollo embrionario y relacionar cada tejido con las capas germinales clásicas -- ectodermo, endodermo y mesodermo --. Con la introducción de los Ac Mo los estudios de este tipo han recibido un gran impulso (Cairncross y cols., 1982; Colcher y cols., 1981; Köhler y Milstein, 1975), pero los resultados hasta ahora son inconclusos.

Diversos estudios con Ac Mo frente a diversos Ag de células embrionarias (Edwards, Foster y McIlhinney, 1980; Knowles, Rappaport y Solter, 1982; Chevinsky y cols., 1982; Stern y cols., 1978) han demostrado la discontinuidad en la expresión de tales Ag a lo largo del desarrollo de una línea celular embrionaria, lo que podría indicar que tales Ag no son adecuados para estudios de líneas celulares evolutivas. Otra hipótesis alternativa sería que, o bien el concepto de "líneas celulares rígidas" no es aplicable a la embriología o la oncología, o bien la diversidad inherente a los tejidos en desarrollo o a tumores enmascara las características clonales de las células malignas y de las normales.

La investigación de marcadores de superficie específicos para una estirpe celular en los tumores, es incluso más complejo si se tiene en cuenta la heterogeneidad de las

células tumorales a medida que el tumor se desarrolla, progresa y metastatiza.

Todos los estudios de poblaciones celulares tumorales con Ac Mo descritos hasta ahora, han coincidido en señalar que los Ac no reaccionan con todas las células de un tumor dado. Esta falta de reactividad en algunas células, podría deberse a una fijación inadecuada u otros artefactos técnicos, a diferentes niveles de maduración en distintas poblaciones celulares, a camuflaje, pérdida o cambios conformacionales de los determinantes antigénicos o a su expresión sólo durante algunos momentos del ciclo celular (Albino y cols., 1981; Ball y cols., 1982; Hancock, Becker y Atkins, 1982; McKay y Hochfield, 1982). Cualquiera que sea la explicación, todos los estudios remarcan la heterogeneidad de la célula tumoral, y que aquélla es más pronunciada in vivo (Fox y cols., 1983), probablemente a causa de la influencia del huésped sobre el tumor.

Los trabajos sobre células de la misma estirpe han avanzado considerablemente con la obtención de Ac Mo frente a varias proteínas del citoesqueleto; nos referimos especialmente a las proteínas de los filamentos intermedios (Hickey y cols., 1983; Lazarides, 1982; Lee, Wu y Schlaepfer, 1982; Woodcock-Mitchell y cols., 1982). Los filamentos intermedios se clasifican en cinco categorías principales: keratina, vimentina, neurofilamentos, proteínas fibrilares ácidas gliales y desmina. Inicialmente se pensó que cada una de estas clases de filamentos intermedios tenían su distribución restringida a estirpes celulares diferentes: la

queratina a las células epiteliales; la vimentina a células mesenquimatosas; la desmina a células musculares; los neurofilamentos a células neuronales; y las proteínas fibrilares ácidas a las células gliales. Sin embargo, algunos tumores de origen aparentemente mesenquimatoso, tales como los sarcomas de células sinoviales, pueden expresar queratina o vimentina. Por otra parte, las células epiteliales crecidas *in vitro* (carcinomas) expresan vimentina, un marcador de las células mesenquimatosas, así como queratina, un marcador de las células epiteliales. Así pues, la expresión de moléculas ontogénicamente estables, tales como las proteínas del citoesqueleto, pueden sufrir modulación debido a influencias epigenéticas. Estos hechos revelan la cautela que debe tenerse a la hora de asignar un Ag a una estirpe celular determinada.

1.8.- Antígenos crípticos.

Algunas moléculas complejas en la superficie de células normales no son reconocidas por un Ac debido a la presencia en ellas de cadenas terminales que enmascaran el determinante antigénico (Liabeuf y cols., 1981). A veces, estos Ag crípticos pueden ser puestos de manifiesto mediante la digestión enzimática del componente que los camufla. Igualmente, si una molécula no es sintetizada de forma completa, hecho que ocurre frecuentemente en las células tumorales, entonces puede que la parte no sintetizada sea el componente de camuflaje, con lo cual el Ag no se detectará en el tejido normal, salvo que se practique un tratamiento enzimático previo. Los dos ejemplos mejor conocidos de Ag -

críticos son el llamado Ag de Thomsen-Friedenreich (T-ag)- y el Ag de Forssman (Cooper, 1982; Cooper, Cox y Patchefsky, 1980; Nowinski y cols., 1980; Rahman y Longenecker, 1982; - Stern y cols., 1978; Williams y cols., 1982).

El T-ag puede detectarse en la superficie de los eritrocitos humanos, si se someten a un tratamiento previo con neuraminidasa, que elimina los residuos terminales de ácido siálico de las glicoproteínas, descubriendo el grupo inmunodominante β -Gal (1 \rightarrow 3) α -GalNAc (Rahman, Longenecker, 1982). El T-ag se ha detectado también en la superficie celular de adenocarcinomas humanos del colon (Cooper, 1982).- En las células normales el determinante antigénico queda enmascarado por los residuos terminales de ácido siálico, - mientras que en las células neoplásicas esos residuos no - aparecen en las glicoproteínas T-ag, dejando libre el epitopo para poder reaccionar con anticuerpos o lectinas.

El antígeno de Forssman es el prototipo clásico de Ag crítico. La presencia de este Ag ha sido descrita en eritrocitos de carnero, pero no en los glóbulos rojos humanos normales. El epitopo inmunodominante del Ag de Forssman reside en la secuencia GalNAc (α 1 \rightarrow 3) GalNAc (β 1 \rightarrow 3), que - está unida a una ceramida por medio de dos o tres residuos de carbohidratos. Aunque el Ag de Forssman no está presente en los eritrocitos humanos normales, los Ac anti-Forssman - presentan reacción cruzada con hematíes del grupo A1 que - llevan la secuencia GalNAc (α 1 \rightarrow 3) Gal sin la fucosa terminal. El Ag de Forssman se expresa sobre los hematíes humanos en determinadas situaciones patológicas, al igual que -

en algunas células neoplásicas, tales como linfocitos leucémicos (Springer, 1971). La aparición de reactividad Forssman se debe probablemente a la carencia de ácido siálico terminal o de fucosa en los oligosacáridos que contienen la secuencia GalNAc ($\alpha 1 \rightarrow 3$) GalNAc. El Ag Forssman ha sido detectado también en células embrionarias murinas en los primeros estadios de desarrollo (Williams y cols., 1982) y en células de carcinoma embrionario murino (Stern y cols., 1978).

1.9.- Antígenos heterotópicos.

Los determinantes antigénicos que en circunstancias normales se hallan restringidos a un tejido, pero que en condiciones patológicas pueden aparecer sobre células tumorales originarias de otro órgano o tejido, se llaman Ag heterotópicos. Las diversas hormonas secretadas por tumores provenientes de un órgano no endocrino, constituyen los mejores ejemplos de esta serie. Puesto que todas las células del organismo tienen el mismo genotipo, pero diferentes porciones del genoma son reprimidas o expresadas selectivamente en los distintos órganos y células, la síntesis heterotópica de proteínas inapropiadas probablemente sea una consecuencia de la regulación anormal en la expresión genética (Solter y Damjanov, 1979).

La producción ectópica de péptidos hormonales por tumores de órganos no endocrinos es un hallazgo común, constituyendo frecuentemente un elemento útil en el diagnóstico y manejo de estos tumores, de forma que la obtención de Ac

En frente a estas hormonas o pseudohormonas podría tener una aplicación muy importante en la oncología clínica. Será posible determinar si secretan la hormona realmente, o parte de la molécula, o una molécula no relacionada estructuralmente que sólo mimetiza la función de aquélla.

1.10.- Pérdida y aparición de antígenos en las células tumorales.

Los antígenos tisulares con distribución orgánica muy amplia, como los antígenos de los grupos sanguíneos o los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, han sido estudiados en los tumores por dos razones fundamentales: en primer lugar, en los tumores originados en tejidos portadores del Ag o Ags en cuestión, la pérdida de tal o tales Ags de la superficie celular tumoral, podría indicar una malignización progresiva. Por el contrario, la aparición de esos antígenos en células tumorales originarias de un tejido no portador del Ag, podría servir como marcador elemental de malignización incipiente.

Los Ags de los grupos sanguíneos están presentes en la superficie de casi todas las células normales del organismo (Hakomori, 1981; Szulman, 1980); sin embargo, dichas moléculas no se expresan en algunos tipos de células malignas. En tumores de células de transición vesicales y tumores epiteliales glandulares de colon se ha encontrado una buena correlación entre la pérdida de Ags de los grupos sanguíneos y el incremento de la malignidad tumoral (Cooper Cox y Patchefsky, 1980). Por otra parte, el Ag de los hema-

tíes humanos Le^b se expresa selectivamente en células cancerosas gastrointestinales (Brockhaus y cols., 1981).

En cuanto a los Ags del complejo mayor de histocompatibilidad en los tumores, aunque después dedicaremos una sección entera a este capítulo, reseñaremos aquí algunos detalles. Los Ags de clase I (HLA-A, B, C), al igual que los Ags de grupos sanguíneos, tienen una distribución celular amplia, mientras que los de clase II (HLA-DR fundamentalmente) tienen una ubicación tisular más restringida (Bahttacharya, Dorf y Springer, 1981; Fleming y cols., 1981; Parham y cols., 1982; Ruitter y cols., 1982). Estos Ags no se expresan en células de nevus o melanocitos normales de la piel, pero pueden detectarse en las superficies de melanocitos malignos, sugiriendo que la aparición o expresión de estos Ags está relacionada con la alteración celular maligna (Ruitter y cols., 1982).

Thompson y cols. (Thompson y cols., 1982) monitorizaron un gran número de tumores con técnicas inmunohistoquímicas y encontraron Ags HLA-DR en la superficie de todas las metástasis tumorales y en muchos tumores primarios, en algunos de sus precursores premalignos e incluso en algunos tumores benignos. La significación biológica de estos hallazgos está aún por ver, sin embargo es posible que este tipo de marcador pudiera utilizarse para detectar cambios neoplásicos tempranos, para evaluar el grado de diferenciación y malignidad de tumores ya desarrollados y para estudiar la estabilidad y variaciones fenotípicas en las poblaciones celulares de un tumor. Debido a la considerable hete

rogeneidad de los Ags de histocompatibilidad de clase II - (Accolla y cols., 1982; Carrel y cols., 1981; Quaranta, Pellegrino y Ferrone, 1981), la utilización de Ac Mo frente a ellos podría determinar si la molécula o moléculas presentes en un tumor son las mismas o distintas que en las células normales de las que provienen, es decir, si tienen modificaciones estructurales anómalas. MacLean y cols. detectaron en 1982 determinantes antigénicos de tipo HLA-A, B, C y HLA-DR en líneas celulares de carcinoma colorrectal humano (MacLean y cols., 1982).

2.- Glicolípidos y glicoproteínas en la membrana de las células tumorales.

En el proceso de transformación de una célula normal a una maligna acontecen cambios diversos en los componentes de la superficie celular que determinan propiedades importantes de las células cancerosas. Estas propiedades incluyen: pérdida de la inhibición por contacto, disminución de la adherencia, aceleración de la tasa de crecimiento, supervivencia prolongada, expresión de nuevos Ags y escape de la destrucción inmune por los sistemas defensivos del huésped. Se piensa que los carbohidratos de la superficie celular determinan muchas de estas propiedades. Dichos carbohidratos pueden presentar, al menos potencialmente, multitud de especificidades individuales, reflejadas en los Ags de la membrana celular, en virtud de su distinta composición en monosacáridos y enlaces entre ellos, así como variaciones de secuencia y configuraciones anoméricas observadas en los oligosacáridos asociados a los lípidos y las proteínas.

Los carbohidratos se distribuyen entre tres clases de productos bioquímicos integrados en las membranas, a saber, glicoesfingolípidos (GSL), glicoproteínas (GP) y mucopolisacáridos (MPS). De estos compuestos, los GSL y las GP son considerados componentes integrales de las membranas celulares (Leninger, 1968; Singer y Nicolson, 1972).

La mayor parte de los antígenos asociados con tumores son GSL o bien GP y, en muchos casos, los carbohidratos de estas moléculas llevan los determinantes antigénicos (Ruoslahti y Engvall, 1978).

2.1.- Estructura y propiedades biológicas de los GSL y GP de la membrana celular.

2.1.1.- Carbohidratos de la superficie celular.

En las superficies celulares se encuentran muchos GSL y GP estructuralmente diferentes, debido a los monosacáridos particulares que contienen, a la naturaleza de los enlaces y configuración anomérica. Aunque se conocen más de 100 monosacáridos diferentes, solamente siete de ellos han sido detectados en las GP y GSL de las superficies celulares de los mamíferos: ácido siálico (ácido acilneuramínico) N-acetil D-glucosamina, N-acetil D-galactosamina, D-galactosa, D-glucosa, D-manosa y L-glucosa. Los glicoesfingolípidos de las células de mamíferos carecen de manosa, conteniendo, a menudo, glucosa como azúcar de unión con la parte lipídica de la molécula.

El componente lipofílico de los GSL contiene va-
rios ácidos grasos unidos por medio de un enlace amida a
una base amino diol de cadena larga llamada esfingosina. El
componente hidrofílico de los GSL consta de uno o varios mo-
nosacáridos. Los monosacáridos de los glicoconjugados (GSL
y GP) están unidos entre sí por enlaces glicosídicos entre
el carbono anomérico de un monosacárido y uno de los varios
grupos hidroxilo del otro monosacárido (1→2, 1→3, 1→4, -
1→6, 2→3, 2→8), produciéndose una configuración α o β
del enlace. Hay GSL que contienen oligosacáridos más comple-
jos; éstos se forman por la adición secuencial de monosacá-
ridos a otros oligosacáridos más simples con la interven-
ción de las glicosiltransferasas de la membrana celular (-
Vid. Fig. 2).

Determinados oligosacáridos de las glicoproteínas
de membrana se unen a la parte proteica, por medio de un en-
lace glicosilamina o N-glicosídico entre N-acetilglicosila-
mina y los residuos asparagina del polipéptido (este tipo
de enlace es estable en medios alcalinos). Otros oligosacá-
ridos se unen a las proteínas a través de un enlace O-glico-
sídico entre N-acetilgalactosamina y residuos de serina o
treonina (este enlace es inestable en medios alcalinos). En
algunos casos los sacáridos se unen O-glicosídicamente a un
residuo hidroxilisina del polipéptido, tal como ocurre en
el colágeno.

2.1.2.- Propiedades biológicas.

Hasta hace poco se ignoraba casi todo acerca del

papel funcional de los carbohidratos asociados a las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana. Actualmente, sin embargo, se conoce bien la actividad de muchos de estos carbohidratos gracias a los avances logrados en el conocimiento de su distribución celular, a través de su aislamiento y reconstitución en células deficientes en ellos. En la Tabla I se describen las actividades biológicas de algunos GSL y GP.

2.2.- Cambios en los carbohidratos de la superficie celular que acompañan a la transformación maligna.

Los cambios que tienen lugar en los sacáridos de la superficie celular con la aparición del proceso tumoral, suelen consistir en una reducción o elongación de los oligosacáridos de GSL y GP, o bien en la aparición de oligosacáridos anormales, con modificación en la composición de los monosacáridos constitutivos.

2.2.1.- Cambios en los glicoesfingolípidos.

Cambios en la composición de los GSL han sido observados en diversos tipos de tumores, dando lugar en conjunto, a alteraciones fenotípicas características, con relativa independencia del agente transformante (virus DNA, virus RNA, carcinógenos químicos, Rx, etc.) (Hakomosi, 1975).

El cambio más común es la reducción en el tamaño de la cadena del azúcar en diversos tipos de GSL (glicolípidos neutros, gangliósidos y fucolípidos). Esta alteración -

TABLA I

FUNCIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS EN MEMBRANAS CELULARES DE MAMIFERO

FUNCIONES RECONOCIDAS	DE LOS SACARIDOS UNIDOS A GLICOPROTEINAS (G.P.)	O. LOS SACARIDOS UNIDOS A GLICOSFINGOLIPIDOS (G.S.L.)
* PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	<p>· VISCOSIDAD DE LA MUCINA (AC. SIALICO)</p> <p>· PROPIEDADES ANTICONGELANTES DE ALGUNAS GP.</p>	NO CONOCIDAS.
* FUNCIONES HOMEOSTATICAS	<p>· SUPERVIVENCIA DE G.P. EN PLASMA (AC. SIALICO)</p> <p>· SUPERVIVENCIA DE GRANULOCITOS, PLAQUETAS Y LEUCOCITOS (AC. SIALICO)</p> <p>· HOMING DE LINFOCITOS Y CELULAS TUMORALES (AC. SIALICO)</p>	SUPERVIVENCIA DE G.S.L. EN PLASMA
* PROPIEDADES DE RECEPTORES:		
1 RECEPTORES DE VIRUS	NO CONOCIDAS	GANGLIOSIDO PARA EL VIRUS SENDAI
2 RECEPTORES HORMONALES	SITIO DE RECONOCIMIENTO DE LA HORMONA EN LA G.P. RECEPTORA (AC. SIALICO Y GALACTOSA)	GANGLIOSIDO RECEPTOR DE LA TIROTROPINA (GD1b, GT, GM1, GM2+GM3, GD1a)
3 RECEPTORES DE SEROTONINA	ACIDO SIALICO DE LA G.P.	GANGLIOSIDOS RECEPTORES PARA LH, GONADOTROPINA Y FSH
4 RECEPTORES DE TOXINAS BACTERIANAS	NO CONOCIDO	GANGLIOSIDO
5 RECEPTORES PARA EL INTERFERON		GANGLIOSIDOS: -GM1, GD1a, GD1b, GT PARA EL TOXOIDE TETANICO -GT, GD, GM1 PARA LA TOXINA BOTULINICA -GM PARA LA TOXINA DEL COLERA -GM1 PARA LA ENTEROTOXINA DE E. COLI
* DETERMINANTES ANTIGENICOS:		GANGLIOSIDO GM2, GT
1 EN AGS. ASOCIADOS CON TUMORES	· CEA, AFP	· CITOLIPINA-H, CITOLIPINA-R · FARAGLOBOSIDO, ASTALO-GM2
2 EN AGS. DE GRUPOS SANGUINEOS	· A, B, O, MN	· A, B, O, GSC NEUTRO DE LEWIS
3 AGS. DE FORSMAN	NO CONOCIDA	· CERAMIDO DE UN PENTASACARIDO ASOCIADO
* ADHESION Y AGREGACION CELULARES:	· PROTEINA LETS	· NO CONOCIDA
	· AGREGACION DE CELULAS NEURALES	
	· AGREGACION CELULAR EN TERATOMAS	
* TRANSPORTE:	· TRANSPORTE ANIONICO EN HEMATIES	· TRANSPORTE Na+/K+ POR EFECTO DE LA TOXINA DEL COLERA A TRAVES DEL GANGLIOSIDO AL QUE SE FIJA
		· TRANSPORTE DE Na+ Y ENTRADA DE K+ EN LA CELULA

probablemente radique en la disminución de la actividad de determinadas glicosiltransferasas, tales como N-acetil galactosaminiltransferasa, galactosiltransferasa, fucosiltransferasa o sialiltransferasa (Keenan y Morré, 1973; Fishman y cols., 1974). Algunos ejemplos de bloqueo en la síntesis de GSL aparecen en la Fig.2. Esta inhibición de alguno o algunos pasos en la vía sintética de un GSL puede llevar al acúmulo de los glicolípidos precursores. Algunas células transformadas por virus DNA muestran una tendencia opuesta a la descrita anteriormente, llevando a la síntesis de lípidos más complejos que los existentes en las células precursoras normales (Yogeeswaran y cols., 1972).

Estos cambios de los GSL, vistos en diferentes tipos de transformación, parece que no se deben a cambios fenotípicos incidentales tardíos, puesto que en las transformaciones celulares con virus DNA y RNA, los GSL alterados aparecen desde las primeras fases (Steiner y cols., 1973; Gahmberg y cols., 1974).

La presencia o ausencia de ciertos GSL, tales como globósidos o el glicolípidio de Forssman, en las células transformadas, no parece tener relación alguna con la mayor o menor malignidad de aquéllas. Sin embargo, sí parece existir esa correlación con otros GSL, como el gangliósido GM3 (Sakiyama y Robbins, 1973).

Ciertos glicolípidos, tales como el cerámico globósido tetrasacárido o el Ag de Forssman, son más accesibles al radiomarcaje de superficie en las células transfor-

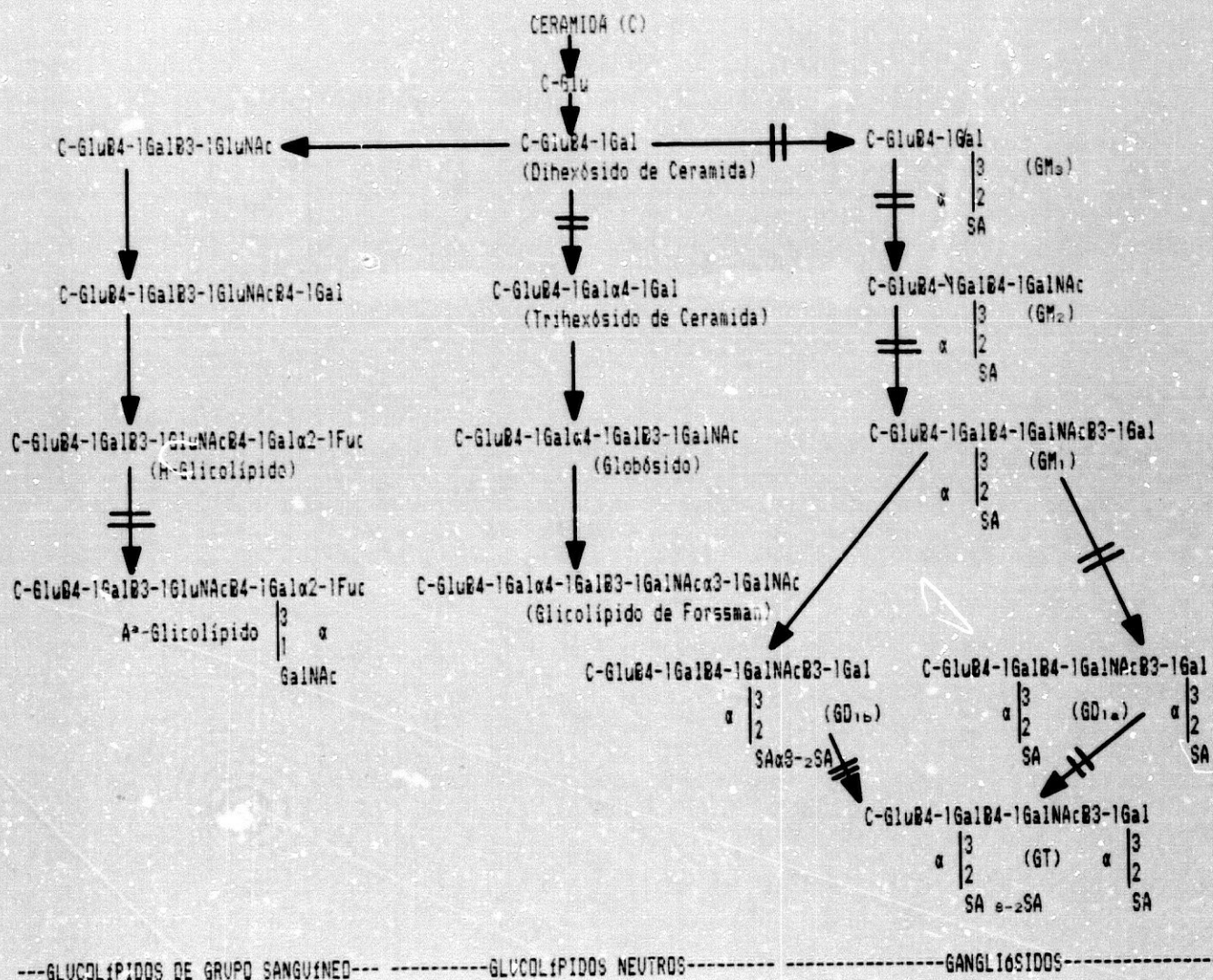


FIGURA 2

Rutas biosintéticas probables de los GSL principales de la membrana celular, indicando diversos ejemplos conocidos de bloqueo (=) en la biosíntesis de diversos GSL en varios sistemas tumorales.

medas, aunque su concentración sea mucho menor que en las células normales (Gahmberg y Hakomori, 1975). Esto indica que en las células tumorales los GSL, aparte de alteraciones en su concentración, también sufren cambios en su organización interna.

2.2.2.- Cambios en las glicoproteínas.

En general, las alteraciones de las GP de membrana en las células tumorales pueden agruparse en tres tipos distintos:

- Pérdida de GP de alto peso molecular.
- Incremento de sialilfucoglicopéptidos de alto peso molecular.
- Alteración de la capacidad de unión de lectinas a las GP de superficie.

a) Pérdida de GP de alto peso molecular.- Mediante métodos inmunológicos y técnicas de radiomarcage con la topoxidasa y galactosaoxidasa, varios grupos de investigadores han demostrado que las células normales (humanas, de rata, de ratón, de hamster y de pollo) contienen una glicoproteína en la membrana, de alto peso molecular (200-250 K daltons), que está ausente en las células tumorales (Hynes, 1976). Esta proteína ha recibido diversas denominaciones: - glicoproteína a, proteína altamente sensible a la transformación (LETS), proteína Z y fibronectina (Reiber y cols., 1975; Robbins y cols., 1975). Estos autores demostraron que la desaparición aparente de la fibronectina se debía a un incremento en el recambio y secreción de este componente al

medio extracelular.

b) Incremento de sialilfucoglicopéptidos de alto peso molecular.- Este segundo tipo de cambio ha sido demostrado con digestión con tripsina, seguida de otra con pronasa, de las glicoproteínas superficiales de las células transformadas, en comparación con las células normales (Glick, 1977). Estas diferencias en el peso molecular de las glicoproteínas de células transformadas es abolida cuando se tratan éstas con neuraminidasa, lo que significa un mayor contenido de ácido siálico en los oligosacáridos asociados a las GP de las células transformadas. Este tipo de anomalía se ha encontrado en diversos tipos de células tumorales (sarcomas de rata y ratón, linfoblastomas de ratón, neuroblastoma de ratón, leucemias humanas). Parece existir una correlación clara, al menos en los sistemas experimentales probados, entre la concentración de estos glicopéptidos complejos en las membranas de las células tumorales y la capacidad del tumor para crecer y progresar (Glick y cols., 1973).

c) Alteración de la unión de determinadas lectinas a las GP de superficie.- Bramwell y Harris en 1978 compararon la capacidad de unión de Concanavalina A (Con A) y de aglutinina del germe de trigo (WGA) a una amplia gama de tumores y células normales de los tejidos diana de la transformación tumoral, y encontraron que en una gran mayoría de las células malignas existe una GP de 100 K daltons de Pm, que fijaba grandes cantidades de Con A y menos de WGA. Esta GP también existía en las células normales, pero

se comportaba de forma inversa. Puesto que la Con A se fija a restos de manosa y glucosa, mientras que WGA lo hace a N-acetilglucosamina, el hallazgo sugiere una anomalía específica en la glicosilación de la GP de 100 Kdaltons, asociada con la adquisición del fenotipo maligno por parte de la célula.

2.3.- Los carbohidratos de la superficie celular y la regulación del crecimiento tumoral.

¿Existe relación entre la alteración de los carbohidratos de la membrana celular tumoral y la disrregulación del crecimiento en esas células?. Si esa relación existe, ¿a través de qué mecanismos se lleva a cabo?.

Ninguna de las dos cuestiones anteriores ha obtenido hasta el momento una respuesta satisfactoria, aunque se han sugerido varias vías a través de las cuales podría ejercerse la acción de los oligosacáridos de membrana: alteración en los requerimientos de factores de crecimiento por las células tumorales, alteración en el transporte de nutrientes, alteraciones en la comunicación célula a célula en la fase de contacto, etc. Por otra parte, ciertos agentes tales como la neuraminidasa, que elimina el ácido siálico de los oligosacáridos de la superficie, serían capaces de producir cambios en la conformación de algunas moléculas receptoras y favorece la acción de su ligando respectivo (tal podría ser el caso de la insulina, que vería incrementada su capacidad de unión al receptor por establecerse entre ellos un mayor número de interacciones hidrofóbicas y

enlaces de hidrógeno), llevando a una modificación del transporte de sustancias nutritivas y con ello a una potenciación del crecimiento celular.

El papel de los carbohidratos de superficie en la estimulación del crecimiento celular tiene un modelo básico en los linfocitos T. Los agentes que provocan la transformación blástica de estas células, tales como lectinas, anticuerpos antilinfocito (Grasbeck y cols., 1964) y el pervodato o la neuraminidasa más galactosa oxidasa (Novogradsky, 1975), lo hacen a través de una interacción directa con carbohidratos. No obstante, se desconocen los mecanismos básicos por los cuales estos agentes estimulan el crecimiento de las células T.

Diversos investigadores han demostrado una gran actividad proteolítica en la superficie de las células transformadas, en comparación con las normales (Unkeless y cols., 1973; Ossowski y cols., 1973). Estas enzimas proteolíticas, al eliminar determinados componentes de la membrana, facilitarían el crecimiento celular, habiéndose sugerido que las células malignas estarían sometidas a un estímulo mitótico perpetuo.

2.4.- Cambio del ácido siálico en la transformación neoplásica y su papel en la expresión antigénica tumoral.

Hay muchos experimentos que apoyan la intervención del ác. siálico en la regulación del reconocimiento

tigénico en la membrana tumoral por parte del sistema inmune; sin embargo, aún no han podido ser confirmadas plenamente las hipótesis avanzadas.

Por una parte, hay ciertas experiencias alusivas a que en ciertos tumores las especificidades antigénicas se pierden cuando se tratan las GP de membrana con neuraminidasa, evidenciando un posible papel para el ác. siálico como portador de glicinas (Prat y cols., 1975). Por otra parte, este carbohidrato también parece tener alguna función en el enmascaramiento de los Ags expresados en la superficie de las células tumorales (Prat y cols., 1975; Shearer y cols., 1977).

El tratamiento con neuraminidasa incrementa el poder inmunógeno de los linfocitos humanos (Rogentine y Plocnik, 1974), células de médula ósea (Lundgren y Simmon, 1971) y tejidos fetales (Simmon y cols., 1971).

Shearer y cols. en 1977 pudieron seleccionar células tumorales resistentes a la toxicidad de un antisuero obtenido frente al tumor original. El tratamiento con neuraminidasa de las células resistentes, las hizo de nuevo susceptibles a la acción del antisuero. Este hallazgo sugería que el ác. siálico de la superficie celular afectaba la interacción inmunológica con el antisuero, enmascarando los determinantes antigénicos.

Las células leucémicas L1210, cuando se tratan con neuraminidasa, se hacen susceptibles a la lisis por má-

crófagos peritoneales de animales normales (Sethi y Brandis 1973). La inyección intratumoral de neuraminidasa en carcinomas de pulmón murinos inducidos por metilcolantreno, produjo una inhibición del crecimiento tumoral y en algunos casos la regresión del tumor (Alley y Snodgrass, 1977).

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que el ácido siálico en la superficie celular tumoral reduce la capacidad inmunógena de las células neoplásicas, enmascarando sus determinantes antigénicos, con lo cual no son reconocidos por el sistema inmune.

3.- Fluidez de la membrana y su función en la regulación del proceso tumoral.

Desde un punto de vista termodinámico, las membranas son fluidos bidimensionales, constituidos por lípidos, donde las proteínas difunden y rotan de forma limitada (Nicolson, 1976). Aunque las funciones asociadas a las membranas residen en las proteínas, la naturaleza, organización y actividad funcional de los lípidos es esencial, puesto que ellos regulan la difusión y asociación proteica en la bicapa, la antigenicidad celular y la actividad de las enzimas integradas en la membrana.

El estado de fluidez lipídica en la membrana no es constante, estando sometido a cambios continuos por una serie de moduladores fisiológicos o patológicos, algunos de los cuales se describen en la Tabla II.

TABLA II

FACTORES QUE AFECTAN LOS FLUIDOS DE LA MEMBRANA

INTRINSECOS

- Composición de los lípidos
 - . estructura de la cabeza polar
 - . longitud de la cadena apolar
 - . grado de insaturación
- Colesterol
- Coenzima Q
- Vitaminas liposolubles
- Proteínas integrales
- Proteínas periféricas
- Citoesqueleto
- Iones, pH
- Lisofosfolípidos
- Ácidos grasos

INDIRECTOS

- Hormonas (a través de su receptor)
- Estado metabólico
- Diversos procesos fisiológicos

FISICOS

- Temperatura
- Presión
- Potencial de membrana

EXTRINSECOS

- Detergentes
- Anestésicos locales y generales
- Ciertos fármacos
- Toxinas

Desde 1976, año en que Lenaz y Sechi describieron la distribución asimétrica de los lípidos en ambas capas de la membrana, se sabe que dicha asimetría es esencial para mantener la fluidez dentro de límites fisiológicos. El intercambio espontáneo de lípidos entre las dos monocapas es lento, lo que permite el mantenimiento de la asimetría establecida.

En 1978 Hirata y Axelrod describieron un mecanismo de difusión fosfolipídica que denominaron flip-flop (difusión transversal), desde la superficie citoplasmática a la externa, regulado por dos metiltransferasas que transfieren grupos metilos de la S-adenosilmetionina (SAM) a la fosfatidiletanolamina en la monocapa interna, y forman lecitinas en la monocapa externa. Los estímulos hormonales que en general activan la transmetilación producen un incremento drástico en la fluidez de la membrana, lo cual, en el caso de las catecolaminas, permite un acoplamiento mejor de la adenilciclasa al receptor, a través del factor de acoplamiento GTP-dependiente (Hirata y Axelrod, 1980).

Han sido varios los investigadores que han demostrado cambios en la dinámica de superficie de células malignas, relacionándolos con cambios en la fluidez de la membrana. Sin embargo, los tipos de cambio observados y su relevancia en el proceso maligno, permanecen aún en el terreno de la controversia. Johnson y Robinson en 1979, estudiaron en este sentido una serie de linfomas y leucemias murinas y humanas, comparándolas con linfocitos normales. Observaron que la fluidez de las membranas tumorales era mayor que la

de las células linfoides normales, debido a una mayor proporción en las primeras de triglicéridos y alquildiacilglucéridos, más bien que a una disminución en la tasa de colesterol, hecho comunicado con cierta frecuencia en publicaciones anteriores. Tampoco encontraron diferencias en la proporción colesterol/fosfolípidos, alteración que algunos autores han correlacionado con el proceso maligno.

Bartoli y cols. en 1982, investigaron la actividad superóxido-dismutasa en hepatomas de rata con distintos coeficientes de crecimiento. Hallaron una reducción de esta enzima en las células tumorales frente a las normales. Dicha reducción era proporcional a la velocidad de crecimiento de los tumores. Puesto que la superóxido-dismutasa protege a las células de efectos adversos de los radicales O_2^- producidos en el citosol y las membranas durante el proceso de oxidación biológica, propusieron que la extensa peroxidación inducida por O_2^- en los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas tumorales, era debida a la disminución de dicha enzima y proporcional al grado de reducción de su actividad, de forma que los patrones de mayor perturbación en la fluidez de la membrana se asociaban con tumores de gran malignidad.

La reducción de los ácidos grasos insaturados en las membranas tumorales de estos hepatomas, conlleva una variación significativa en el cociente lípidos/proteínas, con aumento de ác. grasos monoenoicos y reducción de los polienoicos paralelamente al grado de diferenciación celular.

Estas alteraciones conducen a una mayor viscosidad en la membrana, restringiendo la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas fosfolipídicas, lo cual, unido a la cantidad limitada de peróxidos lipídicos en las bicapas alteradas, podría dar lugar a un control inadecuado de la actividad mitótica en las células tumorales.

En 1983 Lenaz y cols., cuando estudiaban los efectos de las alteraciones lipídicas en la membrana sobre la cinética de la ATPasa, observaron que un incremento en la proporción de colesterol producía una mayor rigidez del medio, con desplazamiento vertical de las proteínas, interferencia de los enlaces de hidrógeno del agua con los enlaces de hidrógeno peptídicos y desestabilización de la estructura secundaria. Así pues, una perturbación de la fluidez lipídica en la membrana, provocaría también una alteración en la actividad enzimática de las proteínas asociadas a ellas, impidiendo la formación de complejos enzima-substrato de transición (ES^*), puesto que se requiere una fluidez normal para la formación de esos complejos intermedios ES^* (Vid. Fig. 3).

En conclusión, parece que una fluidez distorsionada en los lípidos de la membrana da lugar a cambios conformacionales en las proteínas asociadas a ella, así como en su ciclo catalítico. Los receptores y proteínas transportadoras sufrirán también esa mediatización, potenciando los efectos indeseables de una célula ya de por sí alterada.

4.- Regulación del metabolismo proteico en la membrana de las células tumorales.

La composición proteica de la membrana plasmática de las células animales es compleja. Las células transformadas provenientes de tejidos con alta especialización funcional, una vez adaptadas a sistemas de cultivo in vitro, presentan, por término medio, un mínimo de 100 proteínas y glicoproteínas orientadas externamente en su membrana plasmática (Tweto, Friedman y Doyle, 1976). La organización de proteínas de superficie en las células cultivadas, tanto normales como cultivadas, es relativamente simple si se las compara con la de sus homónimas in vivo, pues aquéllas suelen perder la polaridad y las especializaciones regionales que presenta la membrana plasmática en el animal vivo (Baumann y Doyle, 1979). Estos fenómenos condicionan la interpretación de los resultados obtenidos in vitro, una vez que las células han sido desligadas de su entorno tisular natural.

Tomando como modelo el hepatocito murino y células de hepatoma de la misma procedencia, Baumann y cols. (Baumann y cols., 1983) han demostrado que mientras la membrana del polo sinusoidal de la célula normal es rica en moléculas H2D, H2K y receptores para la insulina, la membrana del polo canalicular biliar apenas, si es que lo hace, presenta las glicoproteínas anteriores y sí expresa en alta concentración otras caracterizadas por p.m. de 105 Kdaltons, 160 Kdaltons y 110 Kdaltons. Esta diferenciación molecular regional de la membrana desaparece en las células hepáticas tumorales, de forma que cada unidad de membrana contiene la

mayor parte, si no todas, de las proteínas presentes en la membrana plasmática y en concentraciones parecidas.

Se desconocen básicamente los mecanismos celulares que regulan la concentración de las diversas glicoproteínas en la membrana de superficie, tanto de las células normales como de las tumorales; pero, en principio, las proteínas de la membrana externa son probablemente sintetizadas en los polirribosomas unidos a las membranas del Retículo endoplásmico, principalmente, y ahí son incorporados los distintos carbohidratos, por medio de compuestos polialcólicos, a restos de acarragina, siempre que haya una secuencia aminoacídica apropiada en la proteína que está siendo sintetizada (Doyle, Cook y Baumann, 1982). La organización de las secuencias de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en los polipéptidos ya sintetizados es la responsable de un enclaje en la bicapa lipídica, con una configuración característica y particular para cada clase de proteína. Si simultáneamente con la síntesis proteica ocurre la formación y estructuración del trozo de bicapa lipídica en que se insertarán las glicoproteínas recién sintetizadas, configurando en conjunto lo que se denomina "unidad de membrana".

La unidad de membrana formada es trasladada después al aparato de Golgi o a los sistemas de Gerl, donde tiene lugar una glicosilación adicional. Posteriormente, la unidad de membrana es insertada en la membrana plasmática a través de mecanismos desconocidos, una vez que aquélla es embalada en forma de vesículas en los sistemas de Golgi/Gerl (Palade, 1975; Novikoff, 1976).

Algunas proteínas no glicosiladas, sintetizadas - en polisomas citosólicos libres, son insertadas directamente en un dominio específico de la membrana de superficie - (Rachubinski, Verma y Bergeron, 1980).

Se desconoce actualmente si la desdiferenciación regional que presentan las células tumorales en las glicoproteínas de superficie se debe a alteraciones en alguno(s) de los procesos bioquímicos secuenciales descritos más arriba, o bien a un epifenómeno que tiene lugar después que las distintas unidades de membrana han sido insertadas en sus regiones específicas de la membrana externa.

El metabolismo y degradación de las proteínas y glicoproteínas de superficie consiste básicamente en la interiorización de las unidades de membrana y fusión posterior con un lisosoma, donde las glicoproteínas y proteínas son degradadas en productos peptídicos de bajo peso molecular. Los procesos intermedios se desconocen, pero se sabe que el turnover de las distintas regiones de la membrana externa es característico de cada una de ellas, e incluso dentro de cada dominio, la vida media de las glicoproteínas integrales de la membrana difiere de la correspondiente a las proteínas periféricas (no integradas), con turnovers mucho más largos en este último caso (Baumann y cols., 1983).

El panorama cambia cuando se estudian los turnovers de las proteínas de superficie en las células tumorales, las cuales presentan un comportamiento relativamente uniforme. Aunque no es un fenómeno generalizado, cuando se

estudian por medio de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, las proteínas de superficie de las células tumorales se distribuyen en dos categorías con respecto a su comportamiento metabólico: proteínas con vidas medias largas, de 100 horas o más, que presentan la particularidad de estar muy poco glicosiladas, y proteínas con vidas medias mucho más cortas, un día aproximadamente, que se caracterizan por ser más ricas en carbohidratos y orientarse externamente en la membrana plasmática (Doyle y Beumann, 1979; Doyle y Tweto, 1975).

5.- Productos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad - en la membrana de las células tumorales.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) - fue definido originalmente como la región del genoma murino que contenía los genes determinantes del rechazo de aloinjertos (Gorer y cols., 1948). Desde entonces se han identificado complejos similares en todas las especies de mamíferos investigadas. Actualmente se sabe que el CMH está formado por una variedad de genes, cuyos productos circunscriben y controlan la mayor parte, por no decir todas, de las respuestas inmunes.

El CMH murino (H-2) está estructurado en cuatro regiones: K, I, S y D, más una región relacionada con aquellas (aunque actualmente no se incluye en el CMH) llamada Qa/Tla. La región Qa/Tla se localiza teloméricamente con respecto al CMH murino en el cromosoma 17, y está formada por una serie de genes cuyas estructuras presentan, por lo

general, una gran homología con la de los genes que codifican los antígenos H2-K y H2-D.

El CMH humano se divide igualmente en cuatro regiones: D, B, C y A, localizándose en el brazo corto del cromosoma 6. También se ha identificado en humanos una región homóloga con la Qa/Ea murina.

A pesar de que tanto el CMH murino como humano ocupan una porción de tamaño considerable en sus respectivos cromosomas, solamente han sido identificados unos pocos productos genéticos correspondientes a esos genes. En el CMH murino únicamente se conocen los productos de un gen para cada una de las regiones K y D y cuatro genes para la región I, expresados sobre la superficie celular. En cuanto al CMH humano, la expresión molecular conocida hasta el momento en la superficie celular, es de un gen para cada una de las regiones A, B y C y unos 12 genes para la región D (Bach, 1985). Los productos de estos genes son glicoproteínas que se localizan en la membrana de superficie de determinadas poblaciones celulares, y se las denomina colectivamente Antígenos del CMH.

Los productos de las regiones K y D del CMH murino parecen ser homólogos con los productos de las regiones A, B y C del CMH humano, con funciones similares en las respuestas inmunes respectivas. A las moléculas de las regiones K y D se las denomina antígenos H-2 de clase I y a las moléculas de las regiones A, B y C antígenos HLA de clase I (Klein y cols., 1982; Klein y cols., 1983; Kaufman y cols.,

1984; Giles y Capra, 1985).

Los antígenos HLA y H-2 de clase I son muy poli-
morfos y se expresan en gran parte de las células nucleadas
(Klein, 1979), aunque recientemente se ha comprobado que su
distribución es mucho más restringida de lo que se creía
(Natali y cols., 1984). Estos antígenos constituyen los
blancos primarios en la destrucción de tejidos alogénicos y
en la lisis mediada por linfocitos T de células infectadas
por virus y células tumorales (Zinkernagel y Doherty, 1979).

Desde el punto de vista bioquímico, los Ags de
clase I están compuestos por una cadena ligera invariable
(la beta 2-microglobulina, de aproximadamente 12000 daltons
de p.m.), que no es codificada por el CMH, unida no covalen-
temente a una cadena pesada glicosilada de 44000 daltons de
p.m. (Strominger y cols., 1980) la cual lleva los determi-
nantes alogénicos. Esta cadena pesada atraviesa la membrana
y presenta varios dominios citoplasmáticos. Los carbohidra-
tos asociados a ella no parecen intervenir en sus propieda-
des aloantigénicas.

La organización de los genes que codifican los an-
tígenos H-2 y HLA de clase I es también muy similar. Los ge-
nes de los Ags H-2 se componen de ocho exones que correspon-
den a la secuencia guía (1), a los tres dominios extracelu-
lares (3), al dominio transmembrana (1) y a los tres domi-
nios citoplasmáticos (3) (Steinmetz y cols., 1981). Los ge-
nes de los Ags HLA difieren únicamente en que contienen dos
exones citoplasmáticos en lugar de tres (Malissen y cols.,-

1982).

Por otra parte, los genes que codifican los distintos alelos muestran regiones con un grado de variación muy alto (regiones hipervariables) y otras que son muy similares (regiones conservadas). Estos fenómenos de variación alélica parecen tener lugar por la concurrencia de procesos de conversión génica (Evans y cols., 1982; Weiss y cols., 1983).

Los productos codificados por los genes de la región I del CMH murino tienen gran similitud a los codificados por genes en la región D del CMH humano. Ambos tipos de productos tienen funciones muy parecidas en la respuesta inmune: su presencia es esencial para la interacción célula a célula entre macrófagos y células T por una parte y células T y B por otra (Schwartz, 1984), determinando de esa manera el abanico de antígenos frente a los que el individuo es capaz de responder.

Los productos de las regiones I y D se conocen como antígenos Ia en el caso murino y antígenos de histocompatibilidad de clase II en el humano. En el ratón, hay al menos dos grupos distintos de genes que codifican antígenos Ia (I-A e I-E) (Hood, Steinmetz y Melissen, 1983; Klein, 1982). En humanos existen al menos tres grupos de genes distintos para codificar antígenos de clase II: DR, DQ (antes DC) y DP (antes SB) (Kauffman y cols., 1984; Bodmer, 1984). Estos Ags presentan un polimorfismo acentuado y su distribución está restringida a determinadas poblaciones celulares,

principalmente a células B y macrófagos. Cada uno de estos Ags (tanto los humanos como los murinos) están codificados por dos genes, localizados ambos en el CMH. Uno de los genes codifica una cadena pesada, o cadena alfa, relativamente invariable, de 34000 daltons de p.m. El otro gen codifica una cadena más ligera, la cadena beta, polimórfica, de 29000 daltons de p.m. En la superficie celular, ambas cadenas están glicosiladas, unidas no covalentemente y con dominios que penetran en la membrana y el citoplasma.

La genética de los Ags de clase II e Ia se conoce peor que la de los Ags de clase I, pero se sabe que tanto los genes de la cadena alfa como los de la beta, presentan regiones variables y regiones conservadas como en el caso anterior (Kauffman y cols., 1984; Benoist y cols., 1983). Los genes de la cadena beta se componen de seis exones, correspondientes a la secuencia guía (1), los dominios beta 1 (1) y beta 2 (1), el dominio transmembrana (1) y los dominios citoplasmáticos (2) (Larhammar y cols., 1983). Los genes de la cadena alfa parecen estar compuestos de cinco exones, correspondientes a la secuencia guía, los dominios alfa 1 y alfa 2, el dominio transmembrana y el citoplasmático. Para explicar la variabilidad de determinadas regiones de las cadenas alfa y beta, se proponen, como en el caso de los Ags de clase I, fenómenos de conversión génica (Kindt y Robinson, 1984).

5.1.- Expresión variable de Antígenos del CMH en células tumorales.

Hoy día son muy pocos investigadores los que dudan de la capacidad que los organismos animales tienen para montar una respuesta inmune frente a un tumor determinado. Sin embargo, también está fuera de duda que, generalmente, la respuesta inmune es frecuentemente inadecuada para eliminar las células transformadas y evitar un desenlace fatal en el huésped. Hasta el momento no hay explicaciones satisfactorias para esa ausencia o inadecuación de la respuesta inmune del huésped frente a las células tumorales. Debido a la implicación de los productos del CMH en la respuesta inmune, progresivamente ha ido tomando cuerpo una corriente de opinión, basada en la hipótesis de que la causa fundamental de la respuesta antitumoral anormal por parte del huésped, sería una alteración en la expresión de productos del CMH en la superficie celular.

5.1.1.- Expresión variable de Antígenos H-2K, H-2D e Ia en tumores murinos.

En trabajos recientes (Walker y cols., 1982), se ha señalado que algunas células tumorales murinas mostraban un incremento en la expresión de niveles de Ags H-2 de clase I e Ia, en respuesta a factores solubles producidos durante una respuesta inmune, particularmente interferón gamma. King y Jones en 1983 demostraron que células WEHI 3 (una línea tumoral murina de estirpe macrofágica, que es Ia negativa en condiciones de cultivo normales), se transforma

ban en positivas, cuando se cultivaban con sobrenadantes de células esplénicas normales estimuladas con Con A. Las células expresaban niveles altos de antígenos I-A e I-E. Igualmente, estas células expresaban niveles mucho más altos de Ags H-2K que sus congéneres no estimuladas. Estos efectos inductores de sobrenadantes de cultivos estimulados con Con A, podían ser mimetizados con interferón gamma purificado, de ahí que estos autores supusieran que el factor del sobrenadante presumiblemente implicado en la expresión de antígenos del CMH fuera el IF γ . Sin embargo, parece que otros factores que también se encuentran en los sobrenadantes de cultivos estimulados con Con A, pueden tener efectos similares

Mathis y cols. en 1983, establecieron que la expresión de Ags Ia inducida por IF γ en células WEHI3 era debida a una modificación en el control del proceso de traslación de los genes que codifican los Ags Ia. Estos autores demostraron que, mientras en células WEHI3 no tratadas los niveles de mRNA específico de Ags Ia están ausentes, estos niveles son fácilmente detectables cuando las células se tratan con IF γ .

En el momento actual se desconoce la relevancia que estas observaciones puedan tener para en esclarecimiento de las relaciones huésped-tumor, pero Walker y cols. en 1982, ya demostraron que cuando las células WEHI3 expresaban Ags Ia, también adquirían la capacidad de funcionar como células accesorias en la presentación antigénica, indicando que la alteración del fenotipo de superficie de las células WEHI3 en respuesta a factores externos, podía tener

efectos importantes en la respuesta del huésped frente al tumor.

La facultad de expresar Ags Ia de forma variable o diferencial no es un atributo exclusivo de las células tumorales. Steeg y cols. en 1980, Beller y Unanue en 1982, entre otros, han demostrado que los macrófagos normales (los cuales no expresan ordinariamente Ags Ia detectables), también son capaces de adquirir altos niveles de exposición de Ags Ia y mucho más elevados de H-2 clase I, en respuesta al IF γ . Con ello adquiere concomitantemente la capacidad de presentación antigénica (Calamai, Beller y Unanue, 1982). En condiciones normales, la fuente de IF γ in vivo, son las células T estimuladas por el Ag, por tanto es muy posible que la activación de macrófagos por IF γ constituya un mecanismo importante, o más bien esencial, en la amplificación de la respuesta inmune. Este hecho enfatiza aún más la importancia de la expresión variable de Ags Ia por las células normales y sugiere de paso la relevancia que este fenómeno pueda tener en la respuesta inmune del huésped frente a un tumor determinado. Además, la evidencia de que los macrófagos normales se comportan de forma parecida a los tumores de estirpe macrofágica en cuanto a la expresión fenotípica de Ags Ia, sugiere que la capacidad de regular la expresión antigénica en la superficie celular no está relacionada específicamente con las células malignas.

Hay, igualmente, trabajos que demuestran una expresión fenotípica variable de Ags Ia en células tumorales no derivadas de macrófagos. Sin embargo, no hay evidencia -

claro de que los correlatos normales de esos tumores comparan la capacidad de regular la expresión de Ags Ia en su superficie. Así, Wong y cols. en 1983 demostraron que algunos tumores linfoides B y mieloides murinos, presentaban un incremento en la expresión de Ags Ia cuando se estimulaban con IF γ . Además, estos autores aportaron datos sugerentes de que esta potencialidad podría también atribuirse a líneas celulares epiteliales, hematopoyéticas, fibroblásticas y neuronales.

Asimismo, existen indicios de que otros factores distintos al IF γ son capaces de estimular la expresión de moléculas H-2 clase I e Ia en algunas células tumorales, aunque no ocurre lo mismo respecto a células normales.

En 1984 Callahan estudió dos tumores: un adenocarcinoma alveolítico de ratón C3H α (LT-85) inducido con N-etil-N-nitrosourea y un fibrosarcoma de ratón C3H inducido con luz ultravioleta. Ambos tipos tumorales presentaron cambios significativos en sus niveles de expresión antigénica CMH en respuesta a factores solubles que no eran IF γ . Ni la línea LT-85 ni la 1053 expresaban niveles detectables de Ags Ia cuando eran pasadas in vitro. Además, ambos tumores expresaban niveles relativamente bajos de Ags H-2 clase I. Sin embargo, cuando las células LT-85 eran pasadas in vivo como tumores subcutáneos en ratones C3H, expresaban Ags I-E, I-A y H-2K en cantidades comparables a las células linfoides normales. Lo mismo que en el caso de WEHI3, la estimulación observada sobre la expresión de Ags CMH en células LT-85 era más débil para Ags H-2K y H-2D.

La conversión fenotípica de LT-85 podía también inducirse *in vitro*. Cuando se cocultivaron células LT-85 con esplenocitos obtenidos de ratones portadores del tumor, las células tumorales expresaron altos niveles de Ags Ia, pero no hubo significativo incremento de H-2K o H-2D. Los sobrenadantes obtenidos de cultivo de células esplénicas de esos ratones portadores del tumor, eran tan eficaces como las células mismas en la inducción de expresión antigénica Ia por las células LT-85. Estas mismas células esplénicas, al igual que los sobrenadantes, eran también capaces de inducir la conversión fenotípica de las células 1053.

Así pues, parece que células tumorales provenientes de estirpes no macrofágicas, ni siquiera hematopoyéticas, son capaces de expresar diferencialmente Ags Ia en respuesta a estímulos externos. Sin embargo, existen diferencias significativas en los mecanismos que inducen la expresión de Ags Ia en células WEHI y los que lo hacen en células LT-85 (ó1053):

a) Los sobrenadantes de células esplénicas estimuladas con Con A producen una conversión fenotípica (Ia y H-2K) en células WEHI3, pero en células LT-85 y 1053 sólo inducen un incremento en la expresión de Ags H-2K y H-2D, sin apreciarse ningún efecto sobre los Ags Ia. El IF γ purificado se comporta de la misma forma que los sobrenadantes con respecto a WEHI3 por una parte y LT-85 y 1053 por otra.

b) Los sobrenadantes de cultivos de células esplénicas pertenecientes a ratones portadores del tumor LT-85, -

no produce conversión fenotípica Ia en células WEHI3.

c) Los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos depletados de células T, estimulados con Con A, no inducen la expresión de Ia ni incrementan los niveles de H-2K en células WEHI, pero sí produce conversión fenotípica Ia en células LT-85 ó 1053.

Tomados en conjunto estos resultados, parece que el IF γ induce un incremento en la expresión de Ags H-2K o H-2D, tanto en células WEHI3 como en LT-85; pero el factor o factores solubles responsables de la inducción de Ags Ia en células WEHI3, aparentemente no ejercen ningún efecto sobre células LT-85 ó 1053. Además, el factor soluble que induce la conversión fenotípica Ia en células LT-85 y 1053, no parece ser un producto de células T.

De los trabajos anteriores se desprenden aún algunas conclusiones más. La primera es que factores producidos por un huésped portador de un tumor, pueden inducir la expresión de Ags Ia en células tumorales que no se derivan de macrófagos ni células linfoides. La segunda, el IF γ no es el único factor responsable de esa conversión antigénica.

Otros autores han proporcionado evidencias bastante claras de que algunas células epiteliales (consideradas hasta entonces como Ia negativas) pueden ser inducidas a expresar Ags Ia en respuesta a factores solubles (IF γ en la mayoría de los casos) producidos durante una respuesta inmune (Daynes y cols., 1983; Barclay y Mason, 1982; Waal y -

cols., 1983).

Se desconoce por el momento si todos o algunos de estos tumores que bajo ciertas condiciones pueden expresar Ags Ia, son capaces también de funcionar como células accesorias en la presentación antigénica. Algunas evidencias hay al respecto con la línea MT-35, ya que es capaz de producir Interleukina-1, proceso clave en la presentación del Ag por parte de los macrófagos.

La facultad de una célula tumoral para funcionar como célula accesoria podría afectar de forma importante la capacidad del huésped que portaba uno de esos tumores para montar una respuesta inmune antitumoral. De hecho cabría esperar que tales células tendrían muchas menos posibilidades de progresar que otras Ia negativas. Sin embargo, tampoco es posible descartar la idea de que la expresión de Ags Ia pueda proporcionar alguna ventaja selectiva a las células tumorales en su relación con el huésped. De momento pues, no se puede precisar la relevancia que la presencia de Ags Ia en células tumorales tenga para la respuesta inmune del huésped.

En el caso de los Ags H-2 de clase I, inducibles, existen evidencias más directas con respecto a su papel en el proceso tumoral y la respuesta inmune del huésped. Osstrand-Rosemberg y Cohn en 1981, demostraron que algunos teratocarcinomas (los cuales era H-2K, H-2D negativos *in vitro*) pueden ser inducidos por las células linfoides del huésped a expresar tales Ags. Una de las líneas (402AY) se

convertía en H-2 positiva en huéspedes resistentes, mientras permanecía H-2 negativa en huéspedes susceptibles. Estos autores concluyeron que en ausencia de Ags H-2 de clase I, la lisis de células tumorales mediada por células T no podía tener lugar, de forma que los tumores H-2 negativos no podían ser controlados rápidamente por el sistema inmune del huésped.

5.1.2.- Antígenos del CMH inducibles en tumores humanos.

También los tumores humanos parecen ser capaces de expresar diferencialmente Ags del CMH. Daas y cols. en 1982, observaron que aproximadamente el 50% de los cánceres colorrectales examinados tenían Ags DR en la membrana, mientras que fueron incapaces de demostrar tales Ags en células de epitelio colorrectal normal. Basham y cols. en 1982, demostraron que el Interferón incrementaba de manera significativa la síntesis de Ags HLA de clase I en células de melonoma. Igualmente se ha comprobado que el IF induce un incremento en la expresión de Ags HLA de clase I en fibroblastos humanos y líneas celulares linfoblastoides (Fellous y cols. 1982). Utilizando sondas de DNA complementario específicas para Ags HLA A, B y C, pudieron demostrar que el IF β , y en menor proporción el α , inducían un incremento significativo en el mRNA específico para HLA A, B y C, y en la expresión de Ags HLA de clase I por parte de varias líneas celulares derivadas de linfomas de Burkitt. Los efectos del IF eran variables de una línea a otra. Este mismo tratamiento no tuvo ningún efecto sobre los niveles de mRNA específico para DR o sobre la expresión de Ags DR en estas líneas celulares.

De estos resultados se desprende que al menos algunas células tumorales humanas pueden variar el complemento de Ags CMH sobre su superficie de forma similar a como lo hacen las células tumorales murinas.

5.2.- Expresión anormal de antígenos del CMH en células tumorales.

5.2.1.- Alteraciones cuantitativas en la expresión de antígenos del CMH por células tumorales murinas.

Los Ags CMH de clase II (Ia) se expresan solamente en una población limitada de células normales. Si a esto añadimos que aún se sabe muy poco acerca de los mecanismos precisos a través de los cuales estas moléculas ejercen sus funciones inmunológicas, se comprenderá que las variaciones cuantitativas o la ausencia completa de estos Ags en células tumorales (especialmente aquellos tumores derivados de células con función inmune no reconocida) tienen una relevancia cuestionable para la inmunología tumoral. Los resultados de las últimas investigaciones a este respecto ya han sido consignados en el apartado anterior.

En cuanto a los Ags CMH de clase I, ya hemos comentado que la destrucción de células infectadas por virus y la de células tumorales mediada por linfocitos T, requiere que la célula diana y la efectora sean singénicas, al menos en un antígeno de clase I (Sachs, 1984). Este requisito es necesario porque los linfocitos T activados deben reconocer tanto los Ags CMH propios como los extraños, para poder

llevar a cabo una lisis efectiva sobre la célula diana. Debido a su implicación en la lisis de células tumorales, el determinar los niveles de expresión de Ags CMH de clase I en dichas células tiene un interés considerable.

Uno de los primeros trabajos sobre las variaciones en los niveles de Ags H-2 en células tumorales fue el de Haywood y McCahan en 1971. Estos autores encontraron una relación inversa entre los niveles de expresión de Ags asociados a virus o a tumores y los de H-2 en células tumorales cultivadas. Desde entonces, se han publicado numerosas investigaciones sobre la ausencia o expresión disminuida de Ags H-2 en células tumorales. Sin embargo, sólo recientemente ha sido posible correlacionar la expresión de Ags H-2 con la eficacia de la lisis tumoral mediada por células T y con el proceso de tumorigénesis. Además, la disponibilidad actual de Ac Mo para Ags del CMH ha hecho posible una valoración mucho más exacta de los niveles de expresión de Ags CMH en las células tumorales, evitando muchos de los problemas y datos equívocos de las primeras publicaciones. Así, tumores que en un principio fueron considerados como H-2 negativos (Callahan y Allison, 1978), no lo eran en realidad cuando se examinaron más cuidadosamente con Ac Mo, planteándose la posibilidad de que tumores que aparentemente no expresan Ags H-2, sí lo hagan en realidad, pero la asociación de aquéllos con otras moléculas de la superficie, los hagan inaccesibles a los anticuerpos específicos convencionales o monoclonales, como ocurrió en el caso mencionado aquí.

En otros casos, ha quedado perfectamente estable-

cida la no expresión en células tumorales de los Ags H-2, - que sí son detectables en las células autólogas normales - del huésped. Testorelli y cols. en 1980 y Schmidt y cols. - en 1981, han descrito varias leucemias en ratones BALB.K y C3H que no expresaban Ags H-2K^b, mientras las células autólogas normales lo hacían. También demostraron que debido a esa carencia de H-2K^b estas células tumorales no sufrían lisis cuando se enfrentaban a células T con restricción genética para H-2K^b. Plata y cols. en 1981 demostraron también - que algunos tumores murinos inducidos por virus, mostraban variaciones cuantitativas llamativas en la expresión de Ags H-2, y que estas variaciones se correlacionaban con la susceptibilidad de las células tumorales a la lisis por células T antivirales.

En los tumores mencionados, no se determinaron - las bases genéticas causantes de la deplección de Ags H-2 - en la membrana. Se sabe que la ausencia de Beta 2- microglobulina imposibilita la expresión de H-2, por lo que la falta de traslación a mRNA del gen que codifica dicha proteína impediría el anclaje de las cadenas pesadas de H-2 en la superficie. Sin embargo, no es probable que éste fuera el mecanismo operante en los tumores descritos más arriba, porque las variaciones cuantitativas en la expresión de H-2 se referían en cada caso a un solo locus y la traslación del gen de la Beta 2- microglobulina es necesaria para la expresión de todos los Ags H-2 de clase I.

Rogers y cols. en 1983, utilizando células murinas transformadas con SV40, comprobaron, como en los casos -

anteriores, que las células tumorales carentes de Ags H-2K^x en la membrana eran más tumorigenas que las células con una dotación completa de esos Ags y pudieron demostrar además - que la ausencia de productos genéticos del locus H-2K parece deberse a alteraciones en el DNA que codificaba la cadena pesada del Ag H-2K^x.

En 1982, Morello y cols., trabajando con carcinomas embrionarios, obtuvieron pruebas fehacientes de que la falta de expresión de Ags H-2 por estas células, era debida a una traslación deficitaria tanto de los genes que codifican la cadena pesada como del gen que codifica la Beta 2-microglobulina. Otro hecho que apoya la hipótesis de altera ción en la traslación como causa de la ausencia de H-2 en estas células, es que bajo condiciones apropiadas, puede inducirse en algunos carcinomas embrionarios la expresión de Ags H-2. Además, estas células que adquirían la capacidad de expresar H-2 en respuesta a estímulos externos eran menos tumorigenas que las de carcinomas embrionarios carentes de esa capacidad (Ostrand-Roseberg, Cohn y Sandoz, 1983).

Así pues, las células tumorales pueden no expresar Ags H-2 debido a alteraciones en el DNA que codifica la cadena pesada o una traslación inadecuada de los genes que codifican bien la cadena pesada, bien la Beta 2-microglobulina. En el momento actual no está claro cuál de estos (u otros) mecanismos operan con más frecuencia, generando cambios genéticos o epigenéticos que disminuyen o bloquean la expresión de Ags H-2 por las células tumorales.

Al margen de los mecanismos genéticos subyacentes resulta bastante evidente que los cambios cuantitativos en la expresión de Ags H-2 por las células tumorales pueden afectar profundamente la capacidad del huésped para elaborar una respuesta inmune efectiva, dando lugar a un incremento de la capacidad tumorigena de algunas células transformadas. Pero debemos finalizar una vez más apuntando, que son necesarios más estudios sistemáticos para establecer la relevancia de estos fenómenos en la Inmunología Tumoral.

5.2.2.- Cambios bioquímicos (cualitativos) en los antígenos CMH de células tumorales murinas.

Han sido muchos los grupos de trabajo que han comunicado la presencia en células tumorales de Ags CMH que eran química o inmunológicamente distintos de los expresados en las células normales autólogas (Parmiani y cols., 1979). Sin embargo, los resultados han sido en muchas ocasiones contradictorios y generalmente difíciles de interpretar. Las investigaciones parecen haber tomado direcciones más precisas con la llegada de los Ac Mo y el establecimiento de sistemas genéticos bien definidos.

Para ilustrar los problemas reseñados, veremos las vicisitudes seguidas por un tumor que en principio parecía expresar H-2 anómalos, al que ya nos hemos referido anteriormente. Se trata del tumor LT-85. Fue obtenido por Martin y cols. en 1977 en ratones C3HfB. Estas células tumorales crecían en ratones C3H, pero eran rápidamente rechazadas por ratones C3HfB. Además, presentaban reactividad inmu

nológica cruzada con la cepa ancestral de la que derivaba - C3HfB, es decir, C3H, y eran inmunológicamente distintas de la cepa paterna C3HfB. Las propiedades de crecimiento e inmunológicas del tumor LT-85 sugerían que estas células, - bien como resultado de una reversión genética o algún otro mecanismo, expresaban Ags H-2K^K (los Ags I-E, I-A y H-2D - son idénticos a los expresados por la cepa alogénica C3H. - Sin embargo, cuando se caracterizaron bioquímicamente de - forma detallada los Ags H-2K^K de LT-85, se constató que - eran químicamente distintos de los de C3HfB y C3H (Callahan y cols., 1983). Por tanto, aunque cambios genéticos en el locus genético K de las células LT-85 habían generado una - molécula que mimetizaba inmunológicamente un aloantígeno, - el Ag H-2K^K de LT-85 no estaba en realidad relacionado con - ningún otro aloantígeno definido previamente.

Un examen detallado de los mapas peptídicos de la molécula H-2K^K de C3HfB, C3H y LT-85 evidenció que algunas - porciones del Ag H-2K de LT-85 eran idénticas a determi~~n~~ - das secuencias de Ags H-2K de C3H, mientras que otras eran idénticas a secuencias de los Ags H-2K de C3HfB. La explica - ción más simple de estas observaciones es que en las célu - las que dieron lugar al tumor LT-85, tuvo lugar un fenómeno de conversión genética concurrente con la transformación ma - ligna. Tal conversión genética podría haber utilizado DNA - de la región 2a/E1a (gran parte de la cual parece no estar - expresada en los tejidos normales), alterando o corrigiendo una secuencia del gen mutante en el locus K y de esa forma - generar unas moléculas en parte similares a las moléculas - del mismo tipo en células ancestrales C3H, y en parte dife-

rantes de las moléculas H-2K de C3H/He, cepa de la cual se había obtenido el tumor.

Recientemente han sido publicados varios trabajos más, sugerentes de que fenómenos de conversión genética similares, empleando DNA de la región Qa/Tla, generan diversidad dentro de la familia H-2 de clase I. Sin embargo, también hay evidencias de que la conversión genética puede operar manteniendo cierta homología entre los genes que codifican H-2 de clase I.

En 1983 Brickell y cols. sugirieron que muchas células tumorales podían utilizar DNA relacionado con genes de CMH, pero no expresado en células normales. Estos autores, empleando DNA complementario (DNAC) clonado, que codificaba un antígeno de la clase Qa/Tla, pudieron detectar mRNA presente en muchos de los tumores examinados en cantidades elevadas, e interpretaron estos datos como indicativos de que genes similares a los que codifican los Ags CMH de clase I, presentes en la región Qa/Tla del cromosoma 17 (cuyos productos no son aparentemente expresados por las células maduras normales) tenían expresión fenotípica en muchas células tumorales. Además, estos mismos autores han sugerido que sus hallazgos podrían explicar la base de la potente actividad de las células NK frente a carcinomas embrionarios y células transformadas con Metilcolantreno o con SV40. En efecto, Ghedlovsky y cols. en 1981 y Stern y cols. en 1980, propusieron que la actividad NK frente a células de carcinomas embrionarios, estaba realmente dirigida frente a los Ags de la superficie celular Gt-1 y/o Gt-2.

Por otra parte, existen reacciones cruzadas entre las células tumorales embrionarias y las células transformadas con SV40 o con Metilcolantreno (Medawar y Hunt, 1978; Sikora, Stern y Lennox, 1977).

Sólo nos falta para concluir que, al parecer, los antígenos Gt-1 y/o Gt-2 son codificados por genes de la región Qa/Tla, puesto que el DNA aislado por Brickell y cols contenía el gen que codificaba uno de esos dos Ags. Es decir, los hallazgos de este grupo podrían interpretarse como una demostración de la expresión de ese gen en diversos tumores, constituyendo la base de la reactividad cruzada entre ellos y su susceptibilidad a la acción de las células ~~FK~~.

Actualmente, no hay evidencias que contradigan esta interpretación. Sin embargo, los resultados obtenidos por Brickell y sus colaboradores, podrían también ser el resultado de una conversión genética dentro del mismo CMH de las células tumorales, o bien ese mismo fenómeno operando en el DNA de la región Qa/Tla.

A pesar de estas posibles objeciones, tanto de los trabajos de Callahan como de los de Brickell, se desprende que las células tumorales pueden hacer uso de DNA fenotípicamente silente en condiciones normales, para generar y expresar Ags o determinantes antigénicos CMH que no se encuentran en los tejidos normales autólogos.

5.2.3.- Cambios cuantitativos y bioquímicos en la expresión antigénica CMH de células tumorales humanas.

La información disponible con respecto a la naturaleza de la expresión antigénica CMH en células tumorales humanas es mucho más exigua que en el sistema experimental murino, debido en gran parte a la dificultad de obtener sistemas singénicos y a que sólo recientemente ha sido posible llevar a cabo estudios comparativos con líneas celulares establecidas de células normales y malignas derivadas del mismo individuo. A pesar de todo, hay algunas evidencias de que la expresión antigénica CMH en células tumorales humanas puede diferir significativamente de la observada en células normales.

Lampson y cols. en 1983 observaron que líneas celulares derivadas de neuroblastomas con alto grado de malignidad no expresaban Ags HLA de clase I. Esta ausencia era debida aparentemente a la falta de expresión de la cadena pesada, ya que la Beta 2-microglobulina era sintetizada normalmente por estas células. Estos investigadores propusieron que, supuesta la implicación de los Ags HLA en la destrucción de células tumorales mediada por células T, la ausencia de estos Ags en la línea de neuroblastomas podría facilitar su escape del sistema inmunológico del huésped, haciéndolas mucho más tumorígenas. Sin embargo, debemos apuntar una vez más que no existen evidencias que establezcan una relación deirecta entre la expresión antigénica HLA y la capacidad tumorígena en este u otros sistemas experimentales humanos.

Con respecto a la expresión anormal de Ags HLA -
enormes por células tumorales humanas, la bibliografía es
aún mucho más escasa. Claas y Van Steenbrugge en 1983, des-
cribieron una línea celular derivada de un adenocarcinoma -
prostático, que expresaba aparentemente Ags HLA alotípicos,
que estaban ausentes en los linfocitos sanguíneos periféri-
cos del mismo paciente, aunque bien es cierto que estos au-
tores no pudieron excluir una contaminación alogénica en es-
tas células tumorales, un problema que está en la base de -
muchos trabajos sobre antígenos alogénicos en células tumo-
rales. Esto, añadido a que Claas y Van Steenbrugge utiliza-
ron anticuerpos policlonales en sus análisis, pone de relie-
ve la precaución con que debes tomarse sus observaciones.

Otro punto que también plantea problemas en la ex-
presión aparente de Ags HLA anormales por células tumorales
es la reacción cruzada que parece existir entre Ags HLA de
clase I y componentes virales en la membrana de dichas célu-
las. Marn y cols. en 1983 observaron que algunas líneas tu-
morales productoras del virus del linfoma de células T huma-
nas (HTLV) expresaban especificidades HLA-A y B que no eran
detectables en células B transformadas con virus de Epstein
Barr (EBV) o linfocitos de sangre periférica pertenecientes
a los mismos pacientes, y concluyeron que sus resultados po-
drían indicar una reacción cruzada entre algunos Ags HLA y
componentes del virus HTLV. Esta posibilidad tomó cuerpo -
cuando ese mismo año Clarke y cols. demostraron que existía
un grado muy elevado de homología entre las secuencias genó-
micas de un linfoma T humano codificadoras de la envoltura
proteica viral y la región de un gen HLA-B.

Si, como parece, es necesario interpretar adecuadamente la posible presencia de Ags HLA anómalos en tumores humanos, no lo es menos para otra serie de trabajos en los que no se encontraron diferencias entre el fenotipo HLA de células tumorales y células normales singénicas, teniendo en cuenta que muchos de ellos sólo emplearon técnicas serológicas en la caracterización antigénica. Es evidente que una identidad serológica no implica identidad genética, según ha quedado demostrado por diversos investigadores (Biddison y cols., 1982; Arden, Wakeland y Klein, 1982; Owerbach y cols., 1983).

Así pues, la caracterización serológica es inadecuada para estudiar completamente el fenotipo CMH de células tumorales, pudiendo existir diferencias significativas entre los Ags HLA de células normales y tumorales que son "invisibles" serológicamente. Para apuntalar esta última hipótesis y a título de ejemplo, valgan las investigaciones publicadas por Callahan y Ferrell en 1984. Estos autores no encontraron diferencias serológicas entre los Ags HLA de un adenocarcinoma pulmonar (P3) y los de células linfoides autólogas transformadas con EBV; sin embargo, la caracterización bioquímica de unos Ags y otros reveló diferencias muy importantes. Es decir, estas células expresaban Ags HLA químicamente distintos.

B. - ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA CÉLULA TUMORAL.

1. - El ciclo celular en la célula normal.

1.1. - Fases del ciclo celular (Ver esquema adjunto).

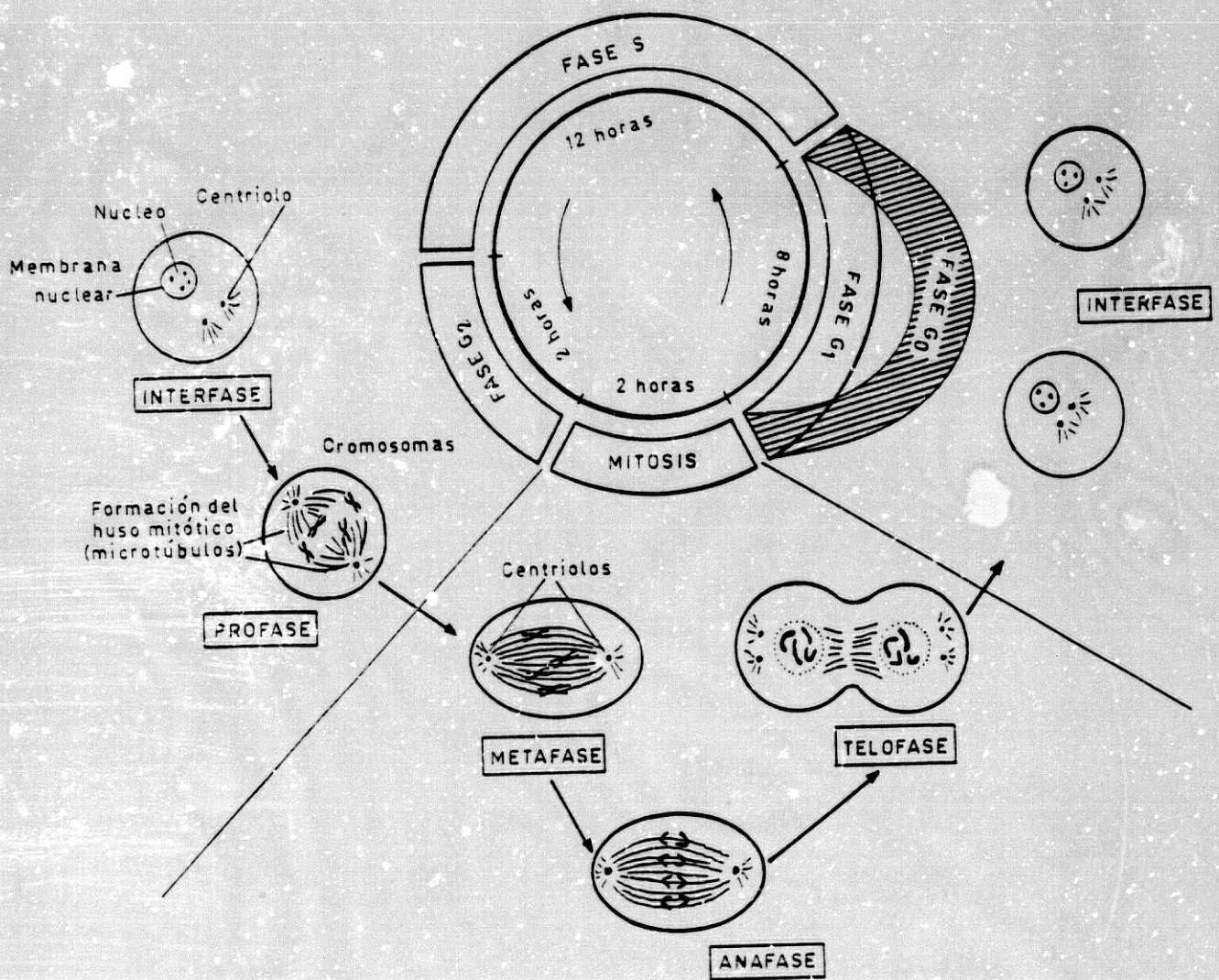
A principios de este siglo se observó que el ciclo celular tiene un período de duplicación de estructuras celulares, o interfase, y otro de reparto de estructuras entre las dos células hijas, o mitosis.

Posteriormente, los estudios realizados en cultivos celulares han sido esenciales para un mejor conocimiento del crecimiento celular, al poder aplicar una serie de técnicas que no podían ser utilizadas "in vivo". Estas técnicas y la posibilidad de obtener cultivos de crecimiento sincronizados, nos han permitido conocer nuevas subdivisiones en el ciclo celular.

El ciclo celular, que puede ser definido como el período que transcurre desde que termina una mitosis hasta el final de la siguiente, fue descrito por primera vez por Howard y Pelc en 1951, usando ^{32}P como marcador de las células que sintetizaban DNA. La timidina tritiada ha reemplazado posteriormente a este marcador.

Clásicamente, el ciclo celular se divide en cuatro fases separadas. Cuando finaliza la mitosis, las células pasan a través de las fases G_1 (presíntesis), S (síntesis), G_2 y M (mitosis). La fase mitótica puede ser identif

CICLO CELULAR EUCARIÓTICO



cada con el microscopio óptico, mientras que la fase de síntesis puede ser determinada por la incorporación de timidina tritilada. Las fases G_1 y G_2 constituyen los dos períodos entre estos dos acontecimientos identificables.

El tiempo invertido por las células en recorrer el ciclo replicativo, varía considerablemente de un tipo de células a otras. En general, la duración de las fases S, G_2 y M es bastante constante; sin embargo, la duración de G_1 es muy variable. En las células de mamíferos, la fase M muestra constantemente una corta duración (0,5-1,5 horas); la fase S de 8 a 30 horas, tanto en tejidos normales como malignos; la duración de la fase G_2 ha sido determinada con menor precisión, pero es bastante corta (probablemente alrededor de una hora). La gran variabilidad está en G_1 (Baserga, 1965). Es por ésto que los cambios en la duración total del ciclo dependen en gran medida de G_1 , que está sometida a un control específico del crecimiento. Es primariamente en esta fase, donde las condiciones externas determinan si las células se mantendrán en el ciclo replicativo, se diferenciarán o entrarán en reposo.

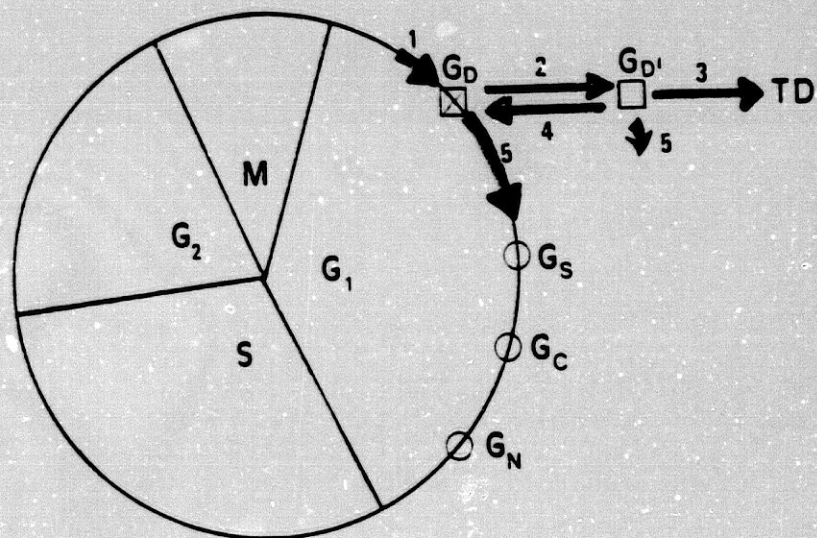
El término G_0 ha sido introducido para designar aquellas células que están en reposo, fuera del ciclo, pero que son capaces de ser incorporadas al mismo (Baserga, 1976; Prescott, 1976; Brooks y cols., 1980). Algunos autores creen que la fase G_1 no es tan variable, sino que la medida incluye tanto a las células que se hallan en G_1 , como a un número variable de células en G_0 .

Recientemente, Scott y cols (Scott y cols., 1982a; Scott y cols., 1984), trabajando con el sistema de proadipocitos 3T3 T, han definido una serie de etapas dentro de la fase G_1 , que han sido designadas sucesivamente como G_D , G_S , G_C y G_N .

G_D es la primera etapa de G_1 , donde se regula el control de la proliferación y diferenciación celular; es aquí cuando la célula tiene la posibilidad de permanecer quiescente, reiniciar la proliferación o diferenciarse. Después vienen G_S y G_C , estados en los que la célula se muestra susceptible a la regulación por factores de crecimiento. Finalmente se encuentra la etapa G_N , donde la célula presenta sensibilidad a determinados nutrientes, especialmente el aminoácido isoleucina.

En la Fig. 4, podemos observar cómo el estado G_D consta a su vez de varias subetapas (Scott y cols., 1984). Las células, primeramente, muestran una parada cuando llegan al estado G_D (flecha 1). En G_D , las células pueden permanecer en reposo, reiniciar la proliferación (flecha larga 5) o diferenciarse (flechas 2 y 3). Si es inducida la diferenciación, las células salen del ciclo, pasando a un estado denominado G_D' (flecha 2), en el que las células están diferenciadas, pero no de una manera total. El G_D' es otro nuevo punto de control de la proliferación y diferenciación donde las células pueden seguir varios caminos: diferenciarse totalmente hasta el estado TD (flecha 3), reiniciar la proliferación mientras permanecen semidiferenciadas (flecha corta 5), desdiferenciarse volviendo al estado G_D (flecha -

FIGURA 4: Fases del ciclo celular (según Scott y cols., 1984).



4), o bien permanecer quiescentes.

Existen factores fisiológicos y farmacológicos - que regulan la proliferación y diferenciación a nivel G_D - (Scott y cols., 1982b; Wier y cols., 1983). Determinados - factores del crecimiento pueden estimular la proliferación - de células en G_D o $G_{D'}$, en reposo. Además, se ha encontra- do que ciertas vitaminas y drogas pueden inducir a que las - células en $G_{D'}$ pierdan su diferenciación, regresando a G_D - (Scott y cols., 1982b; Wier y cols., 1983). Se ha observado también, que la síntesis de DNA no es necesaria para que - ocurra la diferenciación (Yun y cols., 1983).

Estos autores terminan sugiriendo que los contro- les del crecimiento a nivel de G_S , G_G o G_N , son como proce- sos salvavidas que previenen a los proadipocitos para cre- cer en condiciones adversas (masificación o medio ambiente - deficiente, en factores de crecimiento o nutrientes).

A pesar del avance que el sistema de Scott y cols y otros similares suponen en el esclarecimiento de los pro- cesos intermedios que controlan la lógica del ciclo celular en la fase G_1 , el nivel actual de los conocimientos sobre - este punto no es suficiente para poder explicar los fenóme- nos bioquímicos que son necesarios o suficientes para ini- ciar la síntesis de DNA. El hecho de que la transición des- de la fase G_0 a la fase S requiere una exposición prolonga- da a factores de crecimiento, argumenta en contra de la sim- ple presencia de un factor activador inicial como mecanismo regulador, sugiriendo más bien un efecto umbral respecto a -

la concentración de uno o varios de ellos.

Como resumen, podemos decir que, previamente a la iniciación de la síntesis de DNA y subsecuente división celular, deben acontecer tres procesos bioquímicos básicos en la fase G_1 :

- a) Una serie de cambios en la superficie celular.
- b) La activación del genoma.
- c) Un incremento de la síntesis de proteínas cromosómicas no histónicas.

1.2.- Bioquímica del ciclo celular.

Cuando la célula entra en el ciclo de replicación se producen una serie de acontecimientos bioquímicos y morfológicos muy diferentes de cuando la célula está en reposo. La síntesis de proteínas y ácidos nucleicos no se excluyen una a otra, aunque se sitúan en momentos diferentes del ciclo.

La mayoría de las proteínas del citoplasma son fabricadas a lo largo de G_1 , S y G_2 ; el grado de síntesis disminuye en G_2 , reduciéndose considerablemente durante la mitosis. Las histonas, proteínas básicas componentes de la cromatina, se sintetizan solamente durante la fase S. Parece ser que estas proteínas, asociadas con el DNA, desempeñan una función importante en el ciclo celular. Las histonas experimentan unos procesos enzimáticos de acetilación y fosforilación, de forma muy ordenada a lo largo del ciclo celular. Se considera que estas reacciones modificadoras,

juegan un importante papel en la estructura y función de la cromatina cuando la célula progresa a través del ciclo proliferativo (Battie y cols., 1978).

La síntesis de DNA, al igual que las histonas, ocurre solamente durante la fase S. Una rápida incorporación de timidina tritiada es detectada generalmente en el punto inicial de la fase S. Durante esta etapa, el DNA replica toda su masa. Sin embargo, la síntesis de DNA no comienza en todas las partes de los cromosomas al inicio de la fase S (Hamlin y Pardee, 1978). Los cromosomas contendrán unidades de replicación (replicones) que se duplicarían en diferentes momentos de la fase S. Deben, por tanto, existir señales secuenciales que marquen el inicio de grupos de replicones, aunque no se sabe cuáles son estas señales.

Por otra parte, la formación de RNA mensajero, transferente y ribosómico, tiene lugar a lo largo de toda la interfase, mientras que en la mitosis cesa la síntesis de RNA. Las células quiescentes producen RNA de forma menos rápida que las células en crecimiento, y cuando aquéllas son activadas para crecer, el transporte de precursores de RNA y la síntesis de RNA aumenta en pocas horas (Baserga, 1976). Una fuerte inhibición de la síntesis de RNA bloquea la entrada de estas células estimuladas en la fase S (Baserga, 1976), aunque algunos datos indican que no es esencial la presencia de nuevo RNA ribosómico (Klein, 1982).

Se han llevado a cabo una serie de experimentos con la finalidad de detectar aquellas sustancias bioquími-

cas que pudieran regular las distintas fases del ciclo celular, particularmente G_1 .

El crecimiento de la célula normal "in vivo" y en cultivo, depende principalmente de factores externos (Sato y Ross, 1979; Gospodarowicz y cols., 1978). Estos factores deben primeramente entrar en contacto con la membrana y, alterándola de alguna manera, o bien atravesándola, ejercer sus efectos en el interior de la célula. Existen numerosos factores externos reguladores del crecimiento celular, como veremos más adelante, pero ahora sólo nos ocuparemos de estudiar aquellos procesos bioquímicos que ocurren en el interior de la célula cuando moléculas activadoras, como mitógenos o antígenos, se unen a la superficie celular estimulando la mitosis.

Klein (1982), resume las secuencias bioquímicas de los linfocitos T estimulados por mitógenos o antígenos, en las siguientes etapas: recepción de la señal, alteración de la membrana plasmática, transmisión de la señal de la membrana al núcleo y cambios en éste.

a) Recepción de la señal: En primer lugar, el mitógeno o Ag ha de conectar con un receptor de la superficie celular, probablemente una glicoproteína. Parece ser que la molécula activadora debe de permanecer conectada al receptor durante un cierto tiempo, para que se produzca la señal iniciadora del crecimiento celular, pero no es necesaria su presencia cuando comienza la síntesis de DNA, incluso puede ser quitada varias horas antes de que ésta ocu

rra.

b) Alteración de la membrana plasmática:

- Entrada de compuestos al interior celular.- Al poco tiempo, unos 20 minutos, de la conexión de la molécula activadora al receptor de membrana, se intensifica la penetración en la célula de nucleósidos, azúcares, aminoácidos, fosfato, colina y Ca^{+2} ; también aumenta la actividad de la bomba $Na^{+} - K^{+}$.

Algunos de estos incrementos se ha comprobado que son irrelevantes en la activación del linfocito, pero otros son esenciales. Por ejemplo, hay evidencias de que el aumento del transporte de la bomba $Na^{+} - K^{+}$ es importante para la estimulación de los linfocitos, aunque su relación con este proceso no es conocida. La mayor intensidad en el transporte $Na^{+} - K^{+}$, podría representar un ajuste preparatorio para el incremento del volumen celular, característico de la transformación blástica, o podría, de alguna forma, estar relacionado con los cambios en la concentración de AMPc en el linfocito estimulado. Algunos bioquímicos consideran que la activación del linfocito requiere un descenso en la concentración intracelular de AMPc, y puesto que la adenilciclasa y la ATPasa- Na^{+}, K^{+} compiten por el mismo ATP, la función incrementada de la bomba $Na^{+} - K^{+}$ rápidamente agotaría este ATP.

- Cambios en los lípidos de membrana.- La estimulación del linfocito conduce a un enriquecimiento en la membrana de ácidos grasos poliinsaturados. Como consecuen-

cia de ísto, los fosfolípidos de membrana se encuentran menos densamente empaquetados; la membrana se hace más fluida y el grado de transporte resulta alterado.

- Interpretación de los cambios en la membrana.-
El ligando, mitógeno o Ag, se une al receptor plasmático y se piensa que activa a dos enzimas de membrana, la fosfolípido-metiltransferasa I y II (PMT I y PMT II). Las dos enzimas se encuentran en sitios opuestos de la membrana: la PMT I contacta con la parte intracelular y la PMT II con la extracelular. Esta localización se debe a que el sustrato de PMT I, la fosfatidiletanolamina (PE), está situado principalmente en la parte intracelular, mientras que el sustrato de PMT II, la fosfatidilcolina (PC), está orientado hacia la zona extracelular de la membrana.

Cuando se activa PMT I, metila a PE y la convierte en fosfatidil-N-monometil-etanolamina (PME). PME es ahora catalizado por PMT II, que lo transforma por adición de dos grupos metilos en PC. Los fosfolípidos metilados son translocados, por tanto, desde la parte interna de la membrana a la externa, siguiendo el mecanismo "flip-flop". Esta translocación disminuye la viscosidad lipídica y por lo tanto aumenta la fluidez de la membrana, facilitando los movimientos laterales de los receptores u otras moléculas de membrana (Hirata y Axelrod, 1980).

Se cree que el aumento de la fluidez afecta, al menos, a tres importantes procesos. Primero, la ATPasa dependiente de Ca^{+2} , enzima que regula el flujo de este ión -

al interior celular, se altera de tal forma que permite la entrada de Ca^{+2} a la célula. Segundo, se afecta la ATPasa-- Na^+ , K^+ , intensificándose el transporte de estos dos iones. Y tercero, la adenilciclase resulta también afectada, influyendo en los niveles de AMPc en el citoplasma.

c) Transferencia de la señal de la membrana al núcleo: Esta fase es la menos conocida de los procesos activadores de la célula. La transmisión de la señal es, al parecer, mediada por un hipotético segundo mensajero (el primer mensajero sería la molécula externa estimuladora).

Se han realizado un gran número de experiencias -trabajando con distintos tipos de células, con la finalidad de encontrar estos supuestos segundos mensajeros, pero su naturaleza permanece sin aclararse. Como posibles candidatos en desempeñar la función mensajera se han designado al AMPc, GMPc, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ y K^+ .

Se ha intentado relacionar los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, con la regulación del crecimiento celular (Pastan y Johnson, 1974). Así, si se aumentaba la cantidad de AMPc intracelular añadiendo dibutiril-AMPc o prostaglandina E_1 en el medio, generalmente se inhibía el crecimiento de fibroblastos no transformados y las células se acumulaban en G_0 o G_1 . Abell y Monahan en 1973, indicaron también que altas concentraciones de AMPc suprimen la proliferación celular, y en algunas células los niveles de AMPc durante la mitosis son mínimos. Se pensó así, que un intenso descenso en el AMPc podría ser la señal iniciadora de la división

celular.

Hadden y Hadden (1972), estudiando la transformación blástica de los linfocitos periféricos humanos inducidos por mitógenos como la PHA o Con-A, observaron que, a los 20 minutos de adicionar el mitógeno, el nivel de GMPc aumentaba unas 10 ó 15 veces, mientras que el de AMPc no variaba. También encontraron que el GMPc comenzaba a generarse en el momento en que la PHA conectaba con la membrana celular. En este caso, es el GMPc el que parece provocar la serie de acontecimientos bioquímicos relacionados con el inicio de la proliferación celular, incluyendo acetilación de histonas, fosforilación de proteínas nucleares, aceleración de la síntesis de RNA nuclear; estimulándose la transcripción. Todos estos cambios preparan a la célula para entrar en la fase S. Además, se ha demostrado que mínimas concentraciones de GMPc estimulan la síntesis de RNA nuclear. Estos autores asumen que el GMPc juega el papel de mediador que transmite la señal desde la membrana al núcleo.

Algunos datos sugieren relaciones recíprocas entre el AMPc y el GMPc. Por ejemplo, la estimulación de la división celular se relaciona con el aumento del GMPc y la disminución de AMPc intracelular, mientras que el deteni- miento de la proliferación se acompaña del fenómeno opuesto. Probablemente, estas variaciones sean las que regulen la proliferación celular.

Estas generalizaciones, sin embargo, son un tanto prematuras, ya que existen experiencias que las contradicen.

Los fibroblastos no transformados en cultivo, cuando se hacen confluyentes dejan de dividirse. No se ha encontrado incrementos de AMPc en los fibroblastos confluyentes. También se ha observado que en células proliferantes la variación de GMPc no variaba, incluso descendía.

Como vemos, no existe un acuerdo con respecto a un único papel del AMPc o GMPc en el control del crecimiento, lo que produce datos conflictivos (Rebhun, 1977). Con respecto a los linfocitos, Klein (1982) señala igualmente, que las experiencias son contradictorias en cuanto a la concentración y actuación precisa que estos metabolitos pudieran tener en la proliferación celular.

Es conveniente indicar por último, en relación con estos nucleótidos cíclicos, que una de sus principales funciones es activar a las proteínas-quinasas, enzimas que fosforilan una serie de proteínas y de esta forma aumentan o disminuyen sus actividades (Greengard, 1978). Constituyen indicios de que las proteínas-quinasas AMPc-dependientes están implicadas en el control del crecimiento; en primer lugar, que las células mutantes defectivas en una proteína-quinasa no pueden ser detenidas en la fase G_1 del ciclo celular (Coffino y cols., 1976); en segundo lugar, dos proteínas-quinasas AMPc-dependientes son sintetizadas en estadios específicos del ciclo celular, en forma que se correlacionan con los acontecimientos del crecimiento celular (Haddox y cols., 1980).

Otros candidatos para segundos mensajeros son los

iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ y K^+ . Las concentraciones intracelulares de estos iones dependen de sistemas de transporte (Naiditch y Cunningham, 1977) y su captación es estimulada por suero y factores de crecimiento (McKeehan y McKeehan, 1980). Los iones activan varias enzimas y procesos metabólicos, incluyendo las proteínas-quinasas y ATPasas, y estimulando la síntesis de proteínas y la producción de energía por el sistema glucolítico. Las funciones del Ca^{+2} son mediadas por la Calmodulina, una proteína ligadora específica para este ión (Cheung, 1980; Means y Dedman, 1980). El Ca^{+2} y el AMPc están interrelacionados sobre varios importantes procesos, como la actividad de las proteínas-quinasas y la formación de microtúbulos (Whitfield y cols., 1980).

d) Cambios en el núcleo: La activación del linfocito va acompañada de una serie de modificaciones en el núcleo. Se han detectado reacciones enzimáticas de acetilación y fosforilación de histonas y de otras proteínas cromosómicas, después de que la molécula activadora se ha unido al receptor de membrana.

La síntesis de DNA ocurre 24 horas después de adicionar el mitógeno al cultivo de linfocitos, alcanzando un máximo a las 72 horas.

El incremento en la formación de RNA parece ser que afecta solamente al RNA transferente y ribosómico; para la síntesis de RNA mensajero no se han podido encontrar diferencias entre los linfocitos estimulados y los que no lo han sido.

Inmediatamente después de interaccionar el mitógeno con el receptor, comienza la síntesis de proteínas llegando a alcanzar niveles 10 veces superiores a los del linfocito no estimulado.

La mayoría de las etapas que hemos indicado, se han referido a estudios realizados en cultivos de linfocitos T, estimulados por mitógenos o antígenos. Probablemente con el resto de las células ocurra algo semejante cuando son activadas por factores del crecimiento.

1.3.- La lógica del ciclo celular.

Ya hemos comentado que la célula debe duplicar exactamente cada uno de sus componentes, y por tanto su masa, durante el ciclo, entre sucesivas mitosis, para mantener un estado más o menos uniforme de crecimiento. Esa necesidad la suple la célula sintetizando continuamente, a lo largo de la interfase, la mayor parte de las proteínas y moléculas de RNA presentes en ella, haciendo excepción, claro está, del DNA. Esto quiere decir que la síntesis de DNA y RNA son en este sentido independientes. Como la capacidad sintética de la célula se incrementa a medida que ella misma adquiere mayor tamaño, el aumento en la concentración de las proteínas celulares totales, el RNA y la masa de la célula, también va siendo proporcionalmente mayor a medida que la célula pasa de G_1 a G_2 .

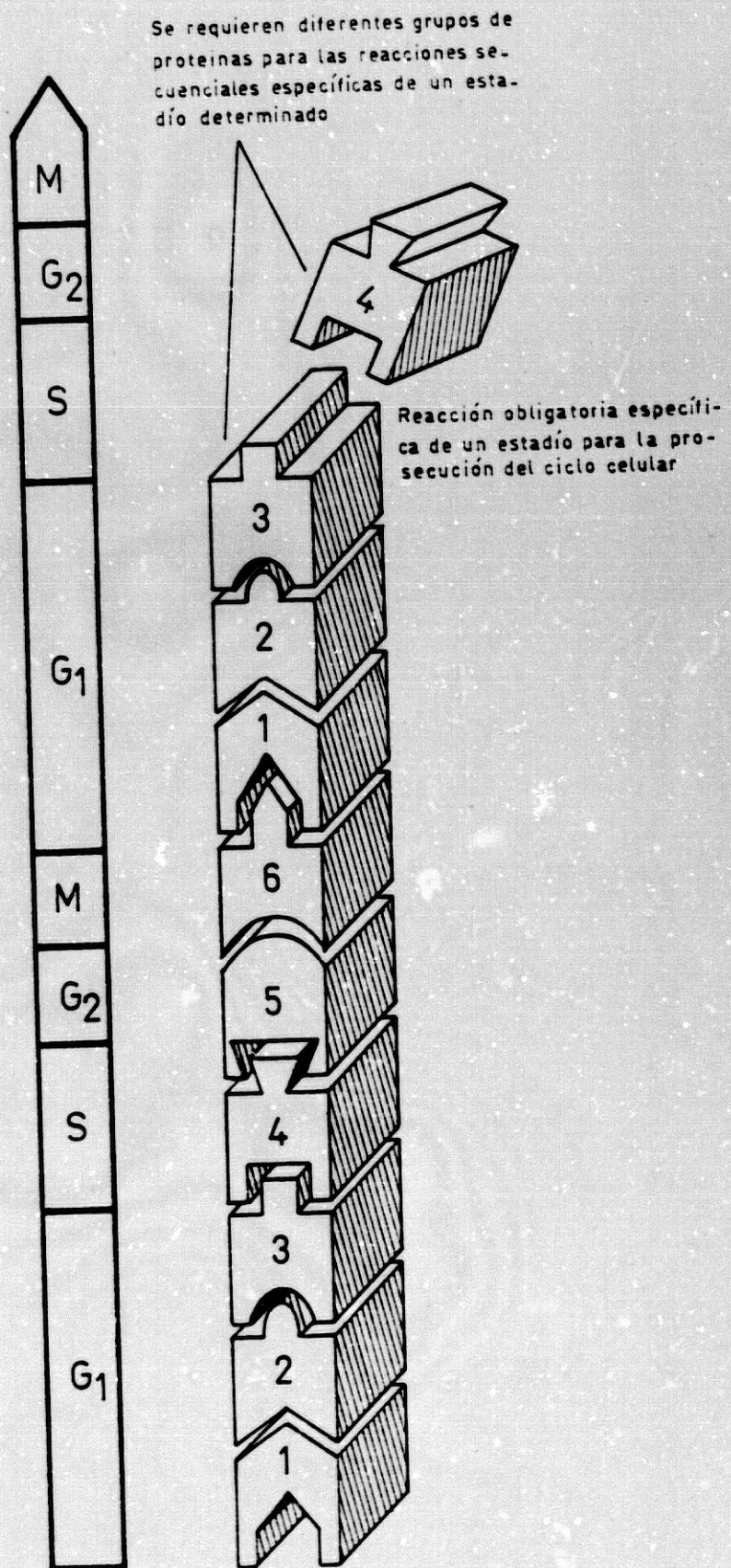
Muchas de estas proteínas sirven como elemento de control y tienen una función esencial en una ruta o proceso

específico del ciclo celular (Hartwell, 1978; Byers, 1981). Además se ha comprobado que la concentración intracelular de esas proteínas excede, en general, la cantidad necesaria que es utilizada en un solo ciclo. Es decir, la síntesis de ciertas proteínas es, desde este punto de vista, independiente de su función dentro del ciclo. Este hecho permite que la célula pueda completar varios ciclos, si por cualquier motivo la síntesis de alguna de sus proteínas reguladoras fuera inhibida o detenida.

El siguiente paso consiste en preguntarse cómo o de qué forma actúan estas proteínas reguladoras. Pues bien, parece ser que el ciclo celular procede por una serie obligatoria de reacciones secuenciales controladas en última instancia por los llamados "genes del ciclo de división celular" (GCDC).

Trabajando con levaduras mutantes, ha sido posible configurar hasta siete grupos de productos de GCDC, que definen otros tantos procesos biosintéticos diferentes dentro del ciclo. Así, por ejemplo, en el núcleo de esos hongos mutantes esta serie de reacciones están organizadas a la manera de un puzzle lineal, en el que debe ensamblarse primero una pieza determinada, antes de que la siguiente haga lo propio (Vid. Fig. 5) (Pringle y Hartwell, 1981). Así pues, estos procesos ocurren siempre en un orden estrictamente cíclico: el cuerpo del huso polar debe duplicarse antes que tenga lugar la replicación del DNA y ésta, a su vez, debe haber ocurrido para que el núcleo se divida, lo cual es condición necesaria para que el cuerpo del huso polar

FIGURA 5: Ilustración esquemática de la transición de una célula a través de varias etapas de su ciclo de crecimiento, condicionadas por el ensamblaje ordenado y regular de proteínas específicas.

FIGURA 5

ueda duplicarse de nuevo. Es posible, por tanto, que determinadas rutas metabólicas en el ciclo celular sean controladas por la mayor o menor rapidez con que se ensamblen elementos ya formados, sin ser necesaria la síntesis proteica específica en fases concretas del ciclo celular.

Otra de las preguntas que surgen cuando se contempla la sistemática del ciclo celular, se refiere a cómo controlan las células su masa para que ésta adquiera un tamaño determinado antes de entrar en mitosis. Cuando se cultivan células genéticamente idénticas, se observa una amplia variación en la masa de unas respecto a otras en el momento de comenzar la mitosis. Sin embargo, cuando se comparan las masas de células tetraploides, diploides y haploides genéticamente relacionadas, justo antes de entrar en el proceso mitótico, éstas resultan ser de 4, 2 y 1 respectivamente. Esto sugiere que existe un mecanismo regulador de la masa celular con respecto al contenido de DNA nuclear; pero que la regulación es mucho más imprecisa a un nivel celular individual.

Las células nuevas formadas tras una mitosis, tienen entre ellas un tamaño diferente. Esas diferencias desaparecen al comienzo de la fase S porque las células nuevas más pequeñas permanecen en G_1 hasta que alcanzan aproximadamente el mismo tamaño que sus hermanas más grandes (Rossow, Riedle y Pardee, 1979; Tyson, García-Herdugo y Sachsenmaier 1979). A partir de ese punto, las fases de división acontecen a la misma velocidad.

De forma similar, en aquellas células con ritmo de síntesis proteica reducido a la mitad por la adición de pequeñas cantidades de un inhibidor, el período G_1 es tres veces más largo que el de las células no inhibidas, mientras que los períodos S y G_2 no varían. Estas observaciones indican la existencia de un sistema especial que controla la masa celular en uno o varios puntos de restricción en G_1 , y parece diseñado para evitar o retrasar la síntesis de DNA hasta que existan en la célula los componentes suficientes para llevar a cabo cada una de las biosíntesis secuenciales requeridas en las fases S, G_2 y M.

¿Cómo se controla el tamaño celular a nivel molecular?. Existen varios modelos; sin embargo, el que cuenta con una aceptación más generalizada postula la existencia de alguna proteína activadora, con alta afinidad para determinados sitios aceptores en los cromosomas. Puesto que solamente la proteína libre sería la forma activa, los cromosomas, al fijarla estrechamente, servirían como elementos inhibidores, evitando que niveles de proteínas por debajo del umbral necesario para saturar los sitios aceptores, pudieran activar la célula y hacerla entrar en la fase S (Prescott, 1976b) (Fig. 6).

Como las células tetraploides requerirían cuatro veces más proteína activadora que las células haploides para iniciar la división, aquéllas necesitarían alcanzar una velocidad de síntesis proteica también cuádruple (y así crecer hasta un tamaño correspondientemente mayor) antes de entrar en la fase S.

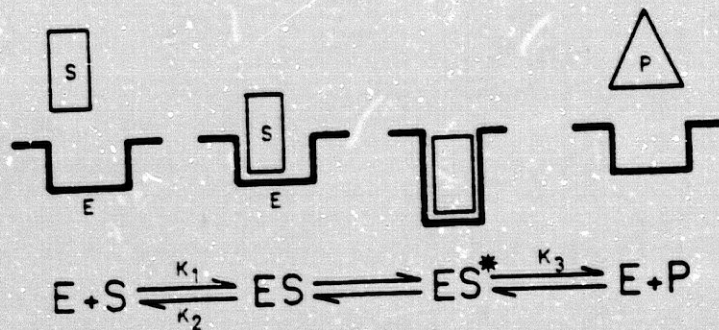
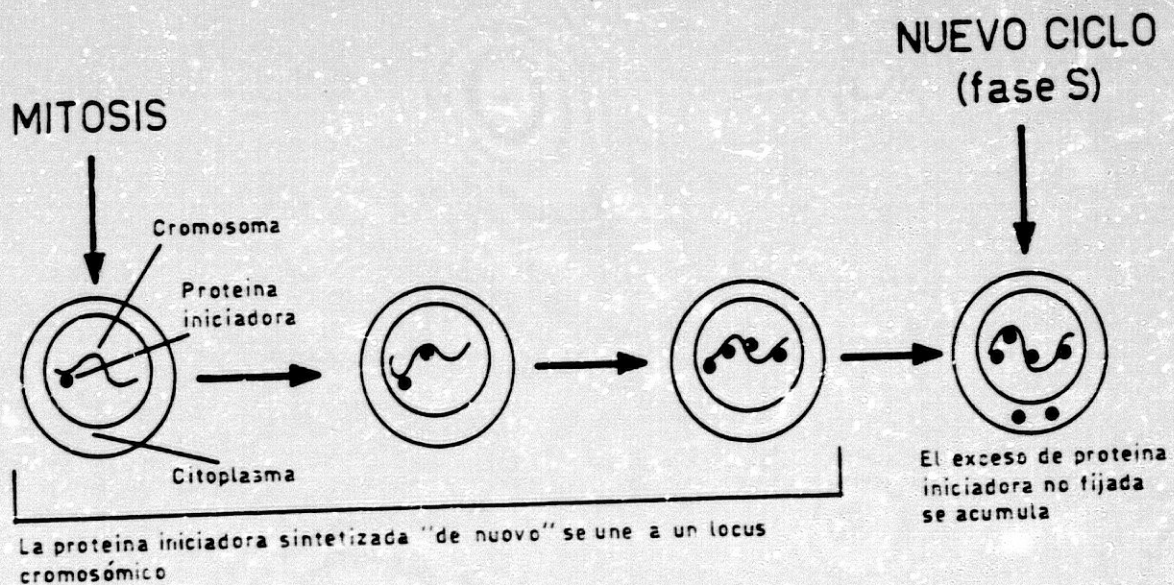


FIGURA 3: Función sugerida para los lípidos en el ciclo catalítico de una enzima de membrana. En el estado transicional $ES \rightleftharpoons ES^*$ se requieren lípidos en estado fluido.

FIGURA 6: Esquema biológico sugerido para explicar los modelos que postulan la acumulación en el núcleo de una proteína iniciadora hasta alcanzar un valor umbral necesario para que pueda iniciarse un nuevo ciclo celular.



Ahora bien, si es necesario que la concentración de una (o esas) proteínas activadora alcance un umbral determinado en G_1 para que tenga lugar el comienzo de un nuevo ciclo, no es, sin embargo, suficiente, puesto que la inhibición de la síntesis proteica, incluso en un punto avanzado de la fase G_2 impide que la célula entre en mitosis, indicando que la síntesis de alguna proteína reguladora en esa fase es esencial para proseguir la división celular (Johnson y Rao, 1970; Bradbury, Inglis y Matthews, 1974).

En 1974, Bradbury y cols. sugieren que hacia el final de la fase G_2 podría activarse una proteinkinasa (estas kinasas catalizan la fosforilación de proteínas), posibilitando la transición de G_2 a M mediante la fosforilación de las proteínas de la lámina nuclear, hecho que provocaría la fragmentación de la envoltura nuclear observada durante la fase M. Esta kinasa llevaría a cabo también una fosforilación intensa de moléculas de histona H1 en los cromosomas mitóticos. Puesto que las histonas H1 se fijan a los nucleosomas en la proporción de 1 molécula/nucleosoma, dando lugar al paquete nucleosómico, su intensa fosforilación, justo antes de la fase M, podría ser la causa principal de la condensación cromosómica, hecho que marca la iniciación del período mitótico celular.

2.- El ciclo celular en las células tumorales.

En los últimos años, mucho se ha investigado en biología molecular en orden a encontrar la causa (o causas) y posible cura del cáncer. Las células cancerígenas presen-

tan una serie de características que las hacen peligrosas para el huésped, incluyendo a menudo la capacidad para invadir otros tejidos e inducir neovascularización (lo que asegura que las células cancerígenas proliferantes tengan un aporte sanguíneo adecuado). Sin embargo, uno de los hallazgos definitorios de las células cancerígenas es que éstas responden anormalmente a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, por lo que se dividen de una forma relativamente incontrolada hasta que acaban con la vida del huésped. Esta mortal ausencia de restricción ha impulsado en gran manera el estudio del control de la división celular (Pierce, Shikes y Fink, 1978; Cairns 1978; Medrano y Pardee, 1980).

Hasta no hace mucho tiempo, la diferencia fundamental entre las células normales y tumorales se postulaba que podía descansar en los cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos celulares, en la fluidez de la membrana plasmática, en las proteínas secretadas, en el citoesqueleto, y en el flujo de iones, por citar sólo algunos ejemplos. A pesar de que aún son difíciles de comprender los mecanismos moleculares de este fenómeno, está claro que las células son menos susceptibles a la mayoría de los mecanismos de feedback que controlan la división celular normal, tanto en tejidos como en cultivos. Así p. ej., las células cancerosas se continuarían dividiendo en cultivo, más allá del punto en el que las células normales se detienen por inhibición por contacto, proliferando y apilándose unas sobre otras cuando ya carecen de espacio por donde extenderse en la placa de cultivo. Más aún, las células cancerosas requie

ren menos factores proteicos de crecimiento que las células normales, al objeto de sobrevivir y dividirse en cultivos - (en algunos casos ésto puede ser debido a que producen sus propios factores de crecimiento).

Una segunda diferencia, y fundamentalmente importante, entre las células normales y las cancerígenas, es - que éstas últimas, como una población, pueden dividirse indefinidamente. Por el contrario, casi todas las células en los mamíferos suelen morir tras un número limitado de divisiones, como es el caso de los fibroblastos normales de mamíferos, que en cultivo se dividen por término medio entre 20 y 50 veces, dependiendo del animal del que procedan. A medida que un cultivo va envejeciendo, sus células individuales cada vez tardan más en cumplir un ciclo divisorio, - para terminar por detener la división y morir. Por lo general, las células provenientes de animales más viejos se dividirán menos veces en cultivo que las mismas células tomadas de un animal joven, sugiriendo que las células más viejas ya han usado la mayoría de sus divisiones asignadas en el animal.

Tales observaciones han llevado a creer que las células están programadas para morir tras un un cierto número de divisiones. Esta "muerte celular programada", podría concebiblemente servirle al organismo como una salvaguarda adicional contra el crecimiento desenfrenado de una célula en particular. Ello significa que la mayoría de las células que escapan del control normal de la división celular, podrían dar lugar sólo a un clono relativamente pequeño de cé

lulas progenitoras antes de que se muera la población total.

Scott y cols. (1984), encontraron en el sistema de proadipocitos 3T3 T, que mientras las células 3T3 T normales tenían capacidad de parar en el estadio G_D , diferenciarse, así como detenerse en los estadios G_C , G_S y G_N ; las células 3T3 T transformadas no podían parar en G_D , diferenciarse ni detenerse en G_C , pero sí podían efectuar parada en G_S y G_N .

Observaron que ciertos clones de estas células, que tenían solamente un defecto en el paro en G_D y diferenciación, no eran células transformadas, pero tampoco eran células tumorales aquellos clones de 3T3 T en las que, presentando capacidad de paro en G_D y diferenciación, tenían, sin embargo, algún defecto en alguno de los otros estadios de G_1 .

La conclusión más inmediata es que para que una célula sea transformada o tumorigena, debe de presentar no sólo un defecto en el paro en G_D , junto con un defecto en la diferenciación, sino además en una o más del resto de las etapas en G_1 .

Estos autores sugieren que durante el proceso de iniciación de la carcinogénesis, ocurrirían uno o más defectos a nivel de G_D , mientras que durante la promoción se desarrollarían alteraciones en los estadios G_S , G_C y G_N .

3.- Enzimología de las células neoplásicas.

El complemento enzimático asociado a un tejido diferenciado de un animal o persona adulta, es bastante característico de tal tejido. Puede cambiar en respuesta a influencias hormonales o dietéticas, pero es generalmente tal que el metabolismo celular es óptimo, si se mantienen unas condiciones basales específicas.

Aunque algunas enzimas son comunes a todos los tejidos, su concentración puede variar de un órgano a otro. Por ejemplo, en el páncreas existen cantidades muy elevadas de amilasa. En la saliva también hay gran cantidad de una forma diferente de esta enzima. La lactosa-sintetasa sólo se encuentra en la glándula mamaria en periodo de lactación mientras los enzimas de la neoglucogénesis se limitan al hígado y córtex renal.

De manera similar, el patrón enzimático del embrión en sus primeros estadios de desarrollo, es el más adecuado para sus necesidades metabólicas (gran velocidad de crecimiento y división) y difiere del correspondiente a un tejido adulto diferenciado.

En el feto ya se observan alguno de los patrones enzimáticos de diferenciación que se encontrarán luego en los órganos desarrollados; pero los enzimas requeridos específicamente para el crecimiento (p. ej. enzimas de la síntesis del DNA) aparecen en mayores cantidades que en los tejidos adultos correspondientes, especialmente aquéllos que no

se dividen activamente (p. ej. hígado y tejido muscular). - Por otra parte, enzimas específicos de ciertos tejidos del adulto, están ausentes o con actividad muy reducida en el feto.

Al considerar el tipo de cambios enzimáticos que puede esperarse ocurran en los tumores, es útil tener en cuenta la naturaleza de la célula tumoral que se vaya a estudiar; sin embargo, como norma más o menos general, parece que los tumores con alto grado de diferenciación se desvían poco bioquímicamente de un correlato tisular normal, mientras que los pobremente diferenciados muestran los mayores cambios bioquímicos, y por tanto enzimáticos.

Ya en 1954 Greenstein observó, midiendo la actividad de ciertas enzimas en una serie de tumores, que el patrón enzimático de un tumor se parecía más al de otros tumores que al de su tejido parental normal. Weber en 1966, formuló el concepto de "correlación molecular tumoral", cuyo principio básico establece que las enzimas clave de las rutas metabólicas aumentan o decrecen proporcionalmente con la velocidad de crecimiento tumoral.

En los años previos al comienzo de esta última década, se formuló el concepto de "enzimas fetales" como marcadores tumorales, extendiéndose el campo a los "isoenzimas oncofetales o carcinoplacentarios" (Fishman y Sell, 1976; Fishman y Farron-Furstenthal, 1978). Sin embargo, aunque los tumores muestran a menudo enzimas y patrones isoenzimáticos "fetales", debe tenerse en cuenta que este fenómeno -

no es fruto de una retrodiferenciación genética, sino más bien el producto de una programación alterada en el genoma del tejido adulto, que ocasiona la producción, no sólo de enzimas atípicas, sino también de hormonas ectópicas.

Por la amplitud del tema y los resultados dispares encontrados por distintos autores en los patrones enzimáticos para una misma ruta en tumores similares o viceversa, limitaremos la revisión de esta sección a aquellas enzimas y sistemas tumorales mejor y más ampliamente estudiados.

3.1.- Enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos.

Puesto que el crecimiento tumoral implica división celular, lo que conlleva a su vez síntesis de DNA, las enzimas de la síntesis y catálisis de RNA y DNA han sido estudiadas ampliamente, sobre todo en hepatomas de rata frente a hígados normales fetales y adultos, así como aquéllos en proceso regenerativo del mismo animal (Sneider y Potter, 1969; Weber y cols., 1971). En general, la actividad de los enzimas biosintéticos, incluyendo aquéllos de las llamadas vías de salvamento, está incrementada en los hepatomas e hígados en proceso regenerativo con relación a la que presentan estos enzimas en hígados normales. Con los enzimas de las vías degradativas ocurre lo contrario. En algunos casos de fermentos que intervienen en el catabolismo de las purinas, p. ej. la uricasa, existe una reducción de la actividad en hepatomas, pero no en hígados regenerativos o hígados fetales (Weber, 1977). Esto demuestra una vez más que el proceso tumoral no implica una reversión a estadios feta

lev, sino una programación alterada del genoma hepático -
adulto.

Los enzimas específicos para la síntesis de DNA, como la DNA-polimerasa, timidilatoquinasa y timidilato sintetasa, están elevados en los hepatomas con respecto a los del hígado que lleva el tumor, pero no invadido por él, aunque su actividad es considerablemente más baja que en hígados -
fetales (Cummins y Balinsky, 1979b). Los niveles de Deoxicitidilato-deaminasa son muy altos en el hígado humano y también, aunque menos, en los hepatomas; no así en el hígado -
fetal, con concentraciones bastante menores que en el caso de los procesos malignos. Esta enzima puede usar el sustrato alternativo 5-metildeoxicitidilato, produciendo citidilato directamente. Esto representa una ruta alternativa en la síntesis del timidilato, intermediario esencial en la síntesis de DNA, si existe suficiente 5-metildeoxicitidilato proveniente de la catálisis de DNA (Fig. 7).

El hecho de que las enzimas operantes en la vía -
sintética del DNA presenten, en general, más actividad en los hígados fetales que en los hepatomas, sugiere que la velocidad de crecimiento en éstos es bastante menor que en los primeros. Los altos niveles de DNA-polimerasa y timidilatoquinasa en los hepatocitos normales de hígados portadores de un hepatoma, podría deberse a un efecto del mismo tumor sobre el hígado, o ser el trasunto de un proceso regenerativo del daño causado por el tumor invasor.

Taylor y cols. en 1972, detectaron formas diferen

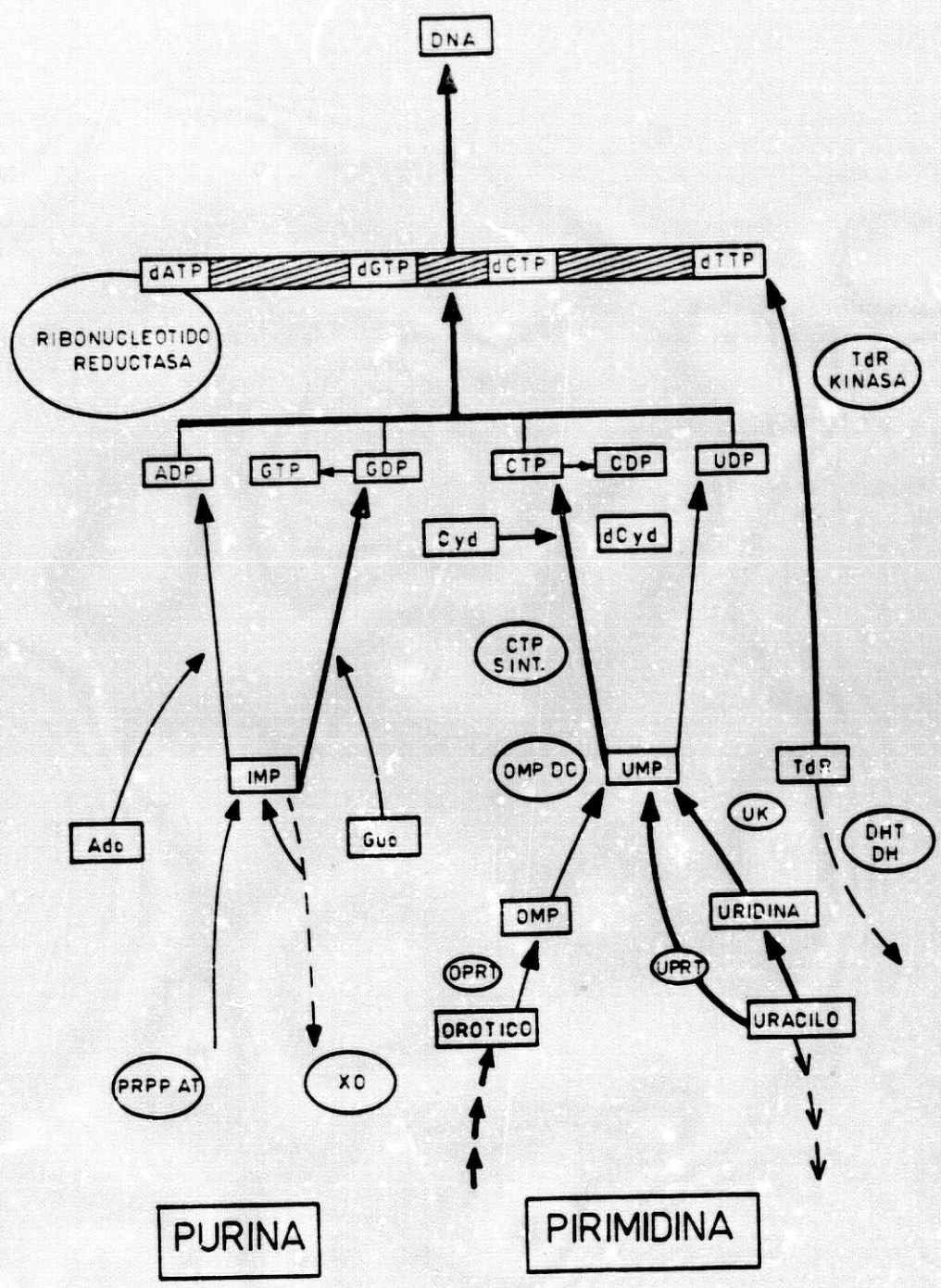


FIGURA 7: Rutas biosintéticas de ácidos nucleicos en células de hepatomas humanos.

tes de timidinquinasa en hígados fetales y adultos humanos; también encontraron la forma fetal en líneas celulares como HeLa y KB. Cummins y Balinsky (1979a), no pudieron demostrar, sin embargo, la forma fetal en hepatomas humanos.

3.2.- Enzimas del metabolismo de los carbohidratos.

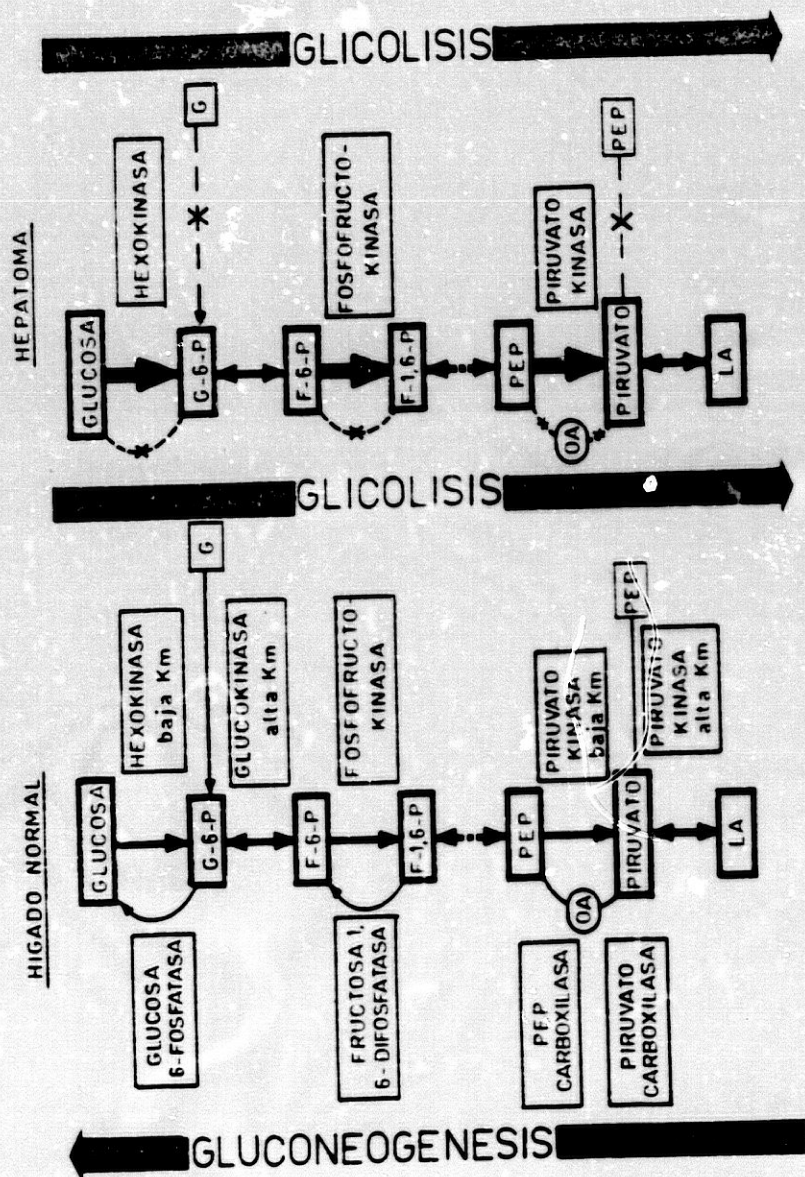
Por ser el hígado un órgano especialmente adecuado para estudiar el metabolismo de los carbohidratos, las enzimas catalizadoras de estas vías han sido estudiadas y comparadas de forma exhaustiva en hígados normales y hepatomas, tanto de rata como humanos (Weber, 1977; Hammond y Balinsky, 1978a). La glicolisis tiene lugar en todos los tejidos y proporciona la energía necesaria, en forma de ATP, requerida por muchos procesos biosintéticos, incluyendo la síntesis de DNA (Fig. 7 bis).

Una de las primeras observaciones sobre la bioquímica del cáncer data de hace 62 años, cuando Warburg, en 1924, demostró que la glicolisis estaba incrementada en los tejidos tumorales. No obstante, este principio no es general, ya que los tejidos altamente diferenciados, con un crecimiento lento, tienen poca actividad glicolítica (Edwood y cols., 1963). Las enzimas de la vía glicolítica han sido estudiadas ampliamente en tumores, especialmente las kinasas que catalizan virtualmente reacciones unidireccionales.

En hepatomas de rata, las enzimas glicolíticas clave hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa, están incrementadas en tumores con crecimiento rápido, siendo

FIGURA 7 bis: Estrategia bioquímica de las células tumorales, especificada en una reprogramación de la expresión genética que se manifiesta en desbalances cuantitativos y cualitativos del metabolismo de los carbohidratos. La (X) sobre las flechas denota la ausencia de aquellos enzimas en hepatomas con crecimiento muy rápido.

FIGURA 7 bis



la elevación proporcional a la velocidad de crecimiento neoplásico. En hepatomas humanos existe una variabilidad considerable y sólo la piruvatocinasa está elevada en todos los hepatomas (Balinsky y cols., 1973a).

La neoglucogénesis, vía esencialmente inversa a la glucólisis, utiliza los mismos enzimas, salvo en algunos puntos clave donde una enzima diferente cataliza la reacción en dirección opuesta; tales son la piruvatocarboxilasa, fosfoenol-piruvatocarboxiquinasa, fructosa-bifosfatasa y glucosa 6-fosfatasa. Pues bien, todas ellas tienen una actividad muy reducida en hepatomas de rata, donde la reducción es proporcional a la velocidad de crecimiento tumoral (Weber y Lea, 1966). En hepatomas humanos, esos enzimas están considerablemente reducidos en todos los casos (Hammond y Balinsky, 1978a).

En hígados fetales de rata, las enzimas de la neoglucogénesis están ausentes hasta el nacimiento, pues posiblemente el feto no las necesite al recibir glucosa desde la sangre materna (Weber y cols., 1971). Sin embargo, en hígados fetales humanos existen niveles significativos de piruvatocarboxilasa, fosfoenol-piruvatocarboxiquinasa y glucosa 6-fosfatasa desde la 9ª semana de gestación, comparables a los de los hepatomas (Hammond y Balinsky, 1978a).

La fosfoglucomutasa y la glicógenosintetasa, dos enzimas de la síntesis del glucógeno, están considerablemente descendidas en los hepatomas humanos y de rata, mientras que en los hígados fetales humanos se observan niveles bas-

tante elevados (Sato y cols., 1973). Los bajos niveles de estas enzimas en los hepatomas se debe probablemente a que éstos utilizan la glucosa directamente en la vía glicolítica.

Las enzimas de la vía shunt hexose-monofosfato también están aumentadas en hepatomas de rata; pero en el caso humano, la glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa (única enzima suficientemente estudiada) no muestra diferencias con respecto a hígados normales (Balinsky y cols., 1973a), hecho inesperado, ya que la vía de las pentosas es la responsable de la síntesis de los azúcares requeridos para la formación de ácidos nucleicos y otros nucleótidos reductores (en forma de NADPH) necesarios en muchas rutas biosintéticas.

3.3.- Enzimas específicas de tejido.

Las enzimas que se encuentran sólo en tejidos específicos, pueden desaparecer en tumores derivados de esos tejidos, como en el caso de las enzimas neoglucogénicas. Si persisten, pueden ser de utilidad diagnóstica, especialmente en el caso de las metástasis, o bien servir como guía terapéutica. La lactosasintetasa se localiza solamente en el tejido mamario. Está formada por dos proteínas diferentes: la proteína A (UDP galactosiltransferasa), que está presente en una amplia variedad de tejidos y la proteína B (alfa-lactoalbúmina), que modifica alostéricamente a la proteína A, permitiendo la síntesis de lactosa. Esta proteína B es exclusiva del tejido mamario. Schultz y Fbner en 1977 demos-

traron la presencia de alfa-lactoalbúmina en tumores mamarios mantenidos en cultivo, mientras que células malignas cervicales y laríngeas no contenían dicha proteína.

La actividad lactosa-sintetasa es baja en ratas inmaduras, y no es incrementada en respuesta a un estímulo con prolactina, lo contrario de lo que ocurre en el tejido mamario maduro y en los carcinomas mamarios transplantables de rata. Estos, sin embargo, aunque responden, lo hacen débilmente. Estas diferencias podrían deberse simplemente a la ausencia de receptores en el tejido inmaduro y a una reducción de ellos en el tejido tumoral. Woods y cols. en 1977, utilizando una técnica de radioinmunoensayo, encontraron alfa-lactoalbúmina en 20 de 53 carcinomas de mama humanos, demostrando una correlación positiva entre las tasas de la proteína y el nivel de receptores estrogénicos. De hecho, recomendaron la determinación de lactoalbúmina como marcador de aquellos tumores mamarios susceptibles de terapia endocrina. No obstante, Schultz y cols. en 1979 no observaron correlación entre la concentración de alfa-lactoalbúmina y la de receptores para estrógenos.

3.4.- Isoenzimas en los tumores.

Aunque las diferencias de actividad enzimática son indicativas de alteraciones metabólicas y la determinación de esas actividades puede utilizarse para detectar la presencia de algunos tumores, en muchos casos el estudio de las isoenzimas nos dará una información más detallada y precisa sobre los cambios metabólicos.

Muchas enzimas aparecen en formas moleculares múltiples, con diferentes propiedades físicas o fisicoquímicas (Markert, 1975), de manera que la forma o formas predominantes en un órgano particular le permiten un funcionamiento metabólico óptimo.

En un sentido amplio, las isoenzimas pueden conceptuarse como especies moleculares diferentes de enzimas, que catalizan la misma reacción. La Comisión de Nomenclatura Bioquímica, perteneciente a la Unión Internacional de Bioquímica, recomendó en 1973 que el término "formas múltiples de una enzima" se utilizase para describir proteínas con "la misma actividad enzimática que aparecen de manera natural en una especie particular", y que el término isoenzima se reservase sólo para aquellas formas "que surgen como consecuencia de diferencias genéticamente determinadas en la estructura primaria".

Cuando tienen lugar cambios isoenzimáticos en tejidos cancerosos, generalmente se asume que representan alteraciones de isoenzimas verdaderos (conforme a las puntualizaciones terminológicas esbozadas más arriba), donde el gen responsable de la síntesis del producto isoenzimático mayor en el tejido normal está reprimido, en tanto que el gen responsable de la síntesis de otra isoenzima está activado. Pero las alteraciones podrían ser post-transcripcionales por lo que es necesaria una caracterización fisicoquímica cuidadosa de la proteína, para determinar si la isoenzima alterada es un "nuevo" producto genético, o representa modificaciones post-transcripcionales de la proteína o de la par-

te glucídica en el caso de una glicoproteína. Por otra parte, la oxidación de algunos grupos sulfhidrilos proteicos o la unión de una pequeña molécula cargada, podrían dar lugar a cambios isoenzimáticos aparentes. Además, muchas enzimas presentan variantes alélicas en diferentes individuos de la misma especie, de ahí la necesidad de comparar el tejido canceroso con tejido normal del mismo individuo, para eliminar la posibilidad de que las posibles diferencias observadas sean simplemente fruto del polimorfismo genético.

Como ya hemos mencionado en el prólogo de esta sección, el patrón isoenzimático de un órgano adulto completamente diferenciado varía del que corresponde a ese mismo órgano fetal. El tejido tumoral presenta frecuentemente patrones isoenzimáticos alterados con respecto a su tejido parental, reflejando la alteración de su metabolismo. Las isoenzimas que aparecen en los tumores no son realmente isoenzimas "nuevas"; generalmente son isoenzimas que están presentes en otros tejidos del mismo animal y frecuentemente son idénticas a las de ciertos tejidos fetales o placentarios.

Las isoenzimas más extensamente estudiadas han sido las de la lactatodeshidrogenasa, piruvatoquinasa, aldolasa, hexoquinasa y fosfatasa alcalina. Sobre éstas haremos una breve revisión.

3.4.1.- Lactatodeshidrogenasa (LDH)

La LDH está codificada por tres genes que dan lu-

gar a las subunidades A (ó M), B (ó H) y C (ó X). La subunidad C sólo se observa en los testículos maduros y el esperma (Wheat y Goldberg, 1975), mientras que las subunidades A y B se producen en todos los tejidos, pero en diferentes - proporciones para cada órgano particular. Estas dos subunidades A y B dan lugar a cinco formas moleculares distintas (isoenzimas) en forma de tetrámeros B_4 (LDH₁), B_3A (LDH₂), B_2A_2 (LDH₃), BA_3 (LDH₄) y A_4 (LDH₅).

Generalmente, en los tejidos cancerosos existe un incremento en la proporción de subunidades A (Goldman y cols., 1964; Schapira, 1973). Bajo condiciones anaeróbicas se eleva la tasa de síntesis de subunidades A, mientras que altas tensiones de oxígeno la inhiben (Goodfriend y cols., 1966). Esto sugiere que el aumento de subunidades A en tumores podría deberse a que en éstos existen unas condiciones relativamente anaeróbicas, debido a un deficiente suplemento sanguíneo. Sin embargo, las altas tasas de subunidades A en el hígado de casi todos los mamíferos evidencia que la implicación anterior no es aplicable en todos los casos, ya que el hígado es un órgano aerobio.

En algunos casos de hepatomas humanos, la subunidad B, contra lo que cabría esperar, tiende a incrementarse. Lo mismo sucede en muchos rhabdiosarcomas (Balinsky y cols 1973a), evidenciando que el patrón isoenzimático de un tumor puede ser simplemente diferente del que corresponde al tejido normal, sin seguir ninguna regla general.

Estos hepatomas con proporciones incrementadas de

la subunidad B, presentan un molde isoenzimático muy parecido al del hígado fetal humano normal, donde la concentración de subunidades A y B son similares, siendo LDH₃ la forma predominante.

3.4.2.- Piruvatocinasa (PK).

Esta enzima aparece en tres formas homotetraméricas principales, codificadas por genes separados. La forma I (PK-I) predomina en el hígado adulto y es una enzima alostérica que está estrechamente regulada: es inducida por insulina y también por una dieta rica en carbohidratos, mientras que el ayuno la inhibe (Tanaka y cols., 1967). Por otra parte, la PK-I puede ser fosforilada por una proteinkinasa dependiente de AMP cíclico a una forma menos activa, la cual es susceptible de ser defosforilada nuevamente por una histonafosfatasa (Ljungström y cols., 1974; Titanji y cols., 1976), lo cual representa un control adicional. La fructosa 1-6 bifosfato activa a PK-I, mientras que el ATP y la alanina tienen el efecto contrario (Balinsky y cols., 1973a).

La forma M (PK-II) predomina en el músculo esquelético adulto y el cerebro. No es alostérica y tiene una constante de Michaelis mucho más baja que PK-I para el sustrato fosfoenolpiruvato. La fructosa 1-6 bifosfato no tiene ningún efecto sobre ella.

La forma K (PK-III) es la que presenta mayor concentración en todos los demás tejidos. Muestra algunas pro-

propiedades reguladoras, con una cinética alostérica discreta para el fosfoenolpiruvato (Balinsky y cols., 1973b). En el hígado fetal de rata la PK-III es la forma más importante, mientras en el humano lo es la PK-I.

Además de estos tres tipos principales, existen numerosas formas menores que seguramente representan modificaciones de alguna de las tres primeras, por cambios de conformación o fijación a ellas de pequeñas moléculas o péptidos (Ibsen, 1977).

En hepatomas de rata, con distintas tasas de crecimiento, la PK-I está descendida, mientras la actividad PK-III se incrementa. Estos cambios son más marcados cuanto más indiferenciado es el tumor (Farina y cols., 1974). En hepatocitos proliferantes e hígados en regeneración también se observa un incremento de PK-III, hecho indicativo de que la aparición de esta forma parece ser representativa de crecimiento y división, más que de malignidad.

En hepatomas humanos PK-III es también la forma predominante, mientras la presencia de PK-I es muy variable (Hammond y Balinsky, 1978b). En algunos casos se ha encontrado PK-II, así como bandas con movilidad electroforética intermedias entre PK-I y PK-III que posiblemente representen formas híbridas.

En el tejido hepático morfológicamente normal de pacientes con hepatomas, también existe un patrón isoenzimático aberrante comparado con el del hígado normal, con re-

decrecimiento de PK-I e incremento de PK-III. En algunos casos el patrón es prácticamente igual al del hepatoma y en otros es intermedio entre el de hepatomas y el de hígados normales. Como la actividad total PK no está afectada, es posible que la elevación de PK-III sea debida a una influencia del tumor.

La significación biológica de cambio de isoenzima de PK-I a PK-III en los hepatomas parece clara, si consideramos que en el hígado, un órgano neoglucogénico, el flujo de fosfoenolpiruvato hacia piruvato y lactato, o hacia la síntesis de glucosa, debe ser controlado cuidadosamente. En los tumores hepáticos, los enzimas neoglucogénicos están muy descendidos. Además, una glucólisis activa en ellos es esencial para proporcionarles ATP, necesario en muchas cadenas biosintéticas de un tejido en crecimiento. Así pues, una enzima con una constante de Michaelis baja para fosfoenolpiruvato y menos sujeta a la inhibición por ATP, podría ser beneficiosa para una glicólisis eficiente.

3.4.3.- Hexokinasa (HK).

Existen al menos cuatro formas diferentes de esta enzima, denominadas HK I-IV, de acuerdo con su creciente movilidad electroforética hacia el ánodo. A HK-IV se le considera una enzima distinta, denominada glucokinasa. Se localiza fundamentalmente en el hígado y tiene una constante de Michaelis alta para la glucosa. Tanto la glucokinasa como HK-II son inducidas por insulina y desaparecen en condiciones de ayuno (Sharma y cols., 1963). HK-II está elevada en

hepatomas con diferentes tasas de crecimiento, en tanto que HK-III puede estar elevada o disminuida (Sato y cols., 1969; Weichouse y cols., 1972).

HK-I es la isoenzima predominante en todos los tejidos humanos normales, siendo la única forma encontrada en el músculo, cerebro, corazón y páncreo adiposo (Neumann y cols., 1974). Hammond y Balinsky en 1978 (1978b), observaron una banda adicional (HK-II_f) entre HK-II y HK-III, tanto en hígados fetales como adultos e incluso en hepatomas. En los hepatomas humanos primarios, las isoenzimas específicas del hígado HK-III y HK-IV están reducidas o son indetectables, mientras HK-II y HK-II_f se elevan (Hammond y Balinsky, 1978b). Los hígados de pacientes con hepatoma difieren del hígado normal en que hay HK-II y un incremento de HK-II_f, pero en cantidades más bajas que en el hepatoma del mismo paciente, es decir, muestran un patrón intermedio entre el de la víscera hepática normal y el del tumor. El patrón del hígado fetal semeja el del paciente portador de un hepatoma.

En el cerebro fetal sobresale la actividad HK-I en los primeros estadios, con la aparición de HK-II en el período tardío de la gestación. En el cerebro adulto predomina HK-I y los gliomas presentan HK-I y HK-II, evidenciando que el patrón tumoral es distinto tanto al del cerebro adulto como al del fetal en una fase temprana de desarrollo (Hammond y Balinsky, 1978b).

3.4.4.- Aldolasa (AD)

La aldolasa es una enzima glicolítica bifuncional que hidroliza fructosa 1-5 bifosfato (FDP) en dos triosas: gliceraldehído-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato. Puede hidrolizar también la fructosa 1-fosfato (F1P). Hay tres formas homogéneas de aldolasa codificadas por otros tantos genes: la forma A se localiza principalmente en el músculo; B en el hígado y C en el cerebro. La aldolasa B hidroliza rápidamente F1P y la A ya hemos dicho que lo hace lentamente, por lo cual la proporción FDP/F1P puede utilizarse para identificar la isoenzima sérica predominante.

En los hepatomas de rata y humanos existe una reducción de aldolasa B, detectándose también las isoenzimas A y C; sin embargo, en los hígados regenerativos sólo se encuentra la forma B (Berges y cols., 1974).

Los gliomas, teniendo en cuenta que se originan en el epitelio medular cerebral, tienen un patrón isoenzimático similar al del cerebro normal, con A_4 y el híbrido A_3C como elementos predominantes y con C_4 en menor proporción (Sato y cols., 1971). La mayor parte de los meningiomas y tumores metastásicos de cerebro en pulmón o estómago sólo tienen A_4 y A_3C .

3.4.5.- Fosfatasa alcalina (F. Alc.)

Las fosfatasas alcalinas tienen una distribución muy amplia en los tejidos animales, aunque su función es

aún oscura en muchos puntos. Catalizan la hidrólisis de varios enlaces esterfosfato, distinguiéndose de las fosfatasa - sas ácidas por un pH óptimo alcalino.

Esta enzima se presenta en cuatro tipos isoenzimá - ticos distintos, localizados cada uno de ellos preferencial - si no exclusivamente, en hueso, hígado, intestino y placen - ta. La F Alc placentaria y la intestinal están inmunológica - mente muy relacionadas (Lenmann, 1976) aunque presentan di - ferencias en su movilidad electroforética, pH óptimo, cons - tantes de Michaelis y termoestabilidad (Hirano y cols., - 1977).

En 1968 Fishman y cols. encontraron en el suero y tejido tumoral de un paciente con carcinoma broncogénico - una variante de F Alc, denominada variante "Regan", que pre - senta una estrecha similitud con la forma placentaria. Esta variante fue hallada posteriormente en el suero de pacien - tes con cánceres diversos (Fishman, 1974).

L. Fishman y cols. en 1976 identificaron dos for - mas de F Alc en el tejido microvilliar trofoblástico de 6 a 10 semanas. Una de estas formas aparecía también en el teji - do testicular. El tejido neoplásico pulmonar muestra una de las bandas definidas en los villi trofoblásticos (W. H. - Fishman y cols., 1976).

Se han descrito distintas variantes asociadas a - diversos tumores, que en un principio se pensó que no tení - an correlato en tejidos normales; pero después se ha compro

bado que todas ellas tienen sus contrapartidas en los tejidos de las primeras fases del desarrollo embrionario.

4.- La célula tumoral frente a los factores reguladores del crecimiento.

Las variaciones de las propiedades y factores bioquímicos de las células tumorales en relación con las normales son muy polimorfas y varían de un tipo de célula tumoral a otra. No pretendemos en este apartado hacer un estudio intenso de los mismos, sino comentar aquellos que puedan tener una relación más o menos directa con la disregulación del crecimiento celular.

4.1.- TGF.

Se ha observado que las células neoplásicas tienen una menor necesidad de nutrientes y factores del crecimiento cuando son cultivadas (Eagle y cols., 1970). Una posible explicación para este fenómeno es que las células tumorales secreten sus propios factores del crecimiento (TGF: Transforming Growth Factors) (Todaro y De Larco, 1978).

Los TGF están relacionados de alguna forma con los EGF, ya que aquellos tumores con capacidad de producir TGF presentan menor número de receptores para EGF; por ello se supone que los factores sintetizados por el tumor pueden sustituir la posible actividad estimuladora de los EGF. Los TGF son polipéptidos funcionalmente relacionados con los EGF, pero al contrario que éstos, inducen una transform

ción en las células normales en cultivo; principalmente determinan la pérdida de anclaje característica de las células no transformadas, aunque este efecto es reversible, pues desaparece cuando se eliminan del medio los TGF (Todaro y cols., 1982).

Se ha observado que los TGF producidos por ciertos tumores, interaccionan con receptores específicos para EGF.

Los TGF son una familia de péptidos termoestables con un peso molecular alrededor de 7.400. A pesar de competir con EGF por el mismo receptor y de tener algunas características físico-químicas comunes, no son la misma molécula, ya que presentan diferencias en su composición de aminoácidos y los anticuerpos dirigidos frente a EGF no reconocen a TGF (Todaro y cols., 1982).

Estos factores del crecimiento sintetizados por las células tumorales, permitirían que éstas se volvieran autónomas, en relación con su crecimiento celular, al no depender de la presencia de factores de crecimiento exógenos.

4.2.- Chalonas.

Las células tumorales poseen una capacidad normal de sintetizar chalonas (Terskikh, 1973), pero contienen unas cantidades bajas de estas sustancias. Se piensa que las células cancerosas no retienen chalonas debido a un incremento de la permeabilidad de su membrana, por tanto la prolife

ración de estas células no es susceptible de ser regulada - por las chalonas. No obstante, se cree que los tumores tienen capacidad de ser regulados por las chalonas, ya que la inoculación de estas sustancias dentro de un tumor, ha inducido la represión del mismo.

4.3.- Prostaglandinas.

Las células tumorales aumentan la síntesis de prostaglandinas (PG), sobre todo la PGE. Ya se ha visto que la PGE y la PGA son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales y normales (Turner y cols., 1982; Mayschak y cols., 1982; Pelus, 1982). Sin embargo, se ha observado que las células de médula ósea de pacientes con leucemia monocítica crónica son menos sensibles a la inhibición por PGE que las células de médula ósea de individuos normales (Pelus, 1982). Estos resultados podían sugerir que las células tumorales o incluso las células en un estadio anterior al desarrollo del tumor, serían menos susceptibles a la regulación por PGE que las células normales (Aglietta y cols. 1983).

4.4.- Poliaminas.

Algunos, pero no todos, de los tumores humanos y animales contienen altos niveles de ornitina-decarboxilasa y elevadas concentraciones de poliaminas. De todas formas, no hay una razón para concluir que un incremento de poliaminas pudiera estar relacionado con el proceso neoplásico, simplemente puede reflejar la variación normal del metabo -

lismo de una célula proliferante (Russell, 1973).

Tampoco se sabe mucho sobre la relación del efecto inhibitor de las poliaminas sobre las células tumorales; quizás éstas pudieran ser menos sensibles a la acción inhibitora de las poliaminas, de forma análoga a lo que ocurre con la PGE (Quash y cols., 1979).

5.- Carcinógenos: clases, mecanismos de acción y tipos de lesión inducidos sobre el DNA.

Se ha descubierto un gran número de agentes con actividad cancerígena en nuestra biosfera y casi a diario se identifican otros nuevos, muchos de los cuales son subproductos nocivos de las sociedades tecnológicamente avanzadas (McCann y Ames, 1976).

Incluidos en la lista de carcinógenos físicos están las radiaciones (ionizantes y no ionizantes) y cuerpos extraños (fibras de asbesto, p. ej.). Entre los carcinógenos químicos, algunos como los agentes alquilantes simples son activos per se; sin embargo, la mayoría son inactivos en su forma nativa y requieren conversión metabólica (por reductasas u oxidasas con función mixta) a derivados activos. A los representantes de este último subgrupo se les llama procarcinógenos. Suele tratarse de componentes químicos de mezclas complejas (productos condensados del tabaco, del hollín y del petróleo) o productos puros como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas alifáticas y aflatoxina B₁ (una micotoxina que contamina los alimentos).

La potencialidad carcinogénica de la mayoría de los agentes ambientales reside en su capacidad para interactuar, en último término, con el DNA y alterarlo estructuralmente (Cerutti, 1978). Muchos carcinógenos químicos (bien ellos mismos o sus metabolitos reactivos) son potentes sustancias electrofílicas que reaccionan directamente con grupos nucleofílicos del DNA, formando enlaces covalentes estables. Algunos otros lesionan el genoma indirectamente mediante la generación de radicales libres reactivos. Ejemplos de estos últimos son la Bleomicina (BM) y la Neocarzinostatina (NCS), dos antibióticos antitumorales cuyos efectos biológicos son muy parecidos a los de las radiaciones ionizantes (Shiloh y cols., 1983).

Tanto los carcinógenos físicos como los químicos inducen muchos tipos de modificaciones estructurales en el material genético: sustitución, degradación y pérdida de bases; fragmentación parcial de los azúcares; rotura de enlaces fosfodiéster en una sola hebra; escisiones en puntos coincidentes de ambas hebras; uniones intermoleculares dentro de una misma hebra o entre hebras diferentes del mismo helicoide (vid. Fig. 3).

En general, cualquier carcinógeno puede inducir un espectro amplio de lesiones en el DNA, siendo los ejemplos más característicos los rayos X y los agentes alquilantes (Rajalakshmi y cols., 1982; Paterson y Geutner, 1984). Los rayos gamma son capaces de producir más de 100 alteraciones distintas en las cuatro bases y/o los azúcares constitutivos del DNA, tales como roturas en una o ambas hebras

con diversos grupos químicos como posibles dianas, o bien diversas clases de uniones intermoleculares.

Los agentes alquilantes atacan muchos centros nucleofílicos del DNA. Aparte de hidrolizar enlaces fosfotioester, pueden formar enlaces covalentes en no menos de 15 sitios diferentes: N-7, O⁶, N-3, 2-NH₂ y C-8 de la guanina; N-1, N-3, N-7 y 6-NH₂ de la adenina; N-3, 4-NH₂ y O² de la citosina; y N-3, O² y O⁴ de la timina.

En contraste con los dos tipos de agentes anteriores, la radiación ultravioleta (UV) opera fundamentalmente dando lugar en el DNA a un tipo de fotoproductos (dímeros ciclobutílicos) entre dos pirimidinas adyacentes de la misma hebra. Bajo determinadas condiciones, este agente da lugar a otra clase de fotoproductos [los 6-4' (pirimidin 2'-uno) timinas] que sobrepasan a los dímeros de pirimidina en potencial mutagénico y por tanto carcinogénico (Brash y Haseltine, 1982).

Los agentes vistos hasta aquí, que podríamos englobar bajo el denominador común de carcinógenos de tipo clásico, no son los únicos capaces de favorecer el desarrollo neoplásico a través de su acción sobre el DNA de las células diana. Recientemente, varios investigadores han demostrado que existen otras clases de carcinógenos, llamados en común "agentes promotores", los cuales también dan lugar a lesiones en el DNA (Copeland, 1983). Algunos de estos agentes promotores, tales como los ésteres de forbol, dañan el DNA por una vía indirecta, estimulando la produc-

ción en la célula de radicales de oxígeno muy activos, especialmente aniones superóxido, peróxidos que generan a su vez otros radicales activos (Biraboin, 1983) y factores clastogénicos (Cerutti, 1983).

En los sistemas experimentales animales, el proceso de la carcinogénesis puede dividirse en, al menos, dos estadios secuenciales: iniciación y promoción, de los que hablaremos con detenimiento más adelante. Aunque la naturaleza y los mecanismos que median cada uno de estos estadios no están aún aclarados, parece probable que la iniciación se deba a procesos mutagénicos irreversibles en el DNA, mientras en la promoción intervendría una alteración pleiotrópica en la regulación de la expresión genética (posiblemente a través de reordenamientos groseros del DNA, estimulantes de la actividad proliferativa).

Los carcinógenos de tipo clásico tienden a comportarse como iniciadores o bien como carcinógenos completos, lo que comporta una actividad mutagénica que no se da en los agentes promotores (Weinstein y cols., 1984).

6.- Sistemas básicos de reparación del DNA.

Ante la posibilidad de que aparezcan alteraciones potencialmente carcinogénicas en el DNA y la necesidad de preservar la conservación y fidelidad del código genético, parece lógico que las células posean una batería de procesos enzimáticos coordinados que reparen o hagan tolerables los daños sufridos por el genoma (Paterson y Gentner, 1984).

Hasta ahora, se han caracterizado de manera razonable tres sistemas básicos: reparación directa por inversión, reparación por excisión y reparación postreplicación. En realidad, sólo los dos primeros son procesos reparadores; el tercero es esencialmente un sistema que permite a la célula tolerar el daño recibido en el DNA.

6.1.- Reparación directa por inversión.

En este proceso, se produce una vuelta a la normalidad *in situ*, sin ninguna modificación adicional en el DNA. Existen dos tipos de reparación directa designados como reparación fotoenzimática el uno y por alquiltransferencia el otro. Cada uno de ellos opera exclusivamente en una clase específica de lesiones (Vid. Fig. 9).

La reparación fotoenzimática es catalizada por una enzima particular llamada fotoliasa, que actúa sobre los dímeros ciclobutíricos de las pirimidinas alteradas, después de unirse a un sitio apropiado dentro del mismo dímero. La absorción subsecuente de fotones entre 300 y 600nm por el cromóforo, suministra la energía necesaria para la rotura del anillo ciclobutano, regenerándose con ello las dos pirimidinas constitutivas primitivas.

En el proceso de alquiltransferencia se eliminan grupos metilo o etilo de O⁶-alquilguanina (una lesión promutagénica y precarcinogénica) en una reacción suicida, hecho poco usual en la biología de los organismos superiores. La restauración procede por transferencia directa del grupo al

FIGURA 8: Tipos de lesiones inducidas en el DNA de células humanas por diferentes carcinógenos.

FIGURA 9: Diagrama esquemático de los dos tipos de reparación directa por inversión detectados en células humanas.

FIGURA 8

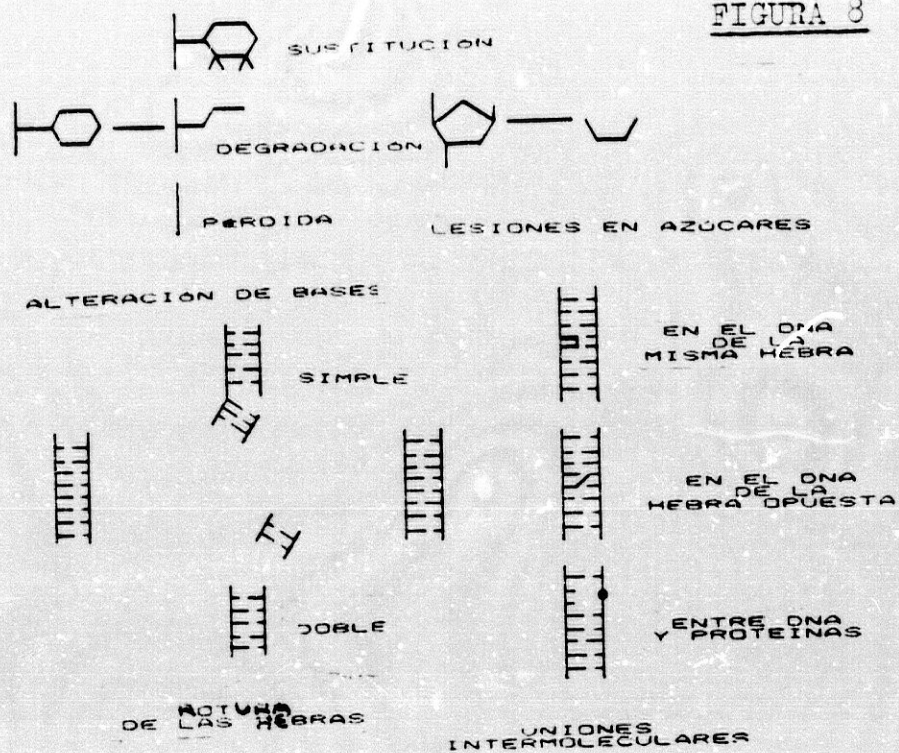
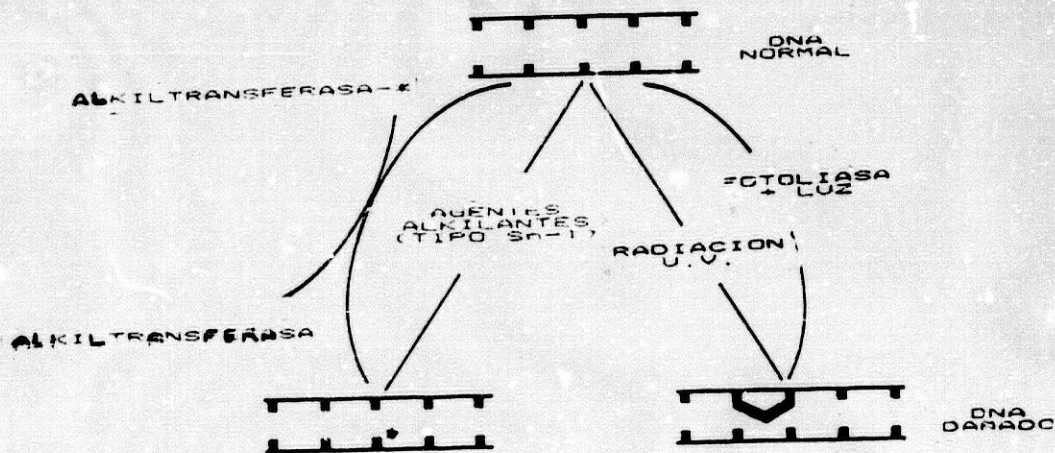


FIGURA 9



cuilo responsable de la lesión a un residuo cisteína de una proteína aceptora, la DNA-alkiltransferasa, formándose el compuesto S-alkilcisteína. El tratamiento previo de las células con concentraciones subletales de un agente alquilante tal como N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, provoca un estímulo en la síntesis de DNA-alkiltransferasa (Waldstein 1982).

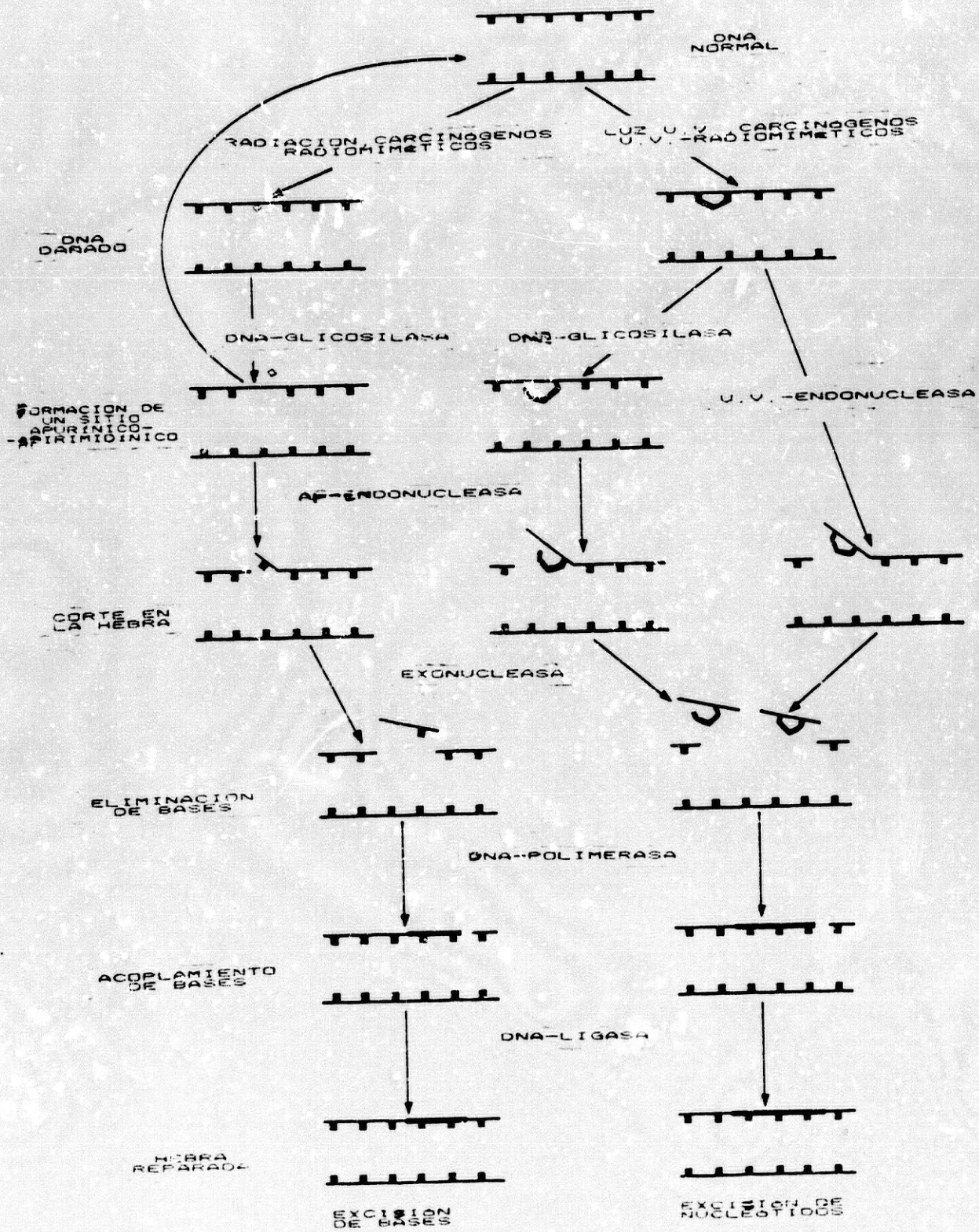
6.2.- Reparación por excisión.

Este sistema, de gran versatilidad, corrige alteraciones que afectan a una sola hebra del DNA (p. ej. formación de dímeros de pirimidina), actuando en el mismo sitio de la lesión. Los segmentos portadores de tales lesiones vuelven a un estado de apareamiento normal de bases, mediante un proceso de excisión del material defectuoso, seguido por una inserción de secuencias nucleotídicas normales, utilizando como sistema de referencia la hebra complementaria de DNA intacta.

Hay dos modelos operativos dentro de este sistema. En el primero de ellos, denominado "excisión de nucleótidos", el lugar dañado es liberado de la hebra como parte de un oligonucleótido (Vid. Fig 10). El esquema clásico de este modelo procede a través de las siguientes reacciones secuenciales: 1) corte de la hebra cerca de la lesión por una endonucleasa que reconoce las bases alteradas; 2) una exonucleasa produce un segundo corte en la hebra, dando lugar a la excisión de la lesión junto con algunos nucleótidos adyacentes; 3) la solución de continuidad o vacío de bases re -

FIGURA 10: Mecanismos propuestos para los dos modos de reparación por excisión: excisión de bases y excisión de nucleótidos.

FIGURA 10



sultante es cubierta con una secuencia de nucleótidos corregida, que ha sido procesada por una DNA-polimerasa; 4) finalmente, la secuencia sintetizada de novo es "soldada" a los puntos de corte de la hebra por una DNA-ligasa.

En el segundo modelo de reparación por excisión, llamado "excisión de bases", una glicosilasa específica de DNA elimina la base o bases dañadas sin interrumpir la continuidad de la hebra. La hidrólisis de la unión N-glicosídica da lugar a residuos de desoxirribosa sin sus bases correspondientes, por lo que a esos sitios se les denomina apurínicos/apirimidínicos (A/P). A partir de este momento el proceso continúa de la misma forma que en el modelo anterior (Sancar y Rupp, 1983).

Se desconocen las razones básicas por las que una célula opera con uno u otro modelo en distintas situaciones pero, en general, la reparación por excisión de bases resuelve lesiones pequeñas que producen una disrupción mínima en el apareamiento y disposición de las bases, con una solución de continuidad de muy pocos nucleótidos y que acontece en un período de aproximadamente 60 minutos desde la exposición al carcinógeno. En cambio, la reparación por excisión de nucleótidos actúa sobre lesiones más amplias, que causan mayor distorsión en la hélice del DNA. La secuencia a corregir supone 30 nucleótidos o más y requiere alrededor de 24 horas para completar el proceso.

Algunas veces, ciertos tipos de lesiones son reparadas a través de mecanismos que suponen una modificación -

de los dos modelos antes descritos. Así, por ejemplo, la ex ci si ó n de bases puede acontecer por medio de una secu en ci a re pa ra do ra en la cual se añade directamente una purina a un sitio apurínico, a través de una enzima "insertasa", si na ne ce s i d a de esc i n d i r post er i or me n te la he bra al ter a d a d a - (Deutsch y Linn, 1979).

6.3.- Reparación postreplicación.

Es un proceso muy mal conocido que, como en el ca so an te ri or, puede tener lugar de dos modos diferentes. En u no d e e l l o s, cuando se replica el material genético, los si ste m as en zi m á t i co s al encontrar un punto de lesión lo - "saltan" y reinician el proceso más allá de la lesión, d e - je n d o u n v a c i o e n l a he bra q ue post er i or me n te se r á ta p a d o - co n u n a s i n t e s i s i s i s i s e de no v o de u n a m a n e r a pa r e c i d a a co m o o c u r r e e n l a re p a r a r a c i ó n.

En el otro, la replicación termina cuando la ma - qui n a r i a re p l i c a t i v a e n c u e n t r a u n o s i t i o d e l e s i ó n y re i n i - ci a l a s i n t e s i s i s i s e u n a ve z q ue h a t e n i d o l u g a r l a m i t o s i s i s e com - plet an d o l a he bra co n fo r m e a l a secu en ci a de su hom ó l o g o e n l a mis ma h é l i c e (Cleaver, 1980).

7.- Oncogenes.

7.1.- Introducción.

Muchos virus (especialmente retrovirus) oncogénicos, contienen secuencias genómicas que parecen ser respon-

sables de la inducción de neoplasias. Estos genes son llamados oncogenes virales (v-onc) (Erickson y cols., 1980).

Actualmente se conocen unos 20 retrovirus altamente oncogénicos aislados de diferentes especies, y consecuentemente se han detectado los oncogenes asociados a cada uno de ellos (Ruggiero y cols., 1984). Como ejemplo cabe citar el gen "SRC" del virus sarcoma de Rous; el "abl" del virus de la leucemia murina de Abelson; el "erb" del virus de la eritroblastosis aviar; el "mos" y el "ras" de los virus del sarcoma murino de Moloney y de Harvey respectivamente, etc. (Bishop, 1982; Cooper, 1982).

Una gran parte de los oncogenes de los retrovirus conocidos (v-onc) tienen un homólogo equivalente presente en células normales (c-onc). Los c-onc parecen haberse conservado a través de la evolución de los vertebrados y la evidencia disponible sugiere que son el origen ancestral de los v-onc; es decir, que los retrovirus altamente oncogénicos probablemente adquirieron, en un tiempo pasado, sus genes transformantes a partir de los homólogos celulares, en un proceso de recombinación aún no comprendido del todo (Josephs y cols., 1983).

Algunos c-onc se transcriben y traducen en células normales, pero la magnitud de su expresión es muy inferior a la observada en las células transformadas por los virus oncogénicos portadores de v-onc. Así, en 14 pacientes en los que fue posible estudiar el tejido normal y maligno del mismo órgano, se observó que la actividad transcripcio-

nal de oncogenes era mayor en el tejido maligno que en el normal (Slamon y cols., 1984). Por lo tanto, la transformación por virus se ha considerado como la consecuencia de una expresión aumentada de genes que, de no estar asociados con secuencias regulatorias virales, que incrementan su expresión, serían normales para la célula (Ruggiero y cols., 1984).

Como posibilidad alternativa se ha sugerido que entre los v-onc y los c-onc existen diferencias muy sutiles pero decisivas. En tal caso es posible postular que las proteínas codificadas por los distintos v-onc tengan especificidades enzimáticas diferentes de las codificadas por los c-onc homólogos y que estas características expliquen el fenotipo transformado. De cualquier modo, el hallazgo de los c-onc ha revelado la existencia, en células normales, de un grupo de genes con potencial transformante (Ruggiero y cols. 1984).

La presencia de c-onc en células normales parece indicar que deben tener una función fisiológica en el proceso de la célula normal. De hecho, genes claramente oncogénicos (c-onc) parecen jugar un importante papel durante el desarrollo embrionario de un ratón (Muller y cols., 1982).

La tasa de crecimiento exhibida por tejidos proliferantes embrionarios y algunos malignos son similares. Así genes claramente oncogénicos (c-onc) pueden participar en la proliferación o diferenciación de tejido embrionario normal y adulto, y ser programados para llegar a ser quiescen-

tes en células diferenciadas (Gallo y Wong-Staal, 1982).

Las causas que activan a un c-onc no se conocen claramente. No obstante, se ha propuesto varios modelos. Uno de ellos sería el que los agentes cancerígenos (agentes físicos, químicos, etc.) podrían provocar mutaciones de las secuencias que regulan la expresión de oncogenes en las células normales, o alternativamente podrían mediar su acción directamente a través de mutaciones de los oncogenes (Ruggiero y cols., 1984).

Está cobrando importancia la idea de la existencia de unos posibles genes reguladores, que controlarían la expresión de los oncogenes (Bishop, 1982); de esta manera se podrían explicar los diversos mecanismos de la activación de los oncogenes que determinan la transformación neoplásica.

Existen determinados virus oncogénicos que no poseen oncogen (p. ej. el virus de la leucemia aviar), pero que cuando se inoculan en ave dan lugar a un linfoma. Este linfoma expresa con gran intensidad el oncogen c Myc. Se ha demostrado que el virus se integra en el genoma celular en un lugar próximo a la localización del c Myc (Hayward y cols 1981). Es probable que este virus se integre en un lugar ocupado o relacionado con la actividad y suprimiendo el gen c Myc, cuyos productos sintetizados en gran cantidad provocarían la transformación celular.

Otro ejemplo de bloqueo del posible gen regulador

ocurriría en las translocaciones cromosómicas, evidenciadas en numerosas células tumorales. Se ha observado que los cromosomas translocados contienen determinados oncogenes (Taub y cols., 1982), los cuales podrían haberse librado de la actuación represora de los genes reguladores. En el caso de los tumores inducidos por virus portadores de oncogenes (Erickson y cols., 1980), podría explicarse suponiendo que el virus, al insertarse en el genoma, lo hace en un lugar libre, no próximo a genes reguladores, por lo que el oncogen viral podría expresarse.

Los carcinógenos químicos, radiaciones e incluso determinados virus, pueden provocar mutaciones que podrían afectar al gen regulador o bien directamente al propio oncogen celular (Reddy y cols., 1982). Tanto en un caso como en otro, el oncogen celular podría activarse y determinar la formación de neoplasia.

Vemos, por tanto, que la existencia de un hipotético gen regulador unificaría los distintos mecanismos conocidos de la oncogénesis.

En la Tabla III se clasifican los oncogenes humanos conocidos (asignados a su respectivo cromosoma) en cinco grupos, con base en su función conocida o supuesta.

7.2.- Productos de la transcripción oncogénica.

Los productos de la transcripción oncogénica caracterizados hasta ahora, son péptidos relativamente peque-

TABLA III: Oncogenes detectados en el cariotipo humano

FUNCION DEL PRODUCTO PROTEICO	ONCOGEN	FUENTE INICIAL	LOCALIZACION DEL CARIOTIPO HUMANO
Protein-kinasa	src	Sarcoma de Rous (pollo)	1p34+pter y 20q12+q13
	abl	Leucemia de Abelson (ratón)	9q34
	fes	Sarcoma felino (gato)	15q25+q26
	yes	Sarcoma de Yamaguchi (pollo)	18
Proteina fijadora de GTP	H-ras-1	Sarcoma de Harvey (rata)	11p15.1+q26
	H-ras-2	Sarcoma de Harvey (rata)	X
	K-ras-1	Sarcoma de Kirsten (rata)	6p23+q12
	K-ras-2	Sarcoma de Kirsten (rata)	12p12+pter
	N-ras	Neuroblastoma (humano)	1p22+p31
Proteina fijadora de ADN	myc	Mielocitomatosis (pollo)	8q24
	v-myc	Neuroblastoma (humano)	2p23+p24
	myb	Mieloblastosis (pollo)	6q15+q24
	ets	Eritoblastosis (pollo)	11q23+q24
	ski	Sarcoma (pollo)	1q12+qter
	fos	FBJ Osteosarcoma (ratón)	16
Factor de crecimiento	sis	Sarcoma simio (mono)	22q12.3+q13.1
Receptores para factores del crecimiento	erb-B	Eritoblastosis (pollo)	7p1+p21
	fms	Sarcoma felino de McDonough (gato)	5q3
	neu	Neuroblastoma o glioblastoma (rata)	17
	mos	Sarcoma de Maloney (ratón)	8q22
Indeterminado	erb-A	Eritoblastoma (pollo)	17p1+q21
	rel	Reticuloendoteliosis (pavo)	2p11+q14
	Blym	Linfoma (humano)	1p32
	met	Osteosarcoma (humano)	7p11.4+qter
	raf-1	Sarcoma murino (ratón)	3p25
	raf-2	Sarcoma murino (ratón)	4
	PKS-1	raf-Relacionado con secuencias	Xpter+Xq22
	PKS-2	de protein-kinasa	7pter+7q2

p = brazo corto de un cromosoma; q = brazo largo de un cromosoma; ter = porción terminal de un cromosoma.

ños. Su función, al menos es la parte que conocemos, es la de participar en la regulación de la mitosis.

7.2.1.- Proteinkinases.

El producto oncogénico src del sarcoma de Rous - fue uno de los que se estudiaron primero (Collet y Erikson, 1978). Este péptido, compuesto de unos 250 aminoácidos, funciona como una proteinkinasa; esta clase de enzimas fosforila proteínas. La proteinkinasa src actúa en la superficie interna de la membrana plasmática, donde fosforila selectivamente residuos de tirosina. En las células transformadas por transfección de v-src, la concentración de tirosina fosforilada está considerablemente incrementada. Los oncogenes abl (leucemia de Abelson), fes (sarcoma felino) y posiblemente algunos otros, también producen protequinasas específicas de tirosina (Vid. Tabla III).

El grado anormal de productos fosforilados por un oncogen hiperactivo, probablemente altere el proceso normal de transducción de una señal exógena a través de la membrana hasta el interior de las células, ocasionando de esa forma una transformación maligna o premaligna. Tal transformación celular por una fosforilación excesiva de la tirosina rompe las uniones de la actina citoesquelética a la vinculina, un componente de las placas de adhesión en la superficie interna de la membrana plasmática. Esta disrupción puede ser la responsable de los cambios morfológicos característicos de las células transformadas. Ahora bien, se desconoce por el momento la relación precisa entre este proceso

y la función de las proteinkinasas en la mitosis normal y tumoral.

7.2.3.- Proteínas que se fijan al guanositri-fosfato (GTP binding).

Los productos proteicos del grupo de oncogenes ras son también pequeños péptidos, con pesos moleculares de aproximadamente 21.000 daltons. Funcionan como proteínas G (Scolnick y cols., 1979). Este grupo de proteínas ya habían sido caracterizadas antes de que los oncogenes fueran descubiertos. Actúan en el lado interno de la membrana celular, donde se unen al guanositri-fosfato con actividad de guanositri-fosfatasa. Constán de tres subunidades α , β y γ , de las cuales la cadena α es la que se une a la guanina. Estas proteínas G participan en la transducción de señales exógenas producidas a nivel de los receptores de superficie, en efectos citoplasmáticos. Una de las proteínas G mejor caracterizadas es la transducina, la cual transforma señales luminosas en la retina. La secuencia aminoacídica de las proteínas ras tiene una considerable homología con la secuencia de la subunidad α de la transducina, especialmente con sus regiones funcionales (Tanabe y cols., 1985). Así pues, las proteínas ras pudieran ser también transductores.

Cuando se producen en exceso pueden lesionar la función reguladora del guanositri-fosfato en la transducción de señales exógenas a través de la membrana (p. ej. inductores hormonales de la acción genética). Presumiblemente esta disrregulación de la actividad guanositri-fosfato pro-

ducirá una alteración en la regulación de la división celular en respuesta a señales exógenas.

7.2.3.- Proteínas que se fijan al DNA (DNA-binding).

A diferencia de los dos grupos anteriores, el producto proteico del oncogen *myc* (mielocitomatosis) no actúa en la membrana plasmática, sino en el núcleo, donde se une a una o más regiones del genoma, bien directamente al DNA o a proteínas nucleares asociadas al DNA (Donner y cols., 1982). Seguramente, las regiones del genoma a las que se une la proteína *myc* funcionan como reguladoras de la mitosis (Fig. 11). Cuando la proteína *myc* se fija a las secuencias o proteínas nucleares reguladoras, la actividad de éstas es reprimida y la mitosis consecuentemente disrregulada. Cuando tal disrregulación es excesiva, puede sobrevenir la transformación maligna.

Se sabe que las proteínas *myb* (mieloblastosis), *c-myc* (eritroblastosis) y algunas otras, actúan también en el núcleo, uniéndose probablemente al DNA; pero sus actividades en el genoma están menos estudiadas que en el caso de la proteína *myc*.

7.2.4.- Factores del crecimiento.

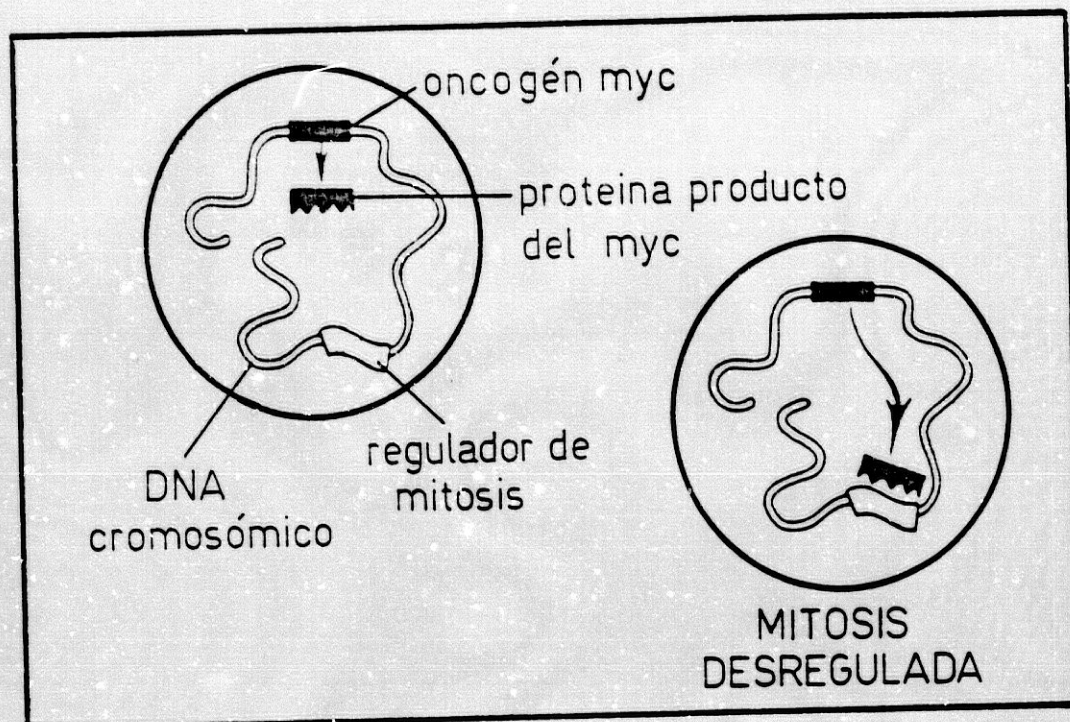
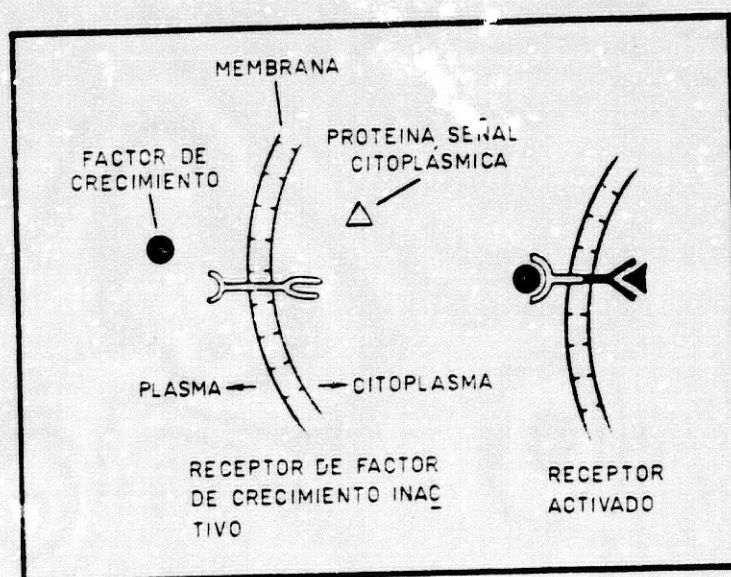
Cuando el oncogen *v-sis* (sarcoma símico) fue secuenciado, toda una actividad transformadora estaba contenida en una secuencia que codificaba un péptido de 226 aminoácidos (aa). Esta secuencia de aa era muy similar a la de un

factor de crecimiento celular ya bien conocido: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Waterfield y cols., 1983; Doolittle y cols., 1983). Este factor es el principal estímulo polipeptídico de la mitosis en células de origen mesenquimatoso. El factor plaquetario de crecimiento se almacena en las plaquetas y es liberado de ellas localmente cuando los vasos sanguíneos resultan dañados. Allí estimula la proliferación de los fibroblastos, jugando un papel esencial en el proceso de reparación tisular. Este factor fosforila proteínas intracelulares e igualmente posee una actividad especial de proteinkinasa específica de tirosina.

En la membrana plasmática existen receptores específicos para factores de crecimiento (Fig. 12). El factor de crecimiento en cuestión se uniría con el componente extracelular del receptor, activando al componente intracelular del mismo para que pueda fijarse a él una proteína intermediaria citoplasmática, la cual quedaría, a su vez, activada, de forma que en una etapa posterior dicha proteína podría llegar hasta el núcleo induciendo la transcripción de una región diana en el genoma. En la Fig. 13 se muestra un mecanismo especulativo para explicar el efecto mitogénico de un factor exógeno del crecimiento tal como PDGF. El factor de crecimiento activaría al componente intracelular de su receptor, y consecuentemente la proteína intermediaria citoplasmática, la cual migraría hasta el núcleo induciendo la producción de una proteína DNA-binding mediante la activación de un gen semejante a *myc*. Esta proteína, al reprimir uno o más genes de los que regulan la mitosis, in-

FIGURA 11: Diagrama del posible mecanismo por el cual el producto proteico del oncogén myc podría disregular el "regulador de la mitosis" nuclear, uniéndose a él.

FIGURA 12: Diagrama de un segmento de la membrana plasmática mostrando como un factor de crecimiento exógeno, uniéndose al componente extracelular del receptor, activa el componente intracelular de dicho receptor, el cual, a su vez, se une a una proteína citoplasmática activándola.

FIGURA 11FIGURA 12

duciría un inicio discreto de la división celular. En circunstancias anormales, una hiperproducción de factores del crecimiento por disregulación de sus respectivos oncogenes empujaría rápidamente a la célula hacia una fase mitótica desordenada.

7.2.5.- Receptores para factores del crecimiento.

Si el descubrimiento de que el producto del oncogen *src* era muy similar al PDGF constituyó una sorpresa, más aún lo fue la subsecuente demostración de que el producto proteico del oncogen *erb-B* (eritroblastosis) presentaba una homología muy estrecha con el componente intracelular activado del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Downward y cols., 1984) (Vid. Fig. 14).

Quizá *erb-B* lleve a cabo su acción produciendo componentes intracelulares activados de los receptores. Estos componentes, de forma parecida a como ya hemos mencionado, activarían proteínas intermediarias citoplasmáticas, las cuales, a su vez, activarían genes parecidos a *myc*, los cuales se transcribirían en proteínas DNA-binding que suprimirían finalmente las secuencias genéticas reguladoras de la mitosis (Fig. 15).

7.3.- Mecanismos de la disregulación de los oncogenes.

En un estado natural, los oncogenes son relativamente cuiescentes, controlando las mitosis de una manera ordenada. El ordenamiento y jerarquización de los procesos mi

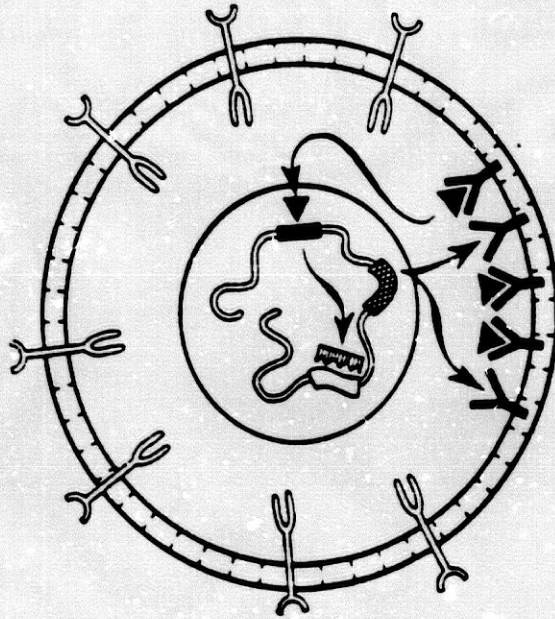


FIGURA 15: Diagrama de un posible mecanismo por el que erb-B podría afectar la actividad del oncogén myc. El producto proteico de erb-B actuaría como un componente intracelular activado de un receptor para factores de crecimiento.

tóxicos se pierden cuando el oncogen se altera, lo cual puede ocurrir a través de diversos mecanismos.

7.3.1.- Mutación puntual en un exón codificador.

Un oncogén puede alterarse por cambio en un simple nucleótido (mutación puntual), de la misma forma que ocurre en muchos otros tipos de genes. Este caso se demostró por primera vez en el oncogén c-H-ras (Capon y cols., 1983).

En las células vesicales normales, el fragmento de DNA que contiene el c-H-ras consta de 6.460 nucleótidos e incluye cuatro exones (secuencias codificadoras) con un total de 566 nucleótidos que codifican 189 aminoácidos del producto proteico de tal oncogen (Fig. 16). Un fragmento homólogo de DNA aislado de células de un carcinoma humano vesical, difiere del correspondiente a las células normales solamente en un nucleótido codificador: en el codón 12 del primer exón, el nucleótido 1.704 del fragmento normal es guanina, siendo la secuencia del codón guanina-guanina-citosina, de forma que el aa número 12 del producto proteico resulta ser glicina. En el c-H-ras del carcinoma, el nucleótido 1.704 es la timina y la secuencia del codón correspondiente guanina-timina-citosina, originando un cambio en el aa codificador de glicina a valina. Este simple cambio es capaz de convertir un péptido no transformante en otro que lo es activamente.

En experimentos subsecuentes, se indujo la síntesis

sis de péptidos con las 19 sustituciones posibles de aa en el nucleótido 1.704 del codón 12 (Seeburg y cols., 1984). - Cuando la glicina fue sustituida por prolina, la actividad transformante del péptido no se incrementó; pero sí lo hizo con cada una de las restantes 18 sustituciones posibles.

Mutaciones puntuales en los otros codones del c-H-ras (péptido "blando" o susceptible) pueden convertirlo igualmente en un péptido transformante. El codón 61, como el 12, parece ser especialmente susceptible a tales cambios.

Son varios los carcinógenos que pueden producir mutaciones puntuales en los péptidos ras. Por ejemplo, la nitrosometilurea, cuando se administra en ratas da lugar a un cáncer de mama en cuyas células se encuentra activado el oncogen H-ras-1. Este carcinógeno ocasiona mutaciones puntuales, en las cuales la guanina es reemplazada por adenina (Zarbl y cols., 1985).

7.3.2.- Translocación de oncogenes.

En condiciones normales, el oncogen c-myc está situado en el brazo largo del cromosoma 8, en una posición 8q24.1. En este locus, el oncogen c-myc está reprimido y su producto proteico es prácticamente indetectable.

En las células del linfoma de Burkitt existe una translocación recíproca entre las regiones distales de los brazos largos cromosómicos 8 y 14 (Fig. 17), de manera que la parte distal del brazo largo del cromosoma 8 se desplaza

FIGURA 13: Diagrama de un posible mecanismo por el cual un factor de crecimiento extracelular activaría el componente interno del receptor para factores de crecimiento, el cual, a su vez, activará una proteína citoplasmática la cual inducirá al oncogén myc a transcribir su producto proteico que se unirá al "regulador de la mitosis" nuclear.

FIGURA 14: El producto proteico del oncogén erb-B es estructuralmente muy similar al componente intracelular activado del receptor para factores de crecimiento en la membrana plasmática.

FIGURA 17: Diagrama de la traslocación cromosómica característica del linfoma de Burkitt. La parte distal del brazo largo del cromosoma 8, que lleva un oncogén c-myc, sufre una traslocación recíproca a la porción distal del brazo largo del cromosoma 14. Tal traslocación sitúa al oncogén myc cerca de la región que contiene el complejo genético responsable de la promoción y transcripción de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El oncogén myc queda de esa forma dentro del radio de acción del promotor Igh por lo que resultará activado.

FIGURA 13

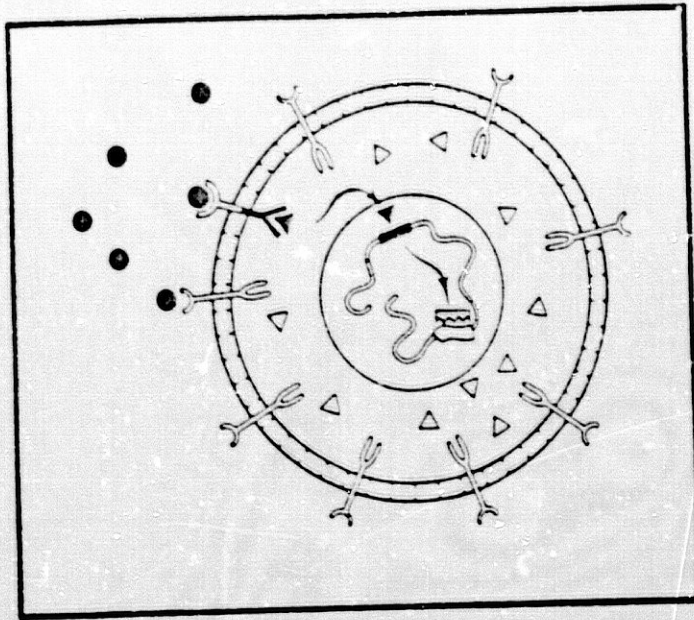


FIGURA 14

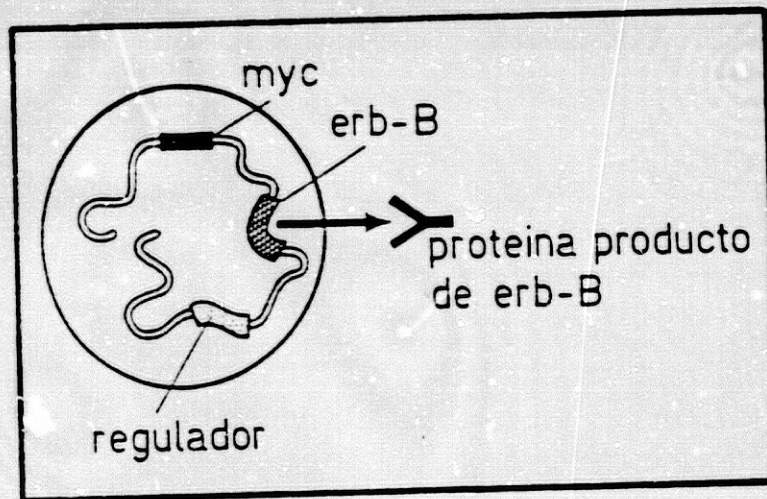
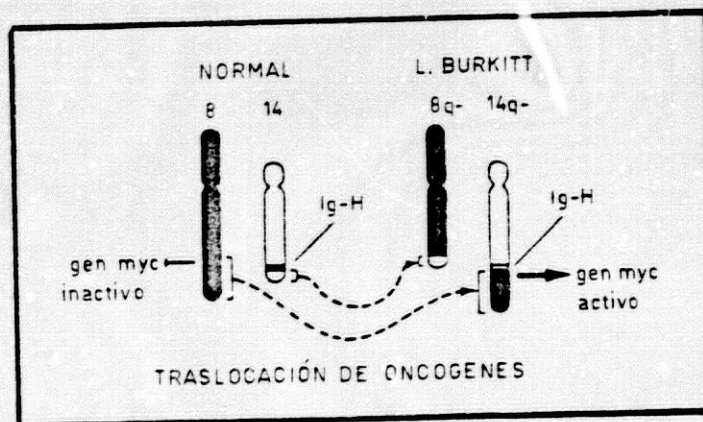


FIGURA 17



hasta la región distal del brazo largo del cromosoma 14, si tuándose el oncogen c-myc en una posición 14q32, dentro de la región genética que codifica la cadena pesada de la inmunoglobulina de membrana (Ig H). La parte distal del brazo largo del cromosoma 14 cambia a una posición 8q24. Así pues el reordenamiento cromosómico en el linfoma de Burkitt se especifica así en forma abreviada: t(8;14) (q24;q32).

Cuando se escinde el DNA del linfoma de Burkitt con endonucleasas de restricción, se obtienen fragmentos que contienen las secuencias nucleotídicas de Ig H y de c-myc. En su nueva localización (14q32), el oncogen c-myc es activado, incrementándose apreciablemente la síntesis de su proteína DNA-binding. La unión al DNA, en cantidades excesivas, de una proteína que disrregula la mitosis, puede ser el mecanismo de transformación tumoral en este caso (Leder y cols., 1983).

En ciertas leucemias mielocíticas crónicas, la translocación de un oncogen puede ser también el fenómeno patogénico primario, puesto que en ellas existe una hiperactivación del oncogen c-abl. Las células de la leucemia mielocítica crónica son portadoras de una translocación recíproca (dando lugar a la aparición del cromosoma Filadelfia) entre el brazo largo del cromosoma 9 y su homólogo del cromosoma 22: t(9;22) (q34;q11) (Vid. Fig. 13). El fragmento translocado del extremo distal del cromosoma 9 incluye el oncogen c-abl, que en una nueva posición en el extremo distal del cromosoma 22, presumiblemente es activado por un gen o complejo genético promotor (De Klein y cols., 1982).

Los locus genéticos de otros oncogenes celulares, estén muy cerca o dentro de los puntos de fractura cromosómica asociados específicamente con ciertas neoplasias: c-mos se localiza en 8c22, el punto de fractura en la translocación 8;21 característica de algunos tipos de leucemia aguda no linfocítica; c-myb se encuentra en 6c15 o24, la región de fractura es la delección 6c, característica de la leucemia linfoblástica aguda.

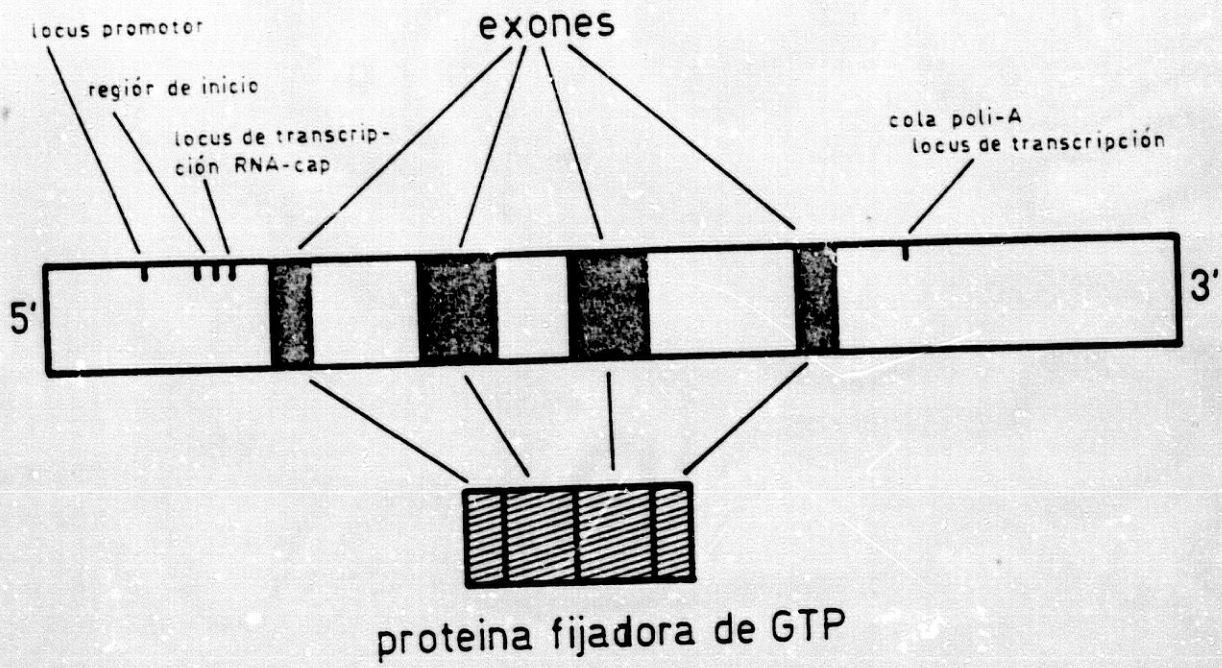
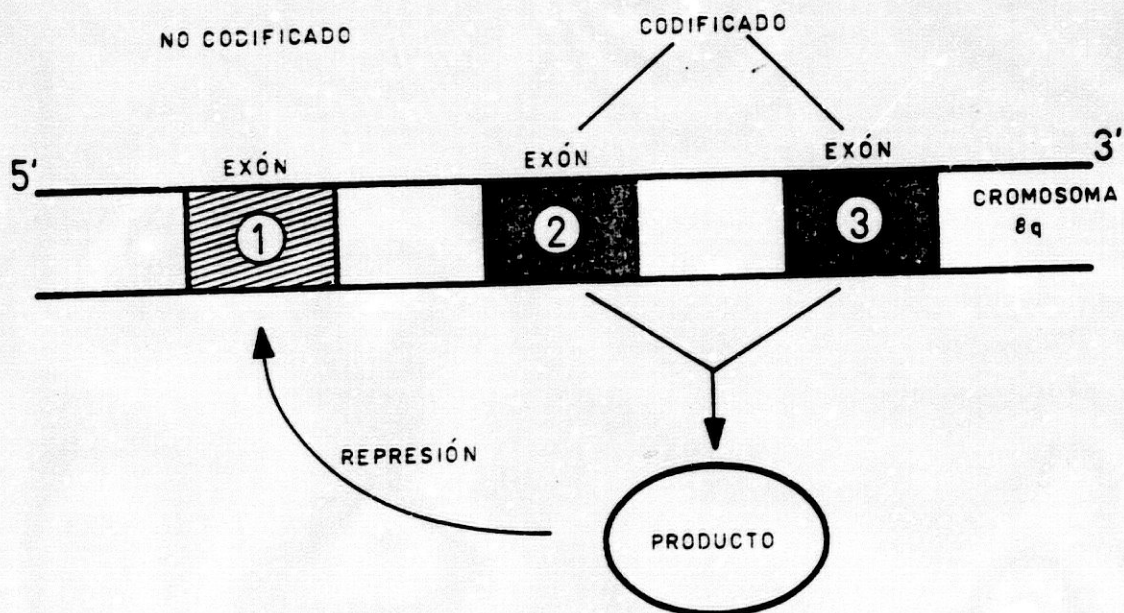
Basándonos en estas y otras varias translocaciones distintas es posible especular de forma razonable que uno de los mecanismos oncogénicos tendría su base en reordenamientos del genoma que suponen un desplazamiento de oncogenes normalmente silentes a regiones donde son activados.

7.3.3.- Pérdida de secuencias reguladoras.

La región oncogénica c-myc contiene tres exones, de los cuales sólo los dos teloméricos (exones 2 y 3) codifican el producto proteico DNA-binding de este oncogen (Fig 19). El exón no codificador 5', actúa de manera semejante a un "gen operador", regulando aparentemente la actividad transcritora de los exones 2 y 3. Probablemente, cuando se acumula una cantidad suficiente de producto proteico, éste se une al exón 1 frenando la actividad inductora de este exón sobre los otros dos. A veces, cuando se transloca c-myc, pierde el exón 1, con lo cual los exones 2 y 3 quedarán disrregulados con hiperproducción de proteína DNA-binding (Robertson, 1984).

FIGURA 16: Diagrama de los componentes del gen H-ras-1, mostrando los cuatro exones que llevan las secuencias codificadoras de la proteína G que se une a GTP.

FIGURA 19: Diagrama del oncogén myc en el brazo corto del cromosoma 8 (8q), mostrando el exón no codificador 1 y los exones codificadores 2 y 3.

FIGURA 16**FIGURA 19**

7.3.4.- Amplificación oncogénica.

Las células neoplásicas contienen a menudo diminutos cromosomas supernumerarios, así como regiones particulares que se tiñen de manera homogénea. Tanto los cromosomas diminutos como las áreas de tinción uniforme son regiones genéticas de amplificación, es decir, genes duplicados repetitivamente. En una línea de neuroblastoma humano han sido demostradas áreas de amplificación para el oncogen c-myc, utilizando sondas de DNA complementario (Alitalo y cols., 1983). La secuenciación del DNA de estas regiones con tinción homogénea ha puesto de manifiesto que contienen múltiples copias parciales de las secuencias c-myc.

En los tejidos que contienen estas secuencias amplificadas, puede demostrarse la existencia de grandes cantidades del producto proteico correspondiente al oncogen c-myc (Schwab y cols., 1983). Actualmente, sin embargo, se desconoce el motivo o mecanismos que llevan a la amplificación oncogénica.

Lee y cols. en 1984 observaron amplificación del oncogen N-myc en diez retinoblastomas: en dos de ellos por conteo directo del número de oncogenes N-myc en muestras de biopsias frescas e indirectamente en los ocho restantes, al evidenciar una hiperproducción de RNA mensajero específico del oncogen N-myc. Tal amplificación no fue detectada en las células tisulares normales de estos pacientes. La amplificación del oncogen N-myc pudiera ser específica de ciertos tumores, tales como el neuroblastoma y el retinoblasto-

ma, ya que no fue observada en otras neoplasias de colon, -
mama, cuello, útero, pulmón o melanomas.

La citogenética ha proporcionado una posible ex -
plicación de la amplificación oncogénica en retinoblastomas
(Fig. 20). En una proporción de pacientes con retinoblasto -
mas, existe una pequeña delección en el brazo largo del cro -
mosoma 13 (13q14). El material genético existente normalmen -
te antes de la delección dirigiría la síntesis de una sus -
tancia represora del oncogen N-myc que se encuentra en el -
brazo corto del cromosoma 2. De esta forma, en estos tumo -
res el oncogen N-myc está desreprimido y amplificado, con -
hiperproducción de su producto DNA-binding (Hymie, 1985).

7.3.5.- Otros mecanismos.

El grado de metilación de los nucleótidos de un -
gen es un determinante de su actividad: el DNA submetilado -
transcribe más activamente que el DNA con una tasa normal -
de metilación. Así pues, es posible, aunque no está demos -
trado, que un oncogen pueda ser activado por agentes que -
produzcan demetilación en el DNA. De manera análoga, un on -
cogen activo podría ser reprimido por metilación de un DNA,
aunque tampoco hay evidencias de que ésto suceda así.

FIGURA 18: Traslocación recíproca entre partes de los brazos largos de un cromosoma 9 y uno 22 (el llamado cromosoma Philadelphia), característica de la leucemia mielocítica crónica. En esta traslocación, la región del brazo largo del cromosoma 9 (9q), que contiene el oncogén *abl*, se trasloca a la parte distal del cromosoma 22 (22q). En su nuevo sitio, el oncogén *abl* se disregula y produce en exceso su producto proteico: una proteínquinasa.

FIGURA 20: Diagrama de un posible mecanismo de activación del oncogén *N-myc* en células de retinoblastoma. En la situación normal (a la izquierda de la figura), el gen (o genes) *Rb* en el brazo largo del cromosoma 13, produce una sustancia que reprime al oncogén *N-myc* en el brazo corto del cromosoma 2. En el caso del retinoblastoma (a la derecha de la figura) tiene lugar una pequeña delección intersticial en el sitio del gen represor del brazo largo del cromosoma 13, con lo cual, *N-myc* en el brazo corto del cromosoma 2 se desreprime y su actividad se incrementa.

FIGURA 18

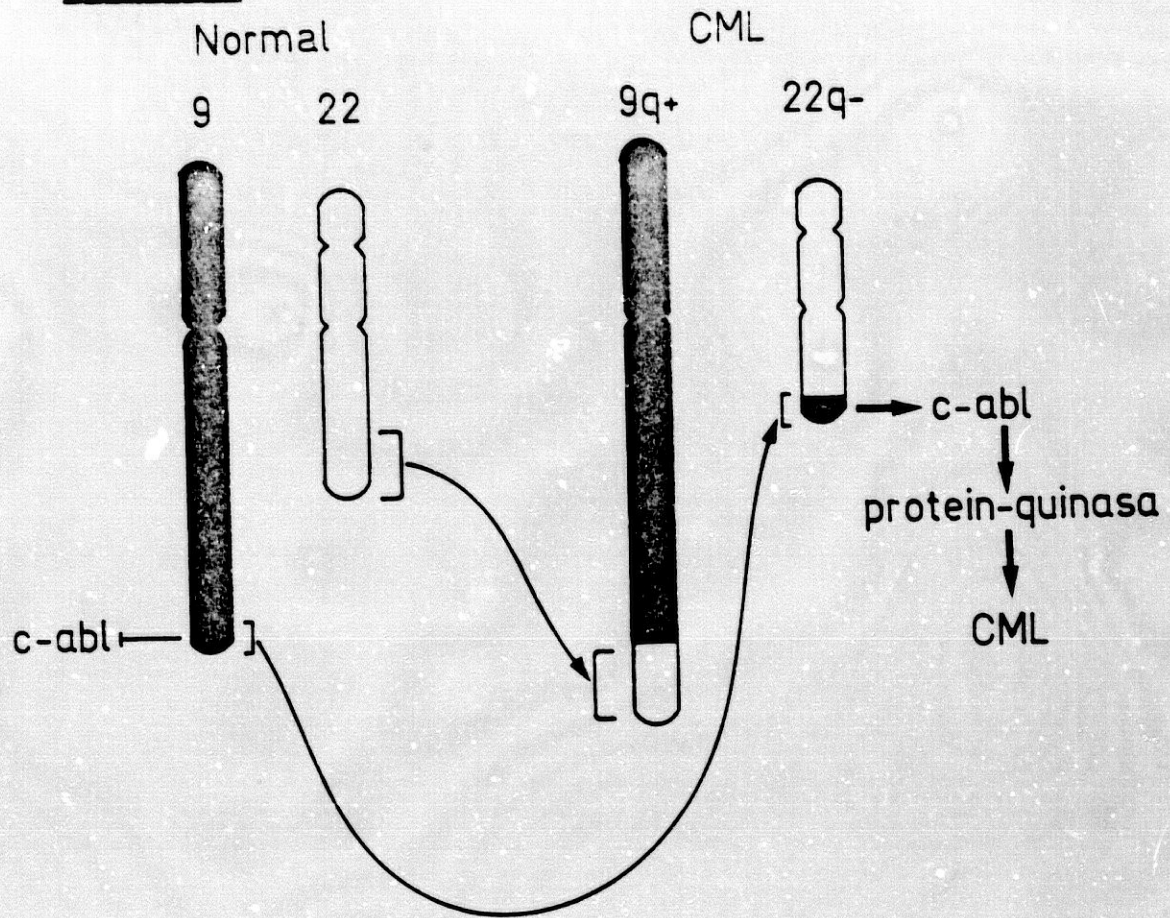
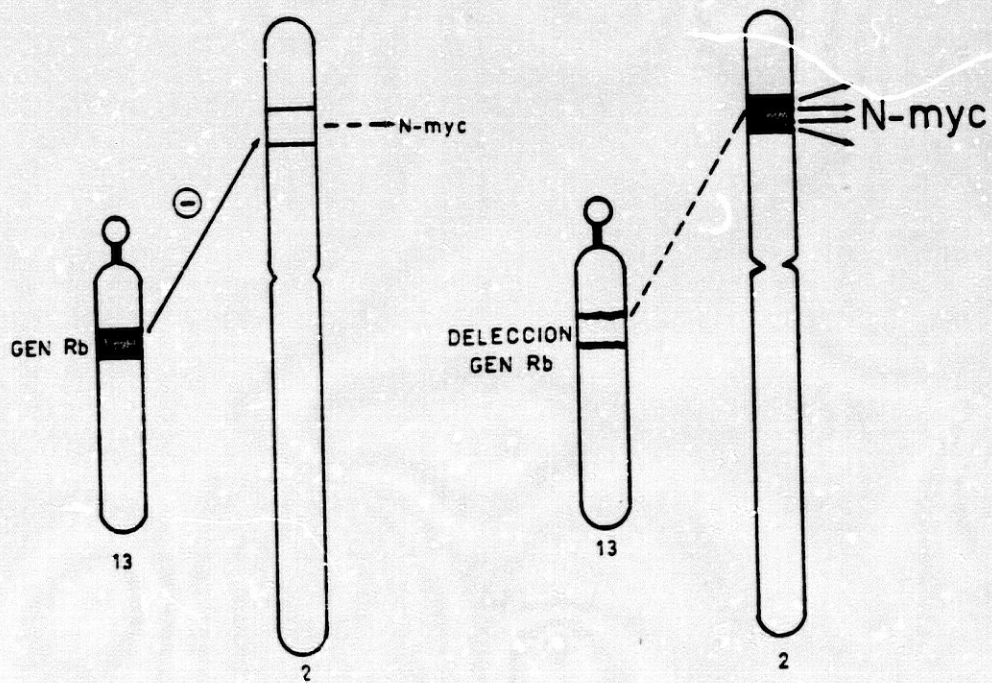


FIGURA 20



III.- EL PROCESO TUMORAL: CARCINOGENESIS

Parece ciertamente indudable que una o más alteraciones en el genoma celular representan fenómenos críticos para la transformación de una célula normal *in vivo* o *in vitro* a otra neoplásica. Sin embargo, quedan aún por explicar cierto número de observaciones que no se avienen con el modelo general, como por ejemplo los estudios de King y Di Bernardino (King y Di Bernardino, 1965), demostrando que el trasplante de núcleos celulares neoplásicos en huevos fertilizados no interfería el desarrollo normal ni ocasionaba alteraciones de tipo tumoral en los organismos resultantes. Otros autores (Papaioannou y cols., 1975; Mintz y Illmensee 1975) lograron la reversión y rediferenciación de teratocarcinomas malignos murinos, transplantándolos a tejidos embrionarios en los primeros estadios de desarrollo. Tampoco se encontró evidencia de alteraciones neoplásicas en los organismos adultos provenientes de tales embriones.

Finalmente, parece posible la inducción de neoplasias *in vivo* e *in vitro* en varios tipos de animales y sistemas microorgánicos por administración crónica de agentes que no tienen interacción física ni química con el material genético de las células vivas (De Serres, 1976). Puesto que no es posible asumir a priori que estos datos experimentales tengan poco o nada que ver con los mecanismos generales de transformación neoplásica o que tales hallazgos sean la resultante de mecanismos aún desconocidos comprometidos o no en el proceso tumoral, lo más razonable es tratar de explicar tales fenómenos a la luz de nuestros conocimientos -