

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR

Factores lipídicos inhibidores de
la proliferación celular en
líquido amniótico humano.
Estudio de la regulación de la
proliferación celular en el
sistema de fibroblastos NIH 3T3

TESIS DOCTORAL

RICARDO RUEDA CABRERA

GRANADA 1988

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 88 a 19 89

Folio 32 ^{de}

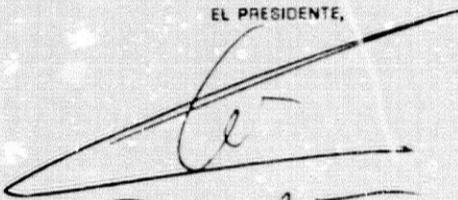
Número 65

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Ricardo
Reada Calero, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente
tema, que libremente había elegido: "Factores lipídicos relacionados de la proliferación
celular en líquido amniótico humano. Estudio de la regulación de la
proliferación celular en el sistema de fibroblastos NIH 3T3".

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este
le calificó de Apto "Cum laude"

Granada 11 de Octubre de 19 88

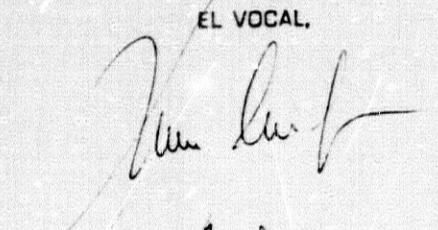
EL PRESIDENTE,


Fdo.: J. Calero

El Secretario del Tribunal.


Fdo.: R. Reada

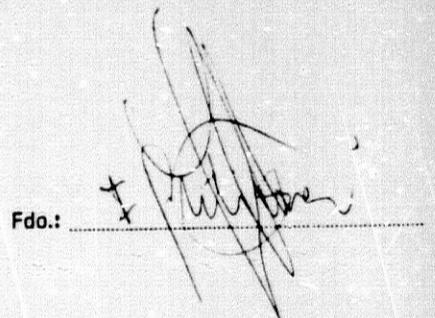
EL VOCAL.


Fdo.: Don Melchor Benito

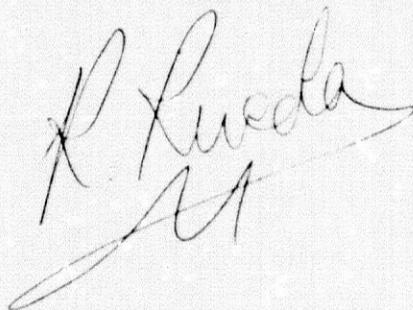
EL VOCAL.


Fdo.: S. A. G. Capella

EL VOCAL.


Fdo.: J. Calero

FIRMA DEL GRAGUANDO.

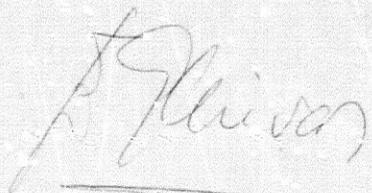


D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que D. RICARDO RUEDA CABRERA ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "FACTORES LIPIDICOS INHIBIDORES DE LA PROLIFERACION CELULAR EN LIQUIDO AMNIOTICO HUMANO. ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN EL SISTEMA DE FIBROBLASTOS NIH 3T3", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado para tal efecto.

Granada, 20 de Septiembre de 1988



Fdo. Enrique García Olivares

D. FRANCISCO GONZALEZ GOMEZ, Catedrático del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que D. RICARDO RUEDA CABRERA ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "FACTORES LIPIDICOS INHIBIDORES DE LA PROLIFERACION CELULAR EN LIQUIDO AMNIOTICO HUMANO. ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN EL SISTEMA DE FIBROBLASTOS NIH 3T3", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado para tal efecto.

Granada, 20 de Septiembre de 1988



Fdo. Francisco González Gómez

"Qué mejor alegría
que emprender en
equipo y con el
propósito de dar lo
mejor de sí, un
trabajo cuya única
meta es la vida y la
cultura ajena"

ALBERT EINSTEIN

A Ma TERESA, por todo

"Nada hace tanto bien
como entregarse a la
naturaleza, no
pasivamente, sino en
forma creadora"

HERMANN HESSE

A MIS PADRES Y HERMANOS

A G R A D E C I M I E N T O S



Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a cuantos han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral:

A D. Enrique García Olivares, por su gran ayuda, por su orientación y consejos, por su amistad y, especialmente, por su ejemplo de dedicación a la tarea investigadora.

A D. Francisco González Gómez, por su orientación y por el interés puesto en el presente trabajo.

A M^a Teresa García Ruiz, no sólo por su colaboración y gran ayuda, sino, especialmente, por estar siempre junto a mí y por su apoyo en los momentos más difíciles de la elaboración de esta Tesis.

A mis padres, por su apoyo moral y, especialmente, por su ejemplo de constancia y entrega en el trabajo.

A todas las mujeres embarazadas que aportaron las muestras de líquido amniótico, así como a todas aquellas personas que, voluntariamente, aportaron las muestras de sangre.

A la Sección de Inmunología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por toda la colaboración prestada y por el interés puesto en mi trabajo.

A la UCIF del Departamento de Obstetricia y Ginecología, especialmente, a José Trujillo Leyva, por la obtención de muestras de líquido amniótico.

Y, finalmente, a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido con su ayuda a la realización de esta Tesis.

A B R E V I A T U R A S

AD: Anclaje dependientes.
AFLE: Extracto lipídico de líquido amniótico.
AFP: Alfa-fetoproteína.
AG: Ácidos grasos.
BSC-1: Inhibidor aislado del medio condicionado de células de riñón de mono.
BCGF: Factor de crecimiento de células B.
CEA: Antígeno carcinoembrionario.
CIF-A: Factor inductor de cartilago, aislado de hueso bovino.
CL: Crecimiento limitado.
c-onc: oncogenes de células normales.
CPIF: Factores inhibidores de la proliferación celular.
C-SF: Factor estimulador de colonias.
CTP: Citidina trifosfato.
d: daltons.
E: Esfingomielina.
ECLE: Extracto lipídico de citosol de Ehrlich.
EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
EMLE: Extracto lipídico de membranas de Ehrlich.
FC: Fosfatidil-colina.
FcγR: Receptor Fcγ.
FDGF: Factor de crecimiento derivado de fibroblastos.
FE: Fosfatidil-etanolamina.
FGR-s: Regulador del crecimiento de fibroblastos, forma soluble.
FI: Fosfatidil-inositol.
FME: Fosfatidil-N-monometil-etanolamina.
FMT: Fosfolípido-metiltransferasa.
FSH: Hormona foliculo-estimulante.
GD: Digangliósido.
GIF: Factor inhibidor del crecimiento.
GM: Monogangliósido.
GroPIns4,5P₂: Glicerofosfoinositol-4,5-bisfosfato.
Gs: Gangliósidos.
GT: Trigangliósido.
HCG: Gonadotropina coriónica humana.
HPL: Lactógeno placentario humano.

HSLE: Extracto lipídico de suero humano.
IC: Inhibición por contacto.
IFN: Interferón.
Ig: Inmunoglobulina.
IGFs: Factores de crecimiento insulín-semejantes.
IL: Interleukina.
Ins1P: Inositol-1-monofosfato.
Ins1,2cic4,5P₃: Inositol-1,2-4cíclico,5-trifosfato.
Ins1,3,4P₃: Inositol-1,3,4-trifosfato.
Ins1,3,4,5P₄: Inositol-1,3,4,5-tetrafosfato.
Ins1,4P₂: Inositol-1,4-bifosfato.
Ins1,4,5P₃: Inositol-1,4,5-trifosfato.
Ins2,4,5P₃: Inositol-2,4,5-trifosfato.
Ins4,5P₂: Inositol-4,5-bifosfato.
Kd: Kilodaltons.
LAK: Linfocitos activadores de células K.
LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
LH: Hormona luteinizante.
LME: Estimulación de la emigración de leucocitos.
LMI: Inhibición de la emigración de leucocitos.
LT: Leucotrieno.
M: Moles.
MAF: Líquido amniótico de ratón.
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
MIF: Factor inhibidor de la emigración de macrófagos.
MIS: Sustancia inhibidora Mulleriana.
MLR: Reacción linfocitaria mixta.
NGF: Factor de crecimiento nervioso.
NIH 3T3 I: NIH 3T3 INICIADAS.
NIH 3T3 T: NIH 3T3 TRANSFORMADAS.
NK: Natural killer.
PA: Acido fosfatídico.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PFC: Células formadoras de placas.
PG: Prostaglandina.
PGFs: Factores de crecimiento polipeptídicos.

PHA: Fitoheماغلوتينينا.
Pm: Peso molecular.
PtdIns: Fosfatidil-inositol.
PtdIns4P: Fosfatidil-inositol-4-fosfato.
PtdIns4,5P₂: Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato.
PUFAs: Acidos grasos poliinsaturados.
SD: Desviación estándar.
SIF: Factor inhibidor soluble.
SL2CLE: Extracto lipidico de citosol de SL2.
SL2MLE: Extracto lipidico de membranas de SL2.
SP1: β_1 -glicoproteina especifica del embarazo.
T: Tumorigénicas.
TCGF: Factor de crecimiento de células T.
TGFs: Factores de crecimiento transformantes.
TIF: Factor inhibidor del crecimiento tumoral.
TLC: Cromatografía en capa fina.
TLFA: Anticuerpos fetales humanos anti-células T citotóxicas.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
TsF: Factor supresor de células T.
v-onc: oncogenes virales.
X: media.
2N: Euploides.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
I. LIQUIDO AMNIOTICO	2
1. Generalidades	3
2. Funciones del liquido amniótico	4
3. Bioquímica del liquido amniótico	5
3.1. Sodio, cloro, potasio, urea y creatinina	6
3.2. Otros constituyentes bioquímicos	9
3.2. 1. Acido úrico	9
3.2. 2. Equilibrio ácido-base	9
3.2. 3. Carbohidratos y ácidos orgánicos	9
3.2. 4. Calcio	10
3.2. 5. Magnesio y zinc	10
3.2. 6. Hierro y cobre	10
3.2. 7. Proteínas y aminoácidos	11
3.2. 8. Bilirrubina	13
3.2. 9. Vitaminas	14
3.2.10. Enzimas	14
3.3. Hormonas en el liquido amniótico	14
3.3.1. Estrógenos	14
3.3.2. Otros esteroides	15
3.3.3. Gonadotropina coriónica humana	15
3.3.4. Lactógeno placentario humano	16
3.3.5. Prolactina hipofisaria	16
3.3.6. Hormonas tiroideas y tirotrópica hipofisaria	17
3.3.7. Insulina	17
3.3.8. Factores liberadores hipotalámicos	17
3.3.9. Catecolaminas y renina	17
3.4. Prostaglandinas y otras sustancias oxitotóxicas ...	18
3.4.1. Prostaglandinas	18
3.4.2. Polipeptidos: oxitocina, vasopresina y bradiquinina	19
3.4.3. Histamina	20
3.4.4. Serotonina	20

3.5. Lípidos en el líquido amniótico	21
3.5.1. Estudios cuantitativos de lípidos en el líquido amniótico	21
3.5.2. Fosfolípidos mayores	25
3.5.3. Fosfolípidos menores	28
3.5.4. Ácidos grasos y otros lípidos	28
4. Inmunología fetal	29
4.1. Desarrollo de la inmunocompetencia fetal	30
4.2. Respuesta fetal frente a los antígenos maternos ...	33
5. Factores inmunológicos en el líquido amniótico	37
6. Factores de crecimiento en el líquido amniótico	42
II. CRECIMIENTO CELULAR	45
1. Generalidades	46
2. Crecimiento en tejidos normales	47
2.1. Actividad proliferativa de tejidos normales	47
2.2. Quiescencia y proliferación celular. "Stem cells" .	47
3. Crecimiento en tejidos tumorales	49
3.1. Células madre (stem cells) en el cáncer	49
3.2. Transformación neoplásica "in vivo"	49
3.3. Transformación neoplásica "in vitro"	50
4. El crecimiento en la célula	52
4.1. Fases del ciclo de crecimiento celular	52
4.2. Bioquímica del ciclo celular ..	55
4.3. Procesos bioquímicos intracelulares durante la estimulación del crecimiento	60
4.3.1. Recepción de la señal	60
4.3.2. Alteraciones de la membrana plasmática	60
4.3.3. Transferencia de la señal de la membrana al núcleo	62
4.3.4. Cambios en el núcleo	64
4.4. Papel esencial del metabolismo de los fosfoinosi- toles de membrana en el crecimiento celular	65
4.4.1. Metabolismo de los fosfoinositoles de membrana	65
4.4.2. Formación de segundos mensajeros	67

4.4.3. Ejemplos de utilización del metabolismo de los fosfolípidos de membrana para transmitir la señal de estimulación de la proliferación celular	70
5. La línea NIH 3T3 como modelo de crecimiento celular	75
6. Regulación del crecimiento celular	83
7. Factores estimuladores del crecimiento celular	85
7.1. Poliaminas	85
7.2. Prostaglandinas	87
7.3. Otros lípidos estimuladores del crecimiento celular	88
7.4. Factor de necrosis tumoral	89
7.5. Factores de crecimiento polipeptídicos	91
7.5.1. Factor de crecimiento epidérmico	94
7.5.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas	99
7.5.3. Factor de crecimiento nervioso	102
7.5.4. Factor de crecimiento de células T o Interleukina-2	105
7.5.5. Factor de crecimiento derivado de fibroblastos	107
7.5.6. Insulina y factores de crecimiento insulín- semejantes	108
7.5.7. Factores de crecimiento transformantes	111
7.6. Oncogenes	117
8. Factores inhibidores del crecimiento celular	121
8.1. Agotamiento del medio	121
8.2. Inhibición por contacto	121
8.3. Chalonas	123
8.4. Poliaminas	124
8.5. Histamina	124
8.6. Insulina y factor de crecimiento insulín- semejante I	125
8.7. Factor de necrosis tumoral	126
8.8. Factor de crecimiento transformante beta	127
8.9. Prostaglandinas	130

8.10. Acidos grasos	133
8.11. Gangliosidos	135
8.12. Otros factores inhibidores	143
OBJETIVO	151
MATERIAL Y METODOS	153
I. MATERIAL	154
1. Muestras de líquido amniótico	155
2. Muestras de suero sanguíneo	155
3. Animales utilizados	155
4. Células utilizadas	155
4.1. Linfocitos humanos	155
4.2. Células de médula ósea de ratón	156
4.3. Líneas celulares establecidas	156
4.3.1. Células humanas	156
4.3.2. Células de ratón	156
5. Reactivos	160
6. Material plástico	161
7. Material de vidrio	162
8. Instrumentos y aparatos	162
II. METODOS	154
1. Esterilización de materiales y reactivos	165
2. Preparación de PBS	165
3. Preparación del buffer tripsina-EDTA	165
4. Preparación del líquido de centelleo	166
5. Preparación del suero fetal de ternera	166
6. Preparación del medio de cultivo	166
7. Obtención de células frescos normales de ratón y humanas	167
7.1. Células de médula ósea de ratón	167
7.2. Linfocitos humanos	167
7.3. Contaje, viabilidad y ajuste	168
8. Preparación y cultivo de las líneas celulares establecidas	168
8.1. Descongelación	168

8.2. Cultivo	169
8.2.1. Suspensión	169
8.2.2. Monocapa	169
9. Preparación de los distintos extractos lipídicos	170
9.1. Preparación de las muestras de los distintos extractos lipídicos	170
9.1.1. Líquido amniótico	170
9.1.2. Suero humano	171
9.1.3. Tumores "EHRlich" y "SL2"	171
9.2. Extracción lipídica	172
9.3. Determinación del contenido lipídico: método gravimétrico	173
10. Cromatografía en capa fina	173
11. Radioanálisis	175
12. Expresión de los resultados de proliferación celular de los fibroblastos NIH 3T3	177
13. Expresión de los resultados de inhibición de la proliferación celular	177
14. Ensayo de reversibilidad	179
14.1. Líquido amniótico crudo y P815X2	179
14.2. Extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE)	180
14.2.1. AFLE y P815X2	180
14.2.2. AFLE y linfocitos humanos	180
RESULTADOS	181
1. Líquido amniótico crudo	182
1.1. Efecto inhibitor de la proliferación celular producido por el líquido amniótico crudo	182
1.2. Reversibilidad del efecto inhibitor del líquido amniótico crudo	189
2. Extracto lipídico de líquido amniótico	194
2.1. Efecto inhibitor de la proliferación celular producido por el extracto lipídico de líquido amniótico	194
2.2. Reversibilidad del efecto inhibitor del extracto lipídico de líquido amniótico	208

2.3. Cromatografía en capa fina del extracto lipídico de líquido amniótico	221
3. Extractos lipídicos de citosol y membranas de los tumores EHRLICH y SL2, y de suero humano	231
3.1. Efecto inhibitor de la proliferación celular producido por los extractos lipídicos de citosol y membranas de los tumores EHRLICH y SL2, y de suero humano	231
3.2. Cromatografía en capa fina de los extractos lipídicos de citosol y membranas de los tumores EHRLICH y SL2	278
4. Influencia de la concentración celular en la acción inhibidora de distintos extractos lipídicos	311
5. Estudio de la proliferación de la línea celular de fibroblastos de ratón NIH 3T3	325
5.1. Diferencias de proliferación entre las células NIH 3T3 INICIADAS y las células NIH 3T3 TRANSFORMADAS	325
5.2. Efecto inhibitor de la proliferación de células NIH 3T3 INICIADAS y de células NIH 3T3 TRANSFORMADAS producido por el extracto lipídico de líquido amniótico	383
5.3. Influencia de la concentración de suero fetal de ternera del medio de cultivo en la acción inhibidora del extracto lipídico de líquido amniótico	418
DISCUSION	434
1. Introducción	435
2. Factores lipídicos reguladores de la proliferación celular en líquido amniótico humano	436
3. Ubicuidad de los factores lipídicos reguladores de la proliferación celular	448
4. Inhibición de la proliferación de células normales y de células tumorales	454
5. Mecanismos de inhibición de la proliferación celular ...	456

6. Inhibición de las células NIH 3T3 por los factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular	465
CONCLUSIONES	471
BIBLIOGRAFIA	474

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

I. LIQUIDO AMNIOTICO

1. GENERALIDADES

Antiguamente, se consideraba el líquido amniótico como un depósito estancado, cuya única función era la de proteger al feto, amortiguando las posibles agresiones externas.

Sin embargo, en los últimos 30 años se ha comprobado que el líquido amniótico circula a través del feto y existe un intercambio del mismo por medio de las membranas circundantes. Esto parece indicar que, aparte de la función anterior, exclusivamente mecánica, dicho fluido parece tener otras funciones de carácter fisiológico.

Por otra parte, la obtención de líquido amniótico a lo largo del embarazo, por medio de amniocentesis, y su estudio bioquímico detallado, puede proporcionar abundante información de interés clínico, a partir de sus constituyentes. Como ejemplo de esto, podemos estimar la madurez y el bienestar fetal, así como la existencia de algunas enfermedades de transmisión genética.

Por tanto, los parámetros bioquímicos del líquido amniótico van a reflejar, en todo momento, el estado del feto. Pero aparte de esto, y dada su posición privilegiada, puede que este fluido refleje la alteración de algunos parámetros inmunológicos a lo largo del embarazo, cuyo estudio podría aclarar, al menos en parte, el enigma aún oscuro de la gestación, ya que la madre no rechaza al feto, a pesar de diferir en sus antígenos de histocompatibilidad (HLA).

Esto parece indicar que el estudio de este fluido orgánico, con la tecnología más avanzada, puede que amplíe enormemente la información obtenida a partir del mismo en un futuro no muy lejano. Es posible que se puedan diagnosticar enfermedades fetales, que actualmente se descubren en el recién nacido, y que podrían tener remedio aplicando un tratamiento adecuado a la embarazada o al feto intraútero.

Por otro lado, puede que se aclaren algo las razones por las que la madre no rechaza al feto, así como la etiopatogenia de algunos abortos que ocurren en las primeras semanas de embarazo, y que parecen deberse a fenómenos de carácter inmunológico.

2. FUNCIONES DEL LIQUIDO AMNIOTICO

Desde que se rechazó la teoría unifuncional del líquido amniótico como cojín protector para el feto (LILEY, 1963), se han ido acumulando numerosas especulaciones acerca de sus funciones.

Realmente, el líquido amniótico parece poseer algunas funciones mecánicas, de las cuales, probablemente, la más importante sea la expansión de la cavidad amniótica. El aumento del espacio intrauterino es una condición imprescindible para la viabilidad fetal, ya que la expansión de la caja torácica es necesaria para un adecuado desarrollo pulmonar (PERLMAN y LEVIN, 1974). La expansión de la cavidad uterina también es necesaria para permitir el desarrollo de una morfogénesis normal (SMITH, 1982), especialmente de los miembros fetales (GRAHAM y cols., 1980).

Su papel como cojín o almohadillado protector parece obvio. La presión de traumas externos, que podrían afectar al feto, es compensada por el líquido circundante. Asimismo, el líquido amniótico funciona como lubricante para prevenir la adhesión al amnios y permitir la movilidad fetal (PLENTL, 1966).

Las temperaturas extremas, que también podrían dañar al feto, son amortiguadas por el líquido amniótico, el cual funciona como un baño de agua caliente (PRITCHARD y McDONALD, 1980). Por otra parte, actúa como reservorio en el que se distribuyen la orina, saliva y secreciones respiratorias fetales.

El agua y los constituyentes del líquido amniótico, deglutidos y absorbidos por el feto, representan un papel importante en el bienestar fetal. De este modo, el feto obtiene algunos elementos nutritivos del líquido deglutido. Recién nacidos con atresia de esófago, los cuales no pueden deglutir, suelen tener bajo peso al nacer, indicando esto que el líquido deglutido incrementa el crecimiento fetal.

El líquido amniótico suprime o inhibe el crecimiento de algunas bacterias (BLANCO y cols., 1982) y, aunque algunos de sus componentes protegen al feto frente a la invasión microbiana, la interacción entre microorganismos y el amnios es sólo incompletamente entendida. No obstante, se ha encontrado una

relación entre esta actividad antibacteriana y la concentración de zinc y fosfato en líquido amniótico (SCANE y HAWKINS, 1984), estando aumentada dicha actividad antibacteriana en situaciones de hipertermia (LARSEN y DAVIS, 1984).

Asimismo, se ha demostrado que el líquido amniótico induce la agregación de plaquetas humanas (SALEM y cols., 1982) pudiendo favorecer de este modo el proceso de la coagulación.

Por último, se han descrito una serie de propiedades inmunológicas en el líquido amniótico, pero éstas serán tratadas con mayor amplitud en otro apartado más adelante.

3. BIOQUIMICA DEL LIQUIDO AMNIOTICO

Algunos autores creen que fue Hipócrates el primero en describir la composición del líquido amniótico (PLENTL, 1966), pero parece improbable que Hipócrates apreciara el líquido amniótico como una entidad específica. Desde entonces, se han formulado numerosas teorías sobre este tema, pero ha sido en los últimos años, debido a las amniocentesis realizadas para establecer la severidad de la enfermedad hemolítica del feto, cuando más información se ha recogido acerca de los constituyentes del líquido amniótico. La mayoría de las muestras estudiadas provienen, por tanto, de embarazadas a término o cercanas a término, habiéndose publicado pocos estudios sobre la composición del líquido amniótico a lo largo del embarazo.

Los constituyentes, acerca de los cuales más datos han sido referidos, son el sodio, la urea, creatinina, cloro y potasio, aparte de la alfa-fetoproteína y los fosfolípidos, que por su relación con alteraciones del tubo neural y con la madurez pulmonar fetal, respectivamente, han sido ampliamente estudiados. Menos datos hay descritos sobre otros constituyentes bioquímicos, y datos seriados a lo largo del embarazo son excepcionales.

3.1. SODIO, CLORO, POTASIO, UREA Y CREATININA

Dentro de un amplio estudio realizado por LIND y cols. (1971), y como parte preliminar del mismo, se pudo comprobar que analizando la creatinina, urea, sodio y osmolaridad en líquido amniótico y sangre materna entre las semanas 6 y 20 de embarazo, no había diferencias significativas entre ambos líquidos. Esto parecía reforzar la sugerencia de que el líquido amniótico aparece como un ultrafiltrado del suero materno. Sin embargo, las sustancias solubles en agua, tales como electrolitos y urea, se distribuyen casi enteramente en la fase acuosa de una mezcla. Por ello, cuando se hacen comparaciones entre estos dos líquidos, sólo la fase acuosa tiene importancia, y si dichos líquidos contienen una fase en la cual estos solutos no penetran, como la protéica, debe hacerse una consideración al respecto. Para una comparación con sentido, las concentraciones deben ser expresadas en términos de contenido de agua de los líquidos examinados, siendo éste del 99, 95 y 92% para el líquido amniótico, suero fetal y suero materno, respectivamente.

En la primera mitad del embarazo, la concentración de sodio en el agua del líquido amniótico es $10,7 \pm 0,59$ mEq/lv/l menor que en el agua del suero materno, y $3,55 \pm 0,63$ mEq/lv/l menor que en el agua del suero fetal. Estas diferencias son estadísticamente significativas (LIND y cols., 1971). Al final de la primera mitad del embarazo y, en especial, durante la segunda mitad, desciende acusadamente la concentración de sodio en líquido amniótico.

La concentración de urea en el agua del suero materno es $1,62 \pm 0,85$ mg/100ml más baja que la del agua del líquido amniótico, y ésta es $0,96 \pm 0,99$ mg/100ml inferior que la del suero fetal, durante la primera mitad del embarazo. Ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa (LIND y cols., 1971), aunque aquélla entre el suero materno y el líquido amniótico está a punto de alcanzar significación. Al contrario que el sodio, la concentración de urea en líquido amniótico se eleva hacia la mitad del embarazo, y más aún, durante la segunda mitad de éste.

GILLIBRAND (1969) publicó datos sobre las concentraciones de potasio y cloro en suero materno y líquido amniótico, entre las semanas 10 y 44 de embarazo. Concluyó que los niveles de potasio del suero materno (valor medio de 3,97 mEq/l) y líquido amniótico (valor medio de 3,8 mEq/l) no diferían significativamente durante todo el embarazo. Asimismo, refirió que durante la primera parte del embarazo había un exceso medio de cloro de 2,4 mEq/l en líquido amniótico. Sin embargo, transformando estos resultados, según el contenido en agua del suero materno (92%) y del líquido amniótico (99%), las concentraciones de cloro y, en general las de potasio, son menores en líquido amniótico que en suero materno.

Durante la segunda mitad del embarazo, al contrario que para el sodio, no hay una caída significativa en la concentración de cloro del líquido amniótico. Si se comparan las concentraciones de aniones y cationes en este medio entre las semanas 32 y 38 de gestación, se encontrará que hay un incremento aparente de aniones, debido a la caída de la concentración de sodio, a que el cloro no varía relativamente, y a que la concentración de potasio permanece constante. Se cree que este incremento aparente de aniones es compensado por el ión hidrógeno procedente del ácido clorhídrico del estómago fetal, el cual contribuiría a la composición del líquido amniótico en el embarazo tardío.

Con respecto a la creatinina, sus niveles en suero materno son similares a los del suero fetal. Asimismo, los valores de creatinina en suero materno y en líquido amniótico están estrechamente correlacionados (VAN GEUNS y cols., 1975). Durante la segunda mitad del embarazo la concentración de creatinina en líquido amniótico sufre un incremento desde los niveles de 60 μ M, semejantes a los del plasma materno, hasta los 180 μ M encontrados en fechas cercanas al término del embarazo (PITKIN y ZVIREK, 1967).

No hay evidencias de una secreción activa directa de creatinina por parte de la placenta y/o membranas. La difusión simple desde el feto hacia el líquido amniótico no es posible, puesto que los niveles de creatinina en el feto son similares a los de la madre. Por tanto, sería el riñón fetal el probable

responsable de la aparición de creatinina en el líquido amniótico. De hecho, este parámetro es un fiel indicador de la función renal fetal. Puesto que los niveles en plasma son similares en el feto y la madre, la función renal materna podría ser también uno de los determinantes del nivel de creatinina en líquido amniótico. Por otra parte, este nivel también depende de la salida de creatinina del líquido amniótico, la cual se debe a la deglución fetal y a la difusión a través de las membranas (VAN GEUNS, 1975).

Según los datos referidos anteriormente, se puede afirmar que el sodio y el agua pueden pasar a través de la piel fetal con considerable libertad, hasta el momento en que ésta llega a ser impermeable, hacia la semana 20 de embarazo, cuando la estrecha relación entre el peso fetal y el volumen de líquido amniótico se rompe. Durante esta fase del desarrollo fetal, las concentraciones de los principales solutos del líquido amniótico están más estrechamente correlacionadas con las del suero fetal que con las del suero materno, considerándose el líquido amniótico como una parte del espacio líquido extracelular fetal. El hecho de que, incluso antes de la mitad del embarazo, el agua del líquido amniótico contiene ligeramente menos sodio y ligeramente más urea que el agua del suero fetal, podría ser explicado por la adición continua, durante la última fase de esta primera mitad del embarazo, de una orina con un contenido bajo en sodio y alto en urea, aunque no es posible obtener información del volumen de orina aportado por el feto en esta fase.

En la segunda mitad del embarazo, la composición bioquímica del líquido amniótico cambia progresivamente. Puede deberse a que la incrementada estratificación y corneificación de la piel fetal impida finalmente la difusión. Después de esto, las características cambiantes pueden reflejar la maduración de la función renal fetal, explicando el incremento en las concentraciones de urea y creatinina y la caída en la osmolaridad y la concentración de sodio.

De estos datos presentados, se puede obtener importante información acerca del feto. Durante la primera mitad del embarazo, podemos obtener información sobre la bioquímica del líquido

extracelular fetal, mientras que durante la segunda mitad, obtenemos información acerca del desarrollo de su función renal y, aparte de ello, en virtud de las células que descama, del desarrollo morfológico de su piel y membranas mucosas. Estos cambios son tan estrechamente referidos a la edad de gestación, que pueden ser usados como base para el calculo aproximado de ésta, aunque lo que realmente tiene importancia es que los cambios parecen reflejar la madurez funcional del feto.

3.2. OTROS CONSTITUYENTES BIOQUIMICOS

3.2.1. ACIDO URICO

DORAN y cols. (1970) han referido valores de ácido úrico en líquido amniótico progresivamente más altos conforme avanza el embarazo, con un valor medio de 64,2 mg/l desde la semana 36 de gestación en adelante, mientras que las muestras recogidas a término muestran un rango muy amplio de valores.

3.2.2. EQUILIBRIO ACIDO BASE

SEEDS y HELLEGERS (1968) realizaron un estudio del líquido amniótico tomando como parámetros la concentración de iones hidrógeno (H^+), la presión parcial de anhídrido carbónico (pCO_2) y la concentración de iones bicarbonato (HCO_3^-). Asimismo, tomaron tres fechas de referencia en diferentes periodos de gestación. Los resultados obtenidos por estos autores eran los siguientes:

EDAD GESTACIONAL	H^+ (nEq/lv/l)	pCO_2 (mm Hg)	HCO_3^- (mM)
10-23 semanas	59,34	41,10	16,57
25-31 semanas	67,81	43,20	15,16
Término	78,45	50,80	14,82

3.2.3. CARBOHIDRATOS Y ACIDOS ORGANICOS

La concentración de glucosa desciende desde un valor aproximado de 50 mg/100ml durante la primera mitad del embarazo, hasta aproximadamente 20 mg/100ml a término. La concentración de

lactato desciende desde aproximadamente 90 mg/100ml hasta 60 mg/100ml sobre el mismo periodo (SCHREINER y SCHMID, 1969).

No hay datos comparativos, sin embargo, acerca del ácido pirúvico, alfa-cetoglutarico y beta-hidroxibutirico.

La concentración de ácido cítrico desciende durante el segundo periodo de gestación, siendo los valores medios a la mitad del embarazo aproximadamente el doble de los correspondientes al final del mismo.

3.2.4. CALCIO

Durante la primera mitad del embarazo, la concentración es aproximadamente de 7 mEq/l, mientras que los valores en la segunda mitad varían entre 3 y 6 mEq/l (GOODLIN, 1972).

3.2.5. MAGNESIO Y ZINC

Entre las semanas 11 y 19 de embarazo, la concentración media de magnesio es de $1,3 \pm 0,42$ mg/100ml (NUSBAUM y ZETNER, 1973). Por otra parte, GOODLIN (1972) sugiere que el valor varía entre 3,8 mEq/l durante el primer trimestre y 4,0 mEq/l a término.

En cuanto al zinc, LAITINEN y cols. (1985) determinaron su concentración durante el segundo trimestre en 111 embarazos normales, variando ésta entre 0,3 y 4,0 μ M/l, con un valor medio de 1,3 μ M/l. También hicieron la misma determinación en 29 embarazos con malformaciones fetales y observaron que la concentración de zinc variaba entre 1,8 y 17,9 μ M/l, con un valor medio de 5,0 μ M/l. Esta elevación del zinc se correlacionaba con la de alfa-fetoproteína, que como veremos después, se utiliza como marcador de malformaciones fetales.

3.2.6. HIERRO Y COBRE

Según NUSBAUM y ZETNER (1973), los valores medios entre las semanas 11 y 19 de embarazo son de 31 ± 20 μ g/100ml para la concentración de hierro y de 31 ± 13 μ g/100ml para la de cobre.

3.2.7. PROTEINAS Y AMINOACIDOS

QUEENAN (1971) hizo un estudio seriado sobre el nivel de proteínas en líquido amniótico por medio de espectrofotómetro. Para ello, realizó 378 determinaciones en periodos gestacionales de 4

semanas. En el primer periodo (13-16 semanas), el nivel medio de proteínas en líquido amniótico era de 0,385 g/100ml. De la 17 a la 20 semana, el nivel medio era de 0,514 g/100ml, y de la 21 a la 24 semana, era de 0,577 g/100ml. El nivel máximo se alcanzaba de la 25 a la 28 semana y era de 0,645 g/100ml. Después, este nivel sufría un descenso, de tal forma que, de la 29 a la 32 semana era de 0,393 g/100ml, de la 33 a la 36 semana era de 0,314 g/100ml y de la 37 a la 40 semana era de 0,296 g/100ml. Con posterioridad, a la 40 semana, el nivel encontrado era de 0,302 g/100ml.

Según estos datos, podemos apreciar que el nivel de proteínas en líquido amniótico es creciente, desde comienzos de la gestación en que es aproximadamente 1/20 parte del nivel en suero, hasta alcanzar un pico entre las semanas 25 y 28 en que el nivel es aproximadamente 1/10 parte del nivel en suero. Posteriormente, desciende hasta llegar a término, obteniéndose entonces unos niveles similares a los iniciales.

Las proteínas en líquido amniótico son muy similares electroforéticamente a las proteínas en suero. El fibrinógeno parece estar ausente en líquido amniótico. FISCHBACHER y QUINLIVAN (1970) estudiaron estas proteínas por electroforesis en muestras de líquido amniótico recogidas a término. Las bandas originadas eran muy similares a las obtenidas en suero, con su distribución general en prealbúmina, albúmina, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e inmunoglobulinas. El nivel medio de proteínas totales era de 0,205 g/100ml, de los cuales, la albúmina formaba el 60%, la ceruloplasmina el 1,5%, la transferrina el 11,6% y la Ig A y la Ig G el 0,1% y el 11,0%, respectivamente.

Una proteína, cuya determinación en líquido amniótico tiene un enorme interés clínico, es la alfa-fetoproteína. Tiene un peso molecular de 70000, y su síntesis comienza pronto en el embarazo, teniendo lugar en el saco vitelino, tracto gastrointestinal e hígado fetal. El contenido en alfa-fetoproteína del suero fetal es 200 veces superior al contenido del líquido amniótico. Su concentración en este último medio alcanza un nivel máximo en la semana 13 de gestación, tras la cual, sufre un descenso hasta llegar a término.

BROCK y SUTCLIFFE (1972) refirieron que la alfa-fetoproteína estaba elevada en embarazos con defectos del tubo neural fetal, principalmente en pacientes anencefálicos, hidrocefálicos y con espina bífida. Posteriormente, han sido referidas otras asociaciones clínicas, en las cuales, la elevación de la alfa-fetoproteína no es tan drástica como las anteriores. Asimismo, como veíamos antes, recientes estudios refieren una correlación entre la elevación de alfa-fetoproteína y de zinc en dichas alteraciones del tubo neural fetal (LAITINEN y cols., 1985). Estos autores demostraron que dicha correlación no se debía a que el zinc estuviese ligado a la alfa-fetoproteína, ya que la separación de la misma por inmunoabsorbancia no producía una variación de los niveles de zinc en líquido amniótico. Parece probable que dicha correlación esté causada por la liberación simultánea de alfa-fetoproteína y alguna proteína transportadora de zinc por parte del feto en el líquido amniótico. Esta proteína podría ser la albúmina y la alfa₂-macroglobulina, aunque no se descarta la posibilidad de que sean otras.

En cuanto a los aminoácidos, EMERY y cols. (1970) realizaron un estudio de los mismos en líquido amniótico, por medio de cromatografía de intercambio iónico, desde la semana 9 de gestación hasta el final de ésta. Identificaron tres grupos en cuanto a las concentraciones de aminoácidos. Un grupo tenía una concentración estable a lo largo del embarazo, como la prolina. En el segundo grupo, la concentración disminuía progresivamente desde el tercer trimestre hasta término, perteneciendo a este grupo serina, glicina, fenilalanina, lisina y arginina. Finalmente, en el tercer grupo, algunos aminoácidos tenían una concentración más baja en el primer trimestre que en las semanas 13 a 16, pero después descendía conforme el embarazo avanzaba, aunque en algunos casos las concentraciones máximas se alcanzaban al final del embarazo. En este último grupo, se incluía la taurina.

SCHULMAN y cols. (1972) cuantificaron aminoácidos en líquido amniótico usando cromatografía de gas. Demostraron que las concentraciones medias de la mayoría de los aminoácidos disminuían conforme aumentaba la edad gestacional, pero los niveles de serina

aumentaban. Los niveles de triptófano, no medibles con técnicas de intercambio iónico, eran bajos comparados con otros aminoácidos. También insinuaron que los índices serina/fenilalanina y serina/prolina en líquido amniótico, podrían ser útiles como indicadores de la madurez fetal.

Hay un acuerdo general en que los aminoácidos en líquido amniótico descienden conforme avanza la gestación, con la excepción de taurina y, posiblemente, serina. Los niveles crecientes de taurina a lo largo del embarazo, referidos por algunos autores, podrían deberse a que la fuente de este aminoácido en líquido amniótico fuese el propio feto. Si esto es así, la concentración de taurina podría reflejar el crecimiento, nutrición, bienestar y madurez fetal.

3.2.8. BILIRRUBINA

La determinación de la concentración de bilirrubina en líquido amniótico, mediante la observación de la densidad óptica de éste por espectrofotómetro a una determinada longitud de onda, resulta de enorme interés clínico para estimar la severidad de la enfermedad hemolítica del feto. No obstante, se puede encontrar una apreciable concentración de bilirrubina en líquido amniótico aunque el feto no esté afectado por dicha enfermedad.

CHERRY y cols. (1970) demostraron que la bilirrubina está ligada a la albúmina en líquido amniótico y determinaron que el contenido en albúmina del mismo era aproximadamente del 65% de las proteínas totales. Experimentalmente, incrementaron la concentración de albúmina en líquido amniótico en voluntarios y mostraron que el contenido en bilirrubina estaba también incrementado.

MURRAY y cols. (1970) estudiaron muestras de líquido amniótico, obtenidas entre las semanas 16 y 26 de embarazo, a partir de mujeres con fetos no afectados por enfermedad hemolítica. La concentración de proteínas variaba entre 3,6 y 10,3 mg/ml, mientras que los pigmentos biliares totales variaban entre 1,2 y 2,9 µg/ml. El índice bilirrubina/proteínas estaba entre 0,250 y 0,405.

3.2.9. VITAMINAS

Se ha descrito la presencia de metabolitos de la vitamina D en líquido amniótico (LAZEBNIK y cols., 1983). Asimismo, se ha descrito la presencia de vitamina A en el líquido amniótico, y el aumento de su concentración, tanto en dicho medio como en suero materno, se ha relacionado con alteraciones del tubo neural fetal (PARKINSON y cols., 1982).

3.2.10. ENZIMAS

Numerosas enzimas han sido detectadas en líquido amniótico desde hace 40 años hasta ahora, pero no resulta interesante describirlas aquí. Tan sólo, destacar que, aunque al principio no se le encontró significación clínica a su determinación, actualmente ésta tiene un enorme interés en cuanto al desarrollo fetal y la interacción del feto con su ambiente. Es útil para establecer la madurez y el riesgo fetal y para el diagnóstico prenatal de algunos errores innatos del metabolismo.

3.3. HORMONAS EN EL LIQUIDO AMNIOTICO

3.3.1. ESTROGENOS

Según BOLOGNESE y cols. (1971), la concentración de estriol total en líquido amniótico varía desde menos de 20 µg/l a las 24 semanas, hasta un promedio de 979 µg/l encontrados al término del embarazo. Asimismo, BOLOGNESE y cols. (1971) describieron un incremento rápido en el estriol total y en los estrógenos totales en el último trimestre, aunque no tan rápido como en la excreción urinaria de estriol.

Por otra parte, se han descrito asociaciones entre niveles bajos de estriol y distintos tipos de patología, tales como anencefalia, crecimiento intrauterino retardado, e incluso, se ha tratado de relacionar con la severidad de la eritroblastosis fetal. También se ha correlacionado, tanto los niveles de estrógenos en sangre como los de estriol en orina, con el índice lecitina/esfingomielina (L/S) (KAY y HOBBS, 1984), que como veremos después, es un índice de la madurez pulmonar fetal.

3.3.2. OTROS ESTEROIDES

Se han descrito otros muchos esteroides en líquido amniótico, pero quizás los principales sean los C-21 esteroides neutros, el cortisol y la testosterona.

En cuanto a los primeros, se han encontrado niveles elevados de glucurónido de pregnandirol en embarazos post-término, y esta elevación podría explicar la actividad local de progesterona aumentada que previene el parto. FRASIER y cols. (1975) mostraron niveles elevados de 17-alfa-hidroxiprogesterona antes de la semana 30, pero no después, en un embarazo asociado con una hiperplasia adrenal deficiente en 21-hidroxilasa fetal, en comparación a 13 pacientes control estudiados entre las semanas 24 y 38, en los que las concentraciones variaban desde 140 hasta 310 ng/100ml.

Por otra parte, MURPHY (1975) encontró que los niveles de cortisol ascendían desde 5 a 10 ng/ml hasta una media de 22 ng/ml en la semana previa al final del embarazo. También, encontró una buena correlación con los niveles en el cordón umbilical, y en algunos casos de isoimmunización Rh severa estudiados, notó un ascenso en el cortisol justo antes de la muerte fetal.

En cuanto a la testosterona, NEAN y cols. (1981) encontraron variaciones en su nivel en líquido amniótico entre ambos sexos, lo cual, sería de gran interés en un futuro próximo para detectar ciertos errores metabólicos ligados al sexo con cierta antelación.

3.3.3. GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (HCG)

CROSIGNANI y cols. (1971) mostraron que el suero del cordón fetal contiene alrededor del 0,22% (0,027 UI/ml) del contenido en HCG del suero materno (12,1 UI/ml), mientras el líquido amniótico contiene el 2,4% (0,34 UI/ml).

También CROSIGNANI y cols. (1971) encontraron que el suero materno y el líquido amniótico de madres de un feto macho contenía más HCG que cuando portaban fetos hembra (0,30 UI/ml frente a 0,049 UI/ml). Además, encontraron que en la sensibilización Rh severa se producía una elevación mayor de los valores de HCG en líquido amniótico que la observada al medir otra hormona proteica, el lactógeno placentario humano.

3.3.4. LACTOGENO PLACENTARIO HUMANO (HPL)

JOSIMOVICH y cols. (1978) mostraron que había un paralelismo entre las concentraciones de HPL en el líquido amniótico y los valores en suero de madres portadoras de fetos con diverso grado de afectación de eritroblastosis fetal.

Los estudios "in vivo" e "in vitro" favorecen la hipótesis que afirma que el HPL procede de la vascularización uterina materna por difusión a través de las membranas fetales y que el nivel en el líquido es mantenido normalmente por debajo de 1/8 del encontrado en suero materno (JOSIMOVICH y cols., 1978), por degradación en el propio líquido o en el feto. Este probable equilibrio entre el líquido y el suero materno contrasta con el de la gonadotropina coriónica, que parece correlacionarse más estrechamente con los niveles en suero fetal.

3.3.5. PROLACTINA HIPOFISARIA

Parece ser que mujeres embarazadas, con hipertensión moderada o severa en el último trimestre, tienen niveles de prolactina humana en suero y en líquido amniótico más bajos que los de embarazadas normales (JOSIMOVICH, 1977), pero a pesar de esto, la importancia del nivel de prolactina amniótica todavía no ha sido establecida en el humano.

Recientes estudios (ANDERSEN y WEBER, 1985) han demostrado una correlación entre los niveles de sodio y cloro y la concentración de prolactina en líquido amniótico, a lo largo de la gestación. Según estos autores, las concentraciones de sodio y cloro influirían directa e indirectamente en la síntesis de prolactina por parte de la decidua, habiéndose demostrado "in vitro" que la prolactina reduce el transporte de agua entre la cara fetal y la materna de la membrana amniótica humana. Por tanto, la prolactina tendería a mantener la osmolaridad y la cantidad de líquido amniótico. Sin embargo, es difícil imaginar como las células de la decidua, embebidas por el ambiente iónico y osmótico materno, pueden recibir un mensaje de osmolaridad o concentración iónica alterada a través de las membranas fetales y el corion.

3.3.6. HORMONAS TIROIDEAS (T₃ Y T₄) Y TIROTROPINA HIPOFISARIA (TSH)

CHOPRA y CRANDALL (1975) encontraron niveles crecientes de T₄ (160-1000 ng/ml) entre las semanas 15 y 42 de gestación. En contraste con lo anterior, la T₃ descendía desde aproximadamente 350 ng/100ml hasta 100 ng/100ml al término del embarazo. Posteriormente, se ha determinado la presencia de hormona estimulante del tiroides (TSH) en líquido amniótico (KOURIDES y cols., 1982).

La determinación de T₃, esencialmente producida por el feto, podría detectar la presencia de fetos atiroideos en casos en los que la madre tuviera previamente fetos similares. Sin embargo, no se ha encontrado relación clínica con los niveles de estas hormonas y ha sido demostrado que las concentraciones en líquido amniótico de T₃, T₄ y TSH no determinaban el estado del tiroides fetal en embarazos complicados por alteraciones tiroideas maternas.

3.3.7. INSULINA

Pequeñas cantidades de insulina inmunorreactiva, con una concentración aproximada de 1/8 de la encontrada en suero materno, han sido detectadas en líquido amniótico humano (SPELLACY y cols., 1973). También encontraron una correlación entre los niveles de insulina en líquido amniótico a término y el peso del recién nacido.

3.3.8. FACTORES LIBERADORES HIPOTALAMICOS

MITNICK y cols. (1974) han referido la presencia de cantidades considerables de factor liberador de tirotrópina (TRH) y de gonadotropina (LRH) en líquido amniótico humano. También han referido su capacidad para fijarse en membranas corioamnióticas.

3.3.9. CATECOLAMINAS Y RENINA

ZUSPAN y cols. (1974) han identificado epinefrina y norepinefrina en líquido amniótico humano y han discutido la posibilidad de que estas sustancias sean excretadas por los riñones fetales, quizás como resultado de la respuesta del nervio esplácnico y la médula adrenal al stress.

También se han referido niveles de renina en líquido amniótico cuatro o cinco veces superiores a los del suero materno (BROWN y cols., 1964).

3.4. PROSTAGLANDINAS Y OTRAS SUSTANCIAS OXITOTOCICAS

3.4.1. PROSTAGLANDINAS (PG)

Tanto la síntesis como la degradación de prostaglandinas no tienen lugar en el líquido amniótico. La incubación "in vitro" con un precursor de prostaglandinas, el ácido dihomo-gamma-linolénico, no determina un incremento en los niveles de las mismas. De igual forma, la incubación de líquido amniótico con PG F_{2α} marcada, no muestra su inactivación (KEIRSE y TURNBULL, 1976). Se puede asumir que las prostaglandinas encontradas en líquido amniótico se originan a partir de las estructuras circundantes, principalmente de las membranas fetales, decidua y, posiblemente en menor extensión, a partir del miometrio. Las prostaglandinas de origen decidual o miometrial, las cuales difunden hacia la cavidad amniótica, son probablemente degradadas durante su paso a través del corion (que es rico en 15-OH-prostaglandín-dehidrogenasa) y alcanzan el líquido amniótico, principalmente, en forma de 15-ceto-derivados. Por contra, las prostaglandinas de origen coriónico, las cuales han escapado a la inactivación en su sitio de producción, difundirían inalteradas a través del amnios, que tiene una capacidad metabólica muy baja (KEIRSE y TURNBULL, 1976).

A pesar de que cree que su síntesis no tiene lugar en el líquido amniótico, se ha demostrado que éste inhibe la síntesis de prostaglandinas, y que esta inhibición se reduce acusadamente cuando se utiliza líquido amniótico obtenido durante el parto (SABED y cols., 1982).

SINGH y ZUSPAN (1974) midieron por densitometría los niveles de las principales prostaglandinas en líquido amniótico. Entre las semanas 24 y 36 de embarazo, los niveles permanecían constantes, siendo éstos de 1,5 a 2,0 ng/ml para la PG F_{1α}, 4,5 a 4,7 ng/ml para la PG F_{2α}, 1,0 a 1,2 ng/ml para la PG E₁ y 0,25 a 0,3 ng/ml

para la PG E₂. Durante el parto, los niveles estaban muy incrementados, siendo de 12,0 ng/ml para la PG F_{1α}, 300 ng/ml para la PG F_{2α}, 1,8 ng/ml para la PG E₁ y 1,7 ng/ml para la PG E₂.

Asimismo, TAMBY-RAJA y cols. (1976), usando como técnica el radioinmunoensayo, observaron un incremento lineal en los niveles de PG F y PG E entre las semanas 36 y 40 de embarazo. Así, la PG F aumentaba desde $58 \pm 5,8$ pg/ml hasta 4277 ± 1469 pg/ml, mientras que la PG E lo hacía desde $0,46 \pm 0,024$ ng/ml hasta $4,26 \pm 1,02$ ng/ml.

El ácido araquidónico, que es un precursor obligado en la síntesis de prostaglandinas, también sufre un drástico incremento en su concentración en líquido amniótico tras establecerse la actividad de parto. Antes de éste, el nivel es de 68 ± 50 ng/ml y, tras éste, el nivel aumenta hasta 560 ± 50 ng/ml (McDONALD y cols., 1974). Este incremento es 3 a 4 veces mayor que el encontrado para otros ácidos grasos, indicando, probablemente, que el ácido araquidónico es liberado preferentemente en la instauración del parto o justamente antes del comienzo del mismo.

3.4.2. POLIPEPTIDOS: OXITOCINA, VASOPRESINA Y BRADIQUININA

SEPPALA y cols. (1972) determinaron por radioinmunoensayo el contenido en oxitocina del líquido amniótico durante la última fase del embarazo. Previamente a la instauración del parto, dicho contenido variaba entre 150 y 800 pg/ml, con un valor medio de 275 pg/ml o 138 μ U/ml. Durante el parto, aumentaba hasta 110 a 1600 pg/ml, con valor medio de 695 pg/ml o 350 μ U/ml. El líquido amniótico contaminado con meconio contenía mayor cantidad de oxitocina (1000 a 14000 pg/ml ó 500 a 7000 μ U/ml), encontrándose los valores más altos en las muestras más contaminadas. Estos mismos autores insinuaron que la expulsión de meconio en el líquido amniótico podría representar, posiblemente, un mecanismo defensivo por el cual el feto, sujeto al stress intrauterino, podría iniciar o acelerar su propio parto.

A pesar de que se han encontrado niveles altos de vasopresina (ADH) circulante en el feto durante el parto, no se disponen de

estudios de ADH en líquido amniótico, pero la actividad oxitocinasa-vasopresinasa encontrada en el mismo a término es muy baja (ROSENBLOOM y cols., 1975).

DEIHAYE y cols. (1972) demostraron la presencia de bradiquininógeno en líquido amniótico. Entre las semanas 10 y 22 de gestación, el contenido en bradiquininógeno correspondía a 1,5-200 ng/ml de bradiquinina (valor medio de 70 ng/ml). A término, antes o justo después de instaurarse el parto, el contenido era menor y correspondía a 1-45 ng/ml de bradiquinina (valor medio de 10 ng/ml). El líquido amniótico humano poseía también actividad quininasa, la cual, era mucho más pronunciada a comienzo del embarazo que a término.

3.4.3. HISTAMINA

Grandes cantidades de histamina son producidas por el feto durante el tercer trimestre de embarazo. Se ha sugerido que la histamina de origen fetal regula el flujo sanguíneo e intercambio a través de la placenta por medio de su acción sobre las arteriolas placentarias fetales. Asimismo, se han encontrado altos niveles de diamino-oxidasa en la placenta y en plasma materno. Esta enzima protege el organismo materno de los efectos de la histamina fetal (FUCHS, 1971).

También se ha determinado la concentración de histamina en líquido amniótico, comprobando que ésta era mayor en pacientes con insuficiencia placentaria (592 ± 171 ng/ml) que en controles normales (243 ± 112 ng/ml). En casos de muerte intrauterina prolongada, los niveles eran muy altos (1325 ng/ml).

3.4.4. SEROTONINA

La placenta es extremadamente rica en monoaminooxidasa (MAO), una enzima que inactiva la serotonina materna y cataecolaminas, protegiendo al feto de sus efectos. Esto es particularmente importante, ya que los vasos umbilicales son extremadamente sensibles a la acción vasoconstrictora de la serotonina (FUCHS, 1971). También se puede detectar la actividad aminooxidasa en líquido amniótico, el cual, incluso durante el parto, contiene sólo cantidades mínimas (0 a 0,83 μ g/ml) de serotonina.

3.5. LIPIDOS EN EL LIQUIDO AMNIOTICO

La composición lipídica del líquido amniótico tiene un enorme interés clínico, ya que el surfactante pulmonar está formado, en su mayor parte, por fosfolípidos, y dentro de éstos, es la lecitina la que ocupa un porcentaje más alto.

GLUCK y cols. (1971) comprobaron que se producía una oleada de lecitina en el líquido amniótico, cuando el feto llegaba a ser maduro desde el punto de vista de la función respiratoria. Además, esta elevación reflejaba un cambio en el metabolismo de la lecitina en el pulmón fetal, al producir una molécula con mayor actividad superficial (dipalmitoil-lecitina).

Desde entonces, se han intensificado las investigaciones sobre lípidos en líquido amniótico, tratando de correlacionarlas con la evolución de la madurez pulmonar fetal. Aunque para nosotros no resulta de interés el estudio del surfactante pulmonar, sí es interesante profundizar algo en la composición lipídica del líquido amniótico.

3.5.1. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LIPIDOS EN EL LIQUIDO AMNIOTICO

Estudios preliminares llevados a cabo por HELMY y HACK (1962), demostraron diferencias entre los lípidos en sangre materna y del cordón y los del líquido amniótico. Estos autores atribuyeron un origen mixto a los lípidos del líquido amniótico. Se pensó que los monoglicéridos, glicolípidos, y posiblemente la lecitina, estaban producidos por el epitelio amniótico. En particular, observaron que la concentración de lecitina era mucho mayor en líquido amniótico que en plasma.

Posteriormente, BIEZENSKI y cols. (1968) investigaron la presencia de lípidos en líquido amniótico. Realizaron una extracción lipídica utilizando una mezcla de cloroformo:etanol. La concentración de fosfolípidos totales se calculó determinando el fósforo lipídico y multiplicando esta cifra por un factor de corrección de 25. Los distintos fosfolípidos fueron separados e identificados por cromatografía en capa fina (TLC). Los lípidos no pclaros fueron identificados después de una cromatografía en capa

fina bidimensional. Después de revelar la cromatografía con ácido sulfúrico concentrado, las manchas individuales se ensayaron respecto a estándares por transmisión densitométrica. El valor total de lípidos no polares fue calculado por la adición de los valores individuales de los picos de área y los valores de lípidos totales calculados al añadir la concentración total de lípidos no polares y la concentración total de fosfolípidos.

Estos autores encontraron que había un pequeño incremento en la concentración de lípidos totales en líquido amniótico entre la semana 26 y el final del embarazo (12,6 a 15,38 mg/100ml) y que, en su mayoría, se debía a un incremento de fosfolípidos (3,15 a 5,19 mg/100ml). La concentración de lípidos no polares permanecía relativamente constante.

El componente principal de la fracción de fosfolípidos era la lecitina (también llamada fosfatidilcolina), la cual correspondía al 65% de los fosfolípidos totales a término. Dentro de los lípidos no polares, los monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol, permanecían relativamente constantes a lo largo del embarazo. El colesterol libre mostró una ligera caída, mientras que se incrementaban los triglicéridos.

Estos estudios se llevaron a cabo en sobrenadante de líquido amniótico, después de centrifugar éste. El análisis del sedimento mostró que en su mayoría estaba formado por lípidos no polares, y sólo aproximadamente un 7% del mismo, correspondía a fosfolípidos, mientras que en el sobrenadante, los fosfolípidos ocupaban 1/3 parte de los lípidos totales.

Estos mismos autores investigaron la distribución de lípidos polares y no polares en plasma fetal, plasma materno, placenta, vernix y en el sedimento de líquido amniótico tras su centrifugación. En cada caso, el perfil de los lípidos constituyentes difería marcadamente de aquellos del líquido amniótico y, por tanto, ninguna de las anteriores era fuente principal de los lípidos de dicho líquido. Asimismo, estos autores comentaron la posible asociación entre el incremento de fosfolípidos en líquido amniótico y la secreción por el árbol traqueobronquial de lipoproteínas ricas en fosfolípidos.

Más tarde, NELSON (1969) analizó la composición lipídica en líquidos amnióticos centrifugados y en líquidos sin centrifugar, pero homogeneizados. Los fosfolípidos fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC) e identificados en el cromatograma por su valor de Rf. Asimismo, se cuantificó el fósforo del sílice gel del cromatograma. La concentración de lípidos totales en líquido amniótico no centrifugado y homogeneizado a término fue de 63,7 mg/100ml (\pm 21,4 SD). En las muestras centrifugadas, la concentración total de lípidos fue sólo de 59,6 mg/100ml (\pm 25,0 SD). Los fosfolípidos ocuparon aproximadamente el 25% de los lípidos totales (un porcentaje algo más bajo que el encontrado por BIEZENSKI). La lecitina, sin embargo, apareció de nuevo como el componente principal de la fracción fosfolipídica, constituyendo alrededor del 66% de los fosfolípidos totales a término.

Los resultados de NELSON (1969), estaban de acuerdo con los de SVENDSEN y GRUNDT (1966), quienes habían determinado una concentración de lípidos totales en líquido amniótico de 59 mg/100ml. Estos autores utilizaron como solvente una mezcla 2:1 de cloroformo: metanol, y la técnica difería de la utilizada por BIEZENSKI y cols. (1968). Por ello, obtenían distintos valores de lípidos y fosfolípidos totales, aunque la proporción de lecitina en la fracción fosfolipídica era similar. En ambos casos, los fosfolípidos habían sido calculados por determinación del fósforo lipídico y multiplicando por un factor de corrección de 25.

GUSDEN y WAITE (1972) demostraron que la lecitina y otros fosfolípidos son hidrolizados por álcalis, mientras que la esfingomielina no lo es. Estimando el fósforo de los fosfolípidos, antes y después de la hidrólisis, determinaron la proporción de esfingomielina y de fosfolípidos en líquido amniótico a lo largo de la gestación. Demostraron un incremento general en la concentración media de fosfolípidos, mientras que había una disminución de los fosfolípidos no hidrosolubles (esfingomielina). Estos autores, al igual que BIEZENSKI y cols. (1968), obtuvieron unos valores de fosfolípidos totales inferiores a los obtenidos por otros investigadores. Esto podría deberse a que, aparte de que el líquido había sido centrifugado, las muestras habían sido filtradas a

través de un filtro de papel de $0,22 \mu\text{m}$. Esto fue ratificado posteriormente por WAGSTAFF y cols. (1974), quienes demostraron que tanto la centrifugación como la filtración reducen las cantidades de fosfolípidos en líquido amniótico. Esta pérdida se debe, sobre todo, a lecitina, resultando menos afectada la esfingomielina, acentuándose más la diferencia entre estos dos fosfolípidos en estadios más avanzados de la gestación.

ARVIDSON y cols. (1972) comprobaron que entre el primer trimestre y el final del embarazo había un incremento del doble en la concentración de fosfolípidos. Mientras inicialmente la lecitina ocupaba entre 28 y 51% del total de fosfolípidos, al término del embarazo esta proporción se había incrementado hasta 50 y 79%. La proporción de esfingomielina, sin embargo, descendía desde 29-51% hasta 25-46%. La determinación del fósforo de los fosfolípidos totales en líquido amniótico a término fue de $0,142 \text{ mg}/100\text{ml}$. Por aplicación de un factor de conversión de 25, como utilizaban la mayoría de los autores para convertir mg de fósforo de fosfolípidos a mg de fosfolípidos, la cantidad de estos en líquido amniótico sería de $3,5 \text{ mg}/100\text{ml}$.

BIEZENSKI, en un trabajo posterior (1973), volvió a obtener, al igual que el autor anterior, unos valores de fosfolípidos totales inferiores a los de otros investigadores, lo que confirma que la diferente manipulación del líquido amniótico, previa a su análisis, puede modificar los resultados. BIEZENSKI demostró que los fosfolípidos totales sufrían un incremento lineal desde $2,1 \text{ mg}/100\text{ml}$ a las 15-19 semanas, hasta $5,2 \text{ mg}/100\text{ml}$ al término del embarazo. La concentración de lecitina se incrementaba desde $0,44 \text{ mg}/100\text{ml}$ al comienzo de la gestación, hasta $2,92 \text{ mg}/100\text{ml}$ a término. En cambio, la concentración de esfingomielina descendía desde $1,07 \text{ mg}/100\text{ml}$ hasta $0,35 \text{ mg}/100\text{ml}$.

De todas estas investigaciones se puede deducir que la fracción lipídica del líquido amniótico mejor estudiada es la fosfolipídica, como constituyente del surfactante pulmonar fetal. Dentro de los fosfolípidos, destacan la lecitina y la esfingomielina como integrantes principales, pero hay también otros fosfolípidos menores, como la fosfatidil-etanolamina, el

fosfatidil-inositol, la fosfatidil-serina y el fosfatidil-glicerol. Este último sólo se encuentra presente en líquido amniótico en la última fase de la gestación, cuando el pulmón fetal está totalmente maduro.

3.5.2. FOSFOLÍPIDOS MAYORES

Los fosfolípidos son ésteres de ácidos grasos y ácido fosfórico con un alcohol, al que se le puede añadir después una base (Ej: colina). Según el alcohol que esté esterificado, podemos distinguir entre glicerofosfolípidos (el alcohol es el glicerol) y esfingofosfolípidos (el alcohol es la esfingosina).

En el caso de la lecitina (que es un glicerofosfolípido), si los grupos hidroxilos en C₁ y C₂ del glicerol están esterificados con ácidos grasos, resulta un diglicérido. La incorporación de fosfato, en forma de ácido fosfórico, determinaría la formación de ácido fosfatídico, y por último, la incorporación de una base orgánica (en este caso la colina) a esa molécula, daría lugar a fosfatidil-colina o lecitina. La molécula de lecitina varía según los ácidos grasos esterificados a los carbonos C₁ y C₂. Al comienzo del embarazo, la lecitina del líquido amniótico es rica en ácido palmítico en C₁, pero tiende a tener otros ácidos grasos en C₂, como ácido mirístico o ácido esteárico. Conforme se incrementa la madurez pulmonar, por un cambio en el metabolismo de los fosfolípidos, el ácido graso en C₁ sigue siendo ácido palmítico, pero también lo es en C₂, resultando un incremento en la proporción de dipalmitoil-lecitina.

Según GLUCK y cols. (1972), existen dos mecanismos separados en la biosíntesis de lecitina por el pulmón fetal humano. Uno sería la síntesis de dipalmitoil-lecitina (1-palmítico:2-palmítico) por incorporación de CDP-colina a un diglicérido, y ésta es la vía principal responsable de la disminución de la tensión superficial en el alveólo fetal a término. La segunda vía o mecanismo no incorpora colina, y tendría lugar por la metilación de fosfatidil-etanolamina para formar 1-palmítico:2-mirístico lecitina. Este mecanismo sería previo al anterior y sería sustituido por el mismo en la última fase de la gestación. Asimismo, el segundo mecanismo

podría ser inhibido por algunos factores como hipotermia, hipoxia y acidosis. No obstante, HALLMAN y GLUCK (1974) afirmaron que no era segura la existencia del mecanismo de producción de lecitina por metilación de la fosfatidil-etanolamina, ya que la fosfatidil-dimetil-etanolamina podría confundirse con fosfatidil-glicerol en el cromatograma.

La esfingomielina contiene también un átomo de fósforo y un grupo colina, pero al contrario que la lecitina, el alcohol es la esfingosina, siendo por tanto un esfingofosfolípido.

El hecho de que la esfingomielina se mantenga constante o disminuya suavemente a lo largo del embarazo, tiene un enorme interés a la hora de determinar el surfactante pulmonar en líquido amniótico. Si éste es determinado sólo por la cantidad de lecitina, que es su componente principal, el volumen de líquido amniótico influiría en los resultados. Por ello, GLUCK y cols. (1971) eligieron usar la esfingomielina como componente de referencia, afirmando que el índice lecitina/esfingomielina se correlacionaba perfectamente con el surfactante pulmonar, obviando de esta manera los errores debidos a la fluctuación del volumen del líquido amniótico.

Sin embargo, el índice lecitina/esfingomielina puede estar también sometido a variaciones. En primer lugar, hay que tener en cuenta que las proporciones de lecitina y esfingomielina varían a lo largo del embarazo, y mientras la esfingomielina es el fosfolípido principal durante la primera mitad de gestación, la lecitina aumenta conforme avanza ésta hasta ser el fosfolípido principal a término. Normalmente, a esta edad de gestación, un índice lecitina/esfingomielina superior o igual a 2 se considera indicativo de madurez pulmonar fetal.

Hay que destacar también, que las concentraciones absolutas de un mismo fosfolípido, obtenidas por autores diferentes, pueden variar considerablemente. Esto puede deberse, aparte de la diferente manipulación inicial del líquido amniótico, a la técnica de separación cromatográfica, solvente utilizado y a la forma de correlacionar las manchas cromatográficas de cada fosfolípido con

la cantidad de los mismos (planimetría, densitometría o determinación del fósforo inorgánico).

Como ejemplo de esto, tenemos la determinación de lecitina en líquido amniótico. BHAGWANANI y cols. (1972) demostraron que la concentración de lecitina variaba desde 2,0 mg/100ml entre las semanas 14 y 22 de embarazo, hasta 4,0 mg/100ml entre las semanas 34 y 36, y 12,0 mg/100ml a término. Sin embargo, BIEZENSKI (1973), como veíamos antes, determinó concentraciones entre 0,44 mg/100ml en el embarazo temprano y 2,92 mg/100ml al final del mismo. Se puede ver claramente que las concentraciones obtenidas variaban considerablemente.

También comentábamos antes, que la centrifugación y filtración de muestras de líquido amniótico determinan una reducción de los fosfolípidos en el mismo. Además, esta reducción no es proporcional, sino que se reduce selectivamente la proporción de lecitina comparativamente con la esfingomielina (WAGSTAFF y cols., 1974), y así, un índice lecitina/esfingomielina menor a 2 puede inducirnos a pensar en inmadurez cuando ya el feto es maduro desde el punto de vista respiratorio. Asimismo, la contaminación del líquido con sangre puede elevar dicho índice, y así lo demostraron WAGSTAFF y cols. (1974), quienes convirtieron un índice inmaduro en maduro añadiendo sangre total materna o fetal al líquido amniótico, ya que la lecitina procedente de dicha sangre eleva la cantidad total de lecitina.

Por otra parte, se produce un considerable aumento en dicho índice con cantidades crecientes de meconio en líquido amniótico. Esto resulta de gran interés, ya que cantidades de meconio en líquido amniótico de hasta 0,57 g/100ml no son apreciables a simple vista (WAGSTAFF y cols., 1974).

Estos mismos autores demostraron que la conservación del líquido sin centrifugar o a temperatura ambiente, hasta su análisis, reducían considerablemente la producción de lecitina respecto a la de esfingomielina. Como ejemplo de esto, a las 48 horas de su conservación a temperatura ambiente, los valores de lecitina eran de hasta un 26 a 37% menores que los valores iniciales, mientras que la esfingomielina disminuía en un 23%.

Resulta imprescindible, por tanto, tener en cuenta todas estas variables a la hora de determinar el índice lecitina/esfingomielina o la concentración absoluta de uno de los dos en líquido amniótico.

3.5.3. FOSFOLÍPIDOS MENORES

Como su propio nombre indica, tienen mucha menos importancia que los fosfolípidos mayores y hay menor número de estudios realizados acerca de ellos. Como decíamos antes, distinguiamos dentro de los fosfolípidos menores al fosfatidil-inositol, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-serina y fosfatidil-glicerol.

En la síntesis de estos fosfolípidos menores existe una competencia entre el fosfatidil-glicerol y el fosfatidil-inositol. Esto podría conducir a una falta del primero, el cual es un surfactante esencial al final del embarazo. Sin embargo, el organismo obvia este inconveniente disminuyendo la producción de inositol, con lo cual aumenta la síntesis de fosfatidil-glicerol y disminuye la de fosfatidil-inositol en las proporciones adecuadas para que el pulmón fetal madure.

3.5.4. ÁCIDOS GRASOS Y OTROS LÍPIDOS

El hecho de que no exista una técnica efectiva de separación de una lecitina de composición específica de una mezcla de lecitinas, ha desviado la atención hacia la determinación de ácidos grasos derivados de extractos lipídicos de líquido amniótico.

El ácido graso principal en líquido amniótico es el ácido palmítico, y los resultados de su determinación pueden expresarse de diversas formas. Cuando los ácidos grasos derivan de la lecitina, previamente separada de un extracto lipídico por cromatografía en capa fina, los resultados se expresan como el porcentaje de ácido palmítico respecto a la cantidad total de ácidos grasos derivados de la hidrólisis de lecitina. ARVIDSON y cols. (1972) encontraron niveles entre un 64 y 84% de ácido palmítico en lecitina de líquido amniótico a término. Cuando se consideran ácidos grasos derivados de un extracto lipídico total, los resultados pueden ser expresados también como porcentaje de palmitato. SCHIRAR y cols. (1975) encontraron en líquidos amnióticos de más de 36 semanas un porcentaje de ácido palmítico

mayor al 40%, respecto al total de ácidos grasos, con un valor medio de un 51% a término.

Como la proporción de ácido palmítico se correlaciona con la lecitina activa en superficie, la determinación del mismo, por alguna de las formas anteriores, puede servir también como índice de maduración pulmonar fetal. Asimismo, puede utilizarse el índice entre el ácido palmítico y otro ácido graso (índice ácido palmítico/ácido esteárico) para evitar los errores por fluctuación del volumen del líquido amniótico, como ocurre con el índice lecitina/ esfingomielina. El índice ácido palmítico/ácido esteárico se correlaciona bastante bien con el desarrollo pulmonar neonatal (SCHIRAR y cols., 1975), y un índice mayor a 3,5 indica la presencia de lecitina con una configuración madura, predominantemente. Por tanto, esta cifra, así como un índice lecitina/esfingomielina mayor a 2, son indicativos de madurez pulmonar fetal al término del embarazo.

Dentro de los otros lípidos presentes en líquido amniótico destacan las prostaglandinas y el ácido araquidónico (precursor de las anteriores), que han sido comentados al hablar de agentes citotóxicos.

En cuanto a los glicoesfingolípidos, dentro de los cuales se incluyen los gangliósidos, su proporción en líquido amniótico parece ser muy baja si se comparan con los fosfolípidos, los cuales, como hemos visto anteriormente, son los componentes lipídicos principales de dicho fluido.

4. INMUNOLOGIA FETAL

El embarazo se puede considerar como un trasplante semialogénico, ya que la madre y el feto difieren en un haplotipo en relación a sus antígenos de histocompatibilidad (HLA). Esta diferencia, que en la mayoría de los trasplantes clínicos es suficiente para inducir rechazo, no determina este fenómeno en el embarazo. Efectivamente, el feto no es rechazado por la madre como un injerto, aunque exprese antígenos derivados del padre y algunos

otros antígenos frente a los que el sistema inmune materno puede reaccionar (FAULK y cols., 1979; JENKINSON y OWEN, 1980; SUNDERLAND y cols., 1981; CHATTERJEE-HASROUNI y cols., 1983; JOHNSON y MOLLOY, 1983).

Los mecanismos que impiden dicho rechazo no se conocen con exactitud, pero se han apuntado diversas posibilidades. Algunos autores lo han atribuido a una alteración en las subpoblaciones linfocitarias en sangre materna (VANDERBEEKEN y cols., 1982). Así mismo, se ha considerado que algunas hormonas producidas por la placenta pueden tener propiedades inmunomoduladoras (STITES y SIITERI, 1983; CLEMENTS y cols., 1985). Las células del trofoblasto, interpuestas entre la sangre materna y la circulación fetal, han sido involucradas también en el mantenimiento del embarazo, bien por la baja expresión de antígenos de histocompatibilidad (LALA y cols., 1983) o por la producción de factores humorales por las mismas (McINTYRE y PAULK, 1979; CHAOUAT y cols., 1980; HAMAOKA, 1983). También se ha sugerido el paso de células T supresoras desde el feto a la madre a través de la placenta (JACOBY y OLDSTONE, 1983).

Todas estas variaciones determinan una modulación negativa de la respuesta inmune de la madre que protege al feto de la agresión por parte de ésta.

Por tanto, parece claro que el desarrollo de la inmunocompetencia fetal va a jugar un papel importante en el mantenimiento del embarazo.

4.1. DESARROLLO DE LA INMUNOCOMPETENCIA FETAL

El feto fue considerado inmunológicamente incompetente hasta los años 50, en que se dieron a conocer los experimentos realizados por SCHINKEL y FERGUSON (1953) en Australia, demostrando como fetos de cordero podían rechazar aloinjertos de piel en útero.

La inmunocompetencia humoral fetal frente a determinados antígenos se origina precozmente, a pesar del escaso número de células inmunocompetentes y de encontrarse inmaduros los órganos linfoides secundarios, habiéndose sugerido que las células

respondedoras sean las células linfoides del hígado fetal (ROCKLIN y cols., 1979; KAYE, 1980), el cual, según algunos autores, sería en los mamíferos el equivalente de la bolsa de Fabricius (OWEN y cols., 1974).

En fetos de cordero, el aloinjerto de piel es rechazado tan eficientemente como en el adulto, a partir de la mitad de la gestación, lo que nos indica un sistema maduro de células T (SILVERSTEIN, 1972).

Actualmente, se cree que una de las principales funciones del timo es educar a las células precursoras de linfocitos T para distinguir lo "propio" de lo "no propio" (LE DOUARIN y cols., 1984).

Algunos autores creen que la incapacidad de neonatos para responder a algunos antígenos es el resultado de la supresión producida por la Ig G materna, adquirida de forma natural y no por un defecto del sistema inmune neonatal (JONES, 1976). No obstante, otros autores piensan que esta falta de respuesta se debe a una inmadurez de células T (ETLINGER y CHILLER, 1979), células B (CHENG y cols., 1984) o macrófagos (HARDY y cols., 1973) y/o la presencia de células supresoras o factores inmunosupresores.

La Ig G es la única inmunoglobulina materna que es transportada al feto (VIRELA y cols., 1972). Este transporte selectivo es dependiente de la interacción de la región Fc de la molécula de Ig G con receptores Fc_γ (Fc_γR) en células fetales (WILD, 1976; SCHLANOWITZ, 1976; KRAEHEBUHL y cols., 1979).

Existen diversas evidencias de que la mayoría de la Ig G es transportada a través de las vellosidades placentarias, donde las circulaciones fetal y materna están en aposición directa (KING, 1982; CONTRACTOR y cols., 1983). Algunos autores han demostrado que el trofoblasto de las vellosidades placentarias expresa Fc_γR (LIN, 1980; WOOD y cols., 1982). No obstante, parece ser que las vellosidades placentarias contienen varios tipos celulares que expresan Fc_γR con funciones distintas al transporte de Ig G (JOHNSON y cols., 1976; WOOD y KING, 1981; WOOD y KING, 1982; WOOD, 1983), por lo que el mecanismo preciso de este transporte no está bien conocido.

Recientemente, STONE y cols. (1987) han demostrado la habilidad de células del amnios humano para ligar e internalizar Ig G marcada con peroxidasa. Dichas células presentaban Fc_vR, y dichos receptores exhibían una afinidad y una especificidad exquisita por monómeros de Ig G. Otras inmunoglobulinas marcadas no se fijaban a las células del epitelio amniótico. Los receptores Fc_vR estaban localizados tanto en la membrana apical como en la basal de dichas células, por lo que las células amnióticas parecen participar en la fijación, internalización y excreción de los monómeros de Ig G. Estos experimentos de STONE y cols. parecen involucrar al epitelio amniótico como modelo de transporte de Ig G desde la madre hasta el feto.

Otro aspecto de la inmunocompetencia fetal es el desarrollo de su antigenicidad.

Los carbohidratos antigénicos de los eritrocitos sanguíneos que componen el sistema ABO, se detectan desde la 5-6 semana de gestación, pero no alcanzan su madurez hasta los 2-4 años de vida. Estos antígenos están presentes en todas las células somáticas y en ciertas bacterias gram-negativas intestinales, lo que explica la presencia de isoaglutininas en niños de 6 meses o más. Estos hechos también explican el que niños primogénitos puedan ser afectados por la incompatibilidad ABO y que el incremento de la gravedad con subsiguientes embarazos pueda no ocurrir, dado que los eritrocitos fetales son pobremente inmunogénicos y las células somáticas fetales compiten con los anteriores por la Ig G materna anti-ABO fetal (ROCKLIN y cols., 1979).

En cuanto a los antígenos de histocompatibilidad, se han descrito en ratones, aunque con resultados contradictorios, antígenos H-2 en el estadio de mórula y al inicio del estadio de blastocisto (KRCO y GOLDBERG, 1977; HEYNER, 1980). Los antígenos de histocompatibilidad están presentes en los eritrocitos de rata, pero no en el hombre. Estos antígenos se detectan en células mononucleadas de sangre fetal humana (ROSENTHAL y cols., 1983) y anticuerpos frente a ellos se encuentran en el suero del 25% de primigestas, aumentando la incidencia con embarazos sucesivos (VAN DER WERF, 1971; DOUGHTY y GELSTHORPE, 1974). El contacto materno

con las células mononucleadas sanguíneas fetales no es obligatorio para la producción de anticuerpos anti-HLA, pues se han encontrado en suero materno después de embarazos molares (LAWLER y cols., 1974).

4.2. RESPUESTA FETAL FRENTA A LOS ANTIGENOS MATERNOS

Decíamos antes que la Ig G es la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta, pero aparte de ella, la pueden atravesar diversas sustancias, tales como virus, antígenos sintéticos, etc. La posibilidad de que células maternas dirigidas frente al feto atraviesen la placenta es actualmente admitida, ya que linfocitos maternos pueden detectarse durante algún tiempo en recién nacidos normales, como se evidencia por la presencia de linfocitos de cariotipo 46XX en cultivos de células mononucleadas procedentes de sangre de cordón de recién nacido macho (VALNOWSK y cols., 1969; FEDOROVA, 1985). Además, GEHA y REINHERRZ (1983), demostraron que niños con inmunodeficiencia combinada severa eran incapaces de rechazar células B y T maternas transferidas via placentaria, y que dichos linfocitos sobrevivían bastante tiempo en la circulación del niño.

La respuesta fetal frente a los antígenos anteriores va a tener un gran componente inmunosupresor, es decir, el sistema inmune fetal responde a los antígenos, pero de una manera negativa. Esto puede producirse de diversas formas, citando aquí sólo los mecanismos más interesantes.

VAN TOL y cols. (1983) observaron cómo determinadas concentraciones de antígenos, que actuaban sobre células mononucleadas sanguíneas del adulto, provocando un incremento en la respuesta de células formadoras de placas (PFC), al actuar sobre el mismo tipo de células, pero de recién nacidos, producían un descenso en la respuesta de PFC, encontrando el mismo efecto que en adultos con concentraciones menores de dichos antígenos. Estos autores demostraron que el descenso en la respuesta de PFC fue debido a la generación de células T supresoras antígeno-específicas, sin aclarar si fue por un diferente procesamiento y/o

presentación del antígeno por los macrófagos o por propiedad intrínseca de los linfocitos.

La interacción directa de antígeno con células T en ausencia de macrófagos Ia⁺ puede inducir la generación de células T supresoras antígeno-específicas (PIERRES y GERMAIN, 1978). Posteriormente a este hallazgo, se demostró que macrófagos de ratones recién nacidos no presentaban correctamente el antígeno, correlacionándose este defecto con el escaso número de macrófagos portadores de antígeno Ia (LU y cols., 1979, 1980; NADLER y cols., 1980). Recientemente, se ha podido comprobar que la α -fetoproteína, prostaglandinas y determinadas células supresoras, inhiben la expresión de antígeno Ia en macrófagos de ratones (SNYDER y cols., 1982; LU y cols., 1984).

En bazo de ratones neonatos se detectaron diversas células con actividad inmunosupresora (MOISIER y JOHNSON, 1975) y, posteriormente, se demostró que timocitos de neonato constituyen una rica fuente de células supresoras en la síntesis de anticuerpos por células adultas (MOISIER y cols., 1977). Estos autores sugirieron la hipótesis de que células supresoras existentes entre los timocitos corticales externos emigraban al bazo neonatal, donde se detecta una actividad inmunosupresora similar. Células supresoras de bazo de ratón neonato, caracterizadas por anticuerpos monoclonales como Thy 1⁺ y Lyl 1⁺2⁻, inhiben la síntesis de anticuerpos por linfocitos adultos.

Existen diversas opiniones acerca de la célula sobre la cual actuarían estas células supresoras. Algunos autores, encuentran que células T de neonatos pueden ejercer una actividad inhibidora sobre células B que responden a antígenos independientes de células T (MOISIER y cols., 1977; HARDY y MOZER, 1976; DEKRUYFF y cols., 1980). Sin embargo, la síntesis de anticuerpos T-dependientes es bastante más sensible a la supresión por células de neonato o fetales que la síntesis T-independiente (MURGITA y cols., 1978; LUCKENBACH y cols., 1978).

En bazo de ratones neonato, pero no en timo, se detectan células T supresoras que inhiben la reacción injerto contra huésped (SKOVRON-CENDRZAK y PTAK, 1976), reacciones de hipersensibilidad

por contacto (PTAK y SKOWRON-CENDRZAK, 1977). reacción linfocitaria mixta y la generación de células citotóxicas en cultivo linfocitario mixto (ARGYRIS, 1978).

El hígado fetal es un elemento fundamental en el desarrollo de la inmunocompetencia murina. Por ello, se investigó la existencia en él de células inmunosupresoras. GLOBERSON y cols. (1975) demostraron en ratones que células procedentes de hígados fetales o de recién nacidos suprimían la reacción linfocitaria mixta y la generación de lisis mediada por células. Estas células suprimen también la generación de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra sus propios antígenos (MURAOKA y KILLER, 1983).

Recientemente, se ha visto en humanos que la estimulación de células procedentes de hígados fetales, de 8-12 semanas, con diferentes dosis de concanavalina A, generaba una población de células capaces de suprimir el cultivo linfocitario mixto. La supresión sólo se produjo por células estimuladas por concanavalina A (RABINOWICH y cols., 1983).

En humanos, a partir de sangre de cordón de recién nacidos, se han aislado células que inhiben la proliferación (OLDING y OLDSTONE, 1974, 1976) y la síntesis de anticuerpos (OLDSTONE y cols., 1977) por los linfocitos maternos correspondientes. El fenotipo de las células T de sangre de cordón responsable de los efectos anteriores es CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, y estos, para actuar, no necesitan la presencia de células CD8⁺ maternas (JACOBY y OLDSTONE, 1983).

El papel de las células CD8⁺ en sangre de cordón es controvertido. Algunos autores han encontrado actividad supresora en dichas células si ha existido antes proliferación como respuesta a determinados estímulos (FAYWARD y MERRILL, 1981).

La actividad supresora de células mononucleadas de sangre de cordón en recién nacidos, medida a través de la inducción de células supresoras por concanavalina A, se encuentra aumentada respecto a adultos, según algunos autores (POLEVA y TRUNOVA, 1985) o disminuida según otros (DWYER y JOHNSON, 1983).

También se han involucrado a células no-T en el ambiente inmunosupresor fetal. Para la mayoría de los autores, serían

células de estirpe monocítica (HOOPER y MURGITA, 1980; FIGUET y cols., 1981). Entre sus propiedades destacamos la capacidad de inhibir la reacción linfocitaria mixta (HOOPER y MURGITA, 1980) y la inhibición de la expresión de antígenos Ia en macrófagos, mediante la liberación de prostaglandinas (FIGUET y cols., 1981; SNYDER y cols., 1982). DWYER y JOHNSON (1983) demostraron en humanos que las células T de cordón umbilical eran más resistentes a las señales supresoras que las células T del adulto, observando también que células supresoras de sangre de cordón inhiben a células de adulto más intensamente que a células de cordón en la respuesta a fitohemaglutinina. Según estos autores, esto permitiría al feto responder normalmente, mientras que las células maternas, presentes en la circulación fetal, estarían inhibidas.

Así como los aloanticuerpos anti-fetales quedan retenidos en placenta, parte de las células citotóxicas frente al feto pueden atravesarla, como quedó expuesto anteriormente. El feto, para defenderse de dichas células y no resultar dañado, deberá neutralizarlas. Se han aislado en cordón células B capaces de sintetizar anticuerpos (Ig M) contra células T citotóxicas maternas, denominándose anticuerpos fetales humanos anti-células T citotóxicas (TLFA) (MIYAGAWA y cols., 1981, 1982). Se han descrito TLFA frente a células T killer mantenidas en cultivo (MIYAGAWA, 1984). Estas células maternas desaparecen pronto de la circulación fetal tras el alumbramiento, a lo que quizás ayude la existencia de un factor citotóxico para linfocitos encontrado en leche materna (DREW y cols., 1984).

La actividad NK (Natural Killer) en ratones está ausente en células procedentes del hígado fetal y bazo de recién nacidos, pero aparece y aumenta rápidamente a las 3 semanas de nacer. La explicación exacta de por qué no hay actividad NK en estos estudios no se conoce, pero se especula con tres posibilidades: ausencia de células NK en ratones neonatos, existencia de un sistema supresor para células NK, o falta de una regulación adecuada en los niveles de interferón procedentes de macrófagos (MURGITA y cols., 1983).

En humanos, el número de células Leu7⁺ (NK) en sangre de cordón es menor que en adultos, aunque la actividad NK se ha

descrito conservada (FOA y cols., 1984) o disminuida (SAL cols., 1985). Posteriormente, se ha descrito una subpoblación linfocitaria en sangre de cordón con actividad NK, la cual, de los marcadores típicos de estas células (HNK-1, OKM-1) (VI y cols., 1984).

5. FACTORES INMUNOLOGICOS EN LIQUIDO AMNIOTICO

El líquido amniótico constituye un medio ideal para el estudio de la problemática de la inmunología del embarazo, ya que en esta situación en íntimo contacto con la madre y el feto, puede revelar las alteraciones en las moléculas que intervienen en la regulación de dicho proceso.

ABRAMSKY y cols. (1979) demostraron que el líquido amniótico humano inhibía significativamente la reacción in vitro de anticuerpos frente al receptor de acetilcolina procedente de pacientes con miastenia gravis y el antígeno de dichos receptores. Este efecto fue observado con líquido amniótico obtenido durante el segundo trimestre, y se incrementaba desde la semana 16 hasta la 24, para sufrir un descenso posteriormente. Esto sugiere un efecto inhibitorio similar en la reacción in vivo entre anticuerpos maternos anti-receptor de acetilcolina, transferidos a través de la placenta, y dicho receptor en la placa neuromuscular fetal. La presencia de factores inhibitorios feto-placentarios puede explicar el desarrollo de debilidad muscular transitoria después del nacimiento y sólo en una minoría de recién nacidos de madres miasténicas.

Por otra parte, se vio que el líquido amniótico incrementa la emigración de leucocitos (LME: leucocyte migration enhancement) maternos durante el segundo y tercer trimestre de embarazo (GLEICHER y cols., 1979). En un estudio posterior (GLEICHER y cols., 1980), se confirmó lo anterior y se extendió dicho efecto al plasma materno. Estos autores observaron que leucocitos procedentes

de machos, expuestos ante líquido amniótico, mostraron una inhibición en la emigración de los leucocitos (LMI: leucocyte migration inhibition), mientras linfocitos controles procedentes de hembras no embarazadas no mostraron ninguno de los dos efectos (LME o LMI).

Estos resultados se interpretaron como indicativos de un doble mecanismo. Se necesitaría una fracción de Ig G muy específica, la cual, secundariamente, activaría una subpoblación celular específica. El efecto LMI sería entendido como un exceso de antígeno, mientras el efecto LME representaría un exceso de anticuerpos. No se encontraron, por otra parte, complejos inmunes ni en plasma ni en líquido amniótico de embarazadas, y esto excluía la posibilidad de una influencia directa de tales complejos inmunes sobre la emigración de leucocitos en el sistema anterior (GLEICHER y cols., 1978).

Del mismo modo que ABRAMSKY y cols. (1979), GLEICHER y cols. (1980) encontraron que el líquido amniótico del segundo trimestre mostraba los resultados más significativos. Sin embargo, el grupo de ABRAMSKY no demostró la misma actividad en plasma materno, quizás porque usaron un factor de dilución mayor para el suero o porque la actividad bloqueante durante el embarazo se encuentra en plasma más que en suero (McINTYRE y PAGE, 1979).

A pesar de estos descubrimientos, la actividad inmunológica del líquido amniótico permanece aún poco entendida. ABRAMSKY y cols. (1979) eligieron a la alfa-fetoproteína (AFP) como la sustancia inmunosupresora en líquido amniótico. Sin embargo, mientras los niveles de AFP descienden en líquido amniótico conforme avanza la edad de gestación, del mismo modo aumentan en suero materno, por lo que debía esperarse el mismo efecto con suero materno en la edad gestacional más tardía. El suero del cordón no presentaba actividad inhibitoria, como cabría esperar si la AFP jugase un papel significativo en el proceso inhibitorio. Por otra parte, SUZUKI y TOMASI (1980) han demostrado que tanto el líquido amniótico como la AFP presentan un efecto bifásico, y así, pequeñas concentraciones de los mismos pueden estimular la proliferación de

células T, mientras que altas concentraciones de los mismos inhiben dicha proliferación.

Los antígenos embriogénicos fetales pueden jugar un papel importante en la inducción de tolerancia. Estos antígenos se encuentran en el embarazo y en procesos malignos, dos condiciones biológicas en las que el tejido antigénico es tolerado por un sistema inmune aparentemente normal. Sin embargo, es probable que su participación no sea por una actividad bloqueante directa, sino por inducción de ciertas subpoblaciones celulares, las cuales, causan una actividad inhibitoria. El bloqueo competitivo de los receptores de acetilcolina por inmunoglobulinas producidas de esta manera podrían explicar los descubrimientos de ABRAMSKY. Tales inmunoglobulinas podrían ser maternas o fetales, y representar una fracción mínima de un grupo mayor de inmunoglobulinas obtenidas al fraccionar el líquido amniótico.

Otros hallazgos inmunológicos de interés en líquido amniótico, son la presencia de alfa-interferón (LEBOW y cols., 1982), así como la neutralización del virus herpes simple por anticuerpos detectados en dicho medio (BRADLEY y cols., 1982).

También, el líquido amniótico ha demostrado la capacidad de suprimir la actividad NK a través de un bloqueo de la capacidad lítica de células NK activadas, sin afectar a las células NK inactivadas (pre-NK) (TODER y cols., 1984).

Por otra parte, se han encontrado propiedades inmunológicas en el líquido amniótico de ratón (MAF: mouse amniotic fluid). HOFFMAN y cols. (1978) examinaron la proliferación de células esplénicas de ratones neonatales en presencia de MAF. Las células neonatales fueron estimuladas considerablemente hasta la edad de 20 días. Las células con más de 20 días de edad eran inhibidas por las mismas muestras de MAF. Estos autores insinuaron que podría haber dos tipos de factores en el MAF, uno estimulador y otro inhibidor, y que las células neonatales eran relativamente más sensibles al factor estimulador.

TOMASI y cols. (1977) demostraron que la administración de altas concentraciones de MAF a animales adultos suprimía la aparición directa de células sintetizadoras de inmunoglobulinas,

también llamadas células formadoras de placas (PFC: plaque forming cells), tras la estimulación con hematíes de carnero. Atribuyeron este efecto a la AFP y comprobaron que los niveles de la misma en estos ratones adultos eran ligeramente más altos que aquellos encontrados en el animal embarazado, pero sólo 1/10 parte de los encontrados en el neonato. La supresión ocurría para diversas dosis de hematíes de carnero, pero era más evidente para dosis subóptimas.

Otro efecto del líquido amniótico de ratón es el demostrado por GAMBEL y FERGUSON (1982). Estos autores comprobaron que el MAF inhibía potentemente la generación in vitro de una respuesta citolítica mediada por células T hacia las células tumorales alogénicas EL4.

Como resumen de todas estas actividades, podemos decir que todas ellas, tanto en líquido amniótico humano como de ratón, concuerdan en la actividad inmunorreguladora de este fluido, y la mayoría suelen atribuir esta actividad a la alfa-fetoproteína (AFP). No obstante, últimamente se le está dando gran importancia en la regulación inmunológica del embarazo a factores solubles que son secretados por la placenta y que, probablemente, estén presentes en el líquido amniótico además de en la circulación fetal.

Recientes investigaciones han revelado la importancia del tejido decidual como una interfase inmunológica feto-materna. Se ha referido que el sobrenadante de cultivo de células deciduales murinas (KIRKWOOD y BELL, 1981; BADET y cols., 1983a; BADET y cols., 1983b) suprimía la reacción linfocitaria mixta (MLR), y que explantes de decidua humana liberaban un factor que suprimía dicha reacción (GOLANDER y cols., 1981). Asimismo, células purificadas del estroma decidual inhibían la MLR cuando se añadían a los cultivos (LALA y KEARNS, 1985; NAKAYAMA y cols., 1985; PARHAR y LALA, 1985) y células pequeñas (linfocitos no-T) del tejido decidual suprimían la generación de linfocitos T citotóxicos (SLAPSYS y CLARK, 1982; SLAPSYS y CLARK, 1983; CLARK y cols., 1984a; CLARK y cols., 1984b; CLARK y cols., 1985; DAYA y cols., 1985).

Sin embargo, la naturaleza y el mecanismo de inmunosupresión por células deciduales no se conoce bien, por las dificultades en obtener una suficiente cantidad de estas muestras. Si es que estos factores se encuentran en cantidades apreciables en líquido amniótico, como decíamos antes, éste puede constituir un medio ideal para su estudio.

FATSUMI y cols. (1987) han demostrado que el sobrenadante de cultivo de la línea celular TTK-1, establecida a partir del tejido decidual humano (TATEYAMA y cols., 1984), contiene un factor que suprime potentemente la reacción linfocitaria mixta (MLR). Este factor parecía ser una molécula protéica, por su inestabilidad al calor y por su peso molecular estimado entre 43 y 67 kd.

El sobrenadante de TTK-1 también suprimía la proliferación de líneas celulares T interleukina-2 dependientes, pero no suprimía la de líneas celulares T interleukina-2 independientes. Esto sugiere que uno de los mecanismos de supresión de la MLR por este factor es la inhibición de la acción de la interleukina-2.

Otras experiencias recientes (SAJI y cols., 1987) han demostrado que las células del trofoblasto cultivadas secretan un factor soluble que tiene un efecto inmunosupresor sobre la respuesta linfocitaria in vitro. Este factor puede interaccionar con linfocitos maternos en la interfase materno-fetal previniendo su activación y proliferación. Su actuación sobre los linfocitos T parece ser en la fase de reconocimiento y proliferación bloqueando el brazo aferente de la respuesta inmune celular. Además, el sobrenadante de trofoblasto suprimía la actividad celular NK in vitro.

Por tanto, los resultados de SAJI y cols. parecen indicar un papel importante para un factor soluble secretado por células del trofoblasto en prevenir la destrucción del embrión al comienzo del embarazo.

En cuanto a la naturaleza de dicho factor, no se conoce muy bien, pero podría ser un homólogo humano de los factores trofoblásticos murinos referidos por GUPTA y cols. (1984) y DUC y cols. (1985). Sin embargo, no se ha determinado si los factores

trofoblásticos murinos son secretados a partir de cultivos primarios de células de trofoblasto in vitro.

Por otra parte, algunas de las hormonas producidas por la placenta han mostrado tener propiedades inmunorreguladoras. La progesterona (CLEMENTS y cols., 1985), así como la gonadotropina coriónica humana (HCG) (ADCOCK y cols., 1973), prostaglandinas (CLARK, 1985) y varios polipéptidos (JACOBY y cols., 1984) pueden inhibir la respuesta linfocitaria in vitro. Sin embargo, SAJI Y cols. (1987) han examinado la concentración de estas hormonas en los sobrenadantes de trofoblasto y han comprobado que esta concentración es mucho menor que la necesaria para causar inmunosupresión in vitro, por lo que su factor soluble no parece identificarse con ninguna de estas hormonas.

No se sabe con exactitud si otros componentes asociados al embarazo, con probable actividad inmunosupresora, tales como la β_1 -glicoproteína específica del embarazo (SP1), la proteína A plasmática asociada al embarazo, o la α_2 -glicoproteína asociada al embarazo, existen en sobrenadante de trofoblasto. No obstante, hay resultados contradictorios sobre la actividad inmunosupresora de las glicoproteínas in vitro (STIMSON, 1980; MUCHMORE y cols., 1985).

Por tanto, la identidad del factor identificado por SAJI y cols., (1987), al igual que los anteriores, se desconoce aún, pero parece estar claro que el efecto local protector de las células del trofoblasto y de la placenta frente al rechazo aloinmune juega un papel importante en los mecanismos múltiples protectores del embarazo.

6. FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL LIQUIDO AMNIOTICO

Pocos estudios se han llevado a cabo para intentar identificar factores de crecimiento celular en líquido amniótico. No obstante, recientemente se ha detectado la presencia de dos de estos factores denominados "insulin-like growth factors (IGFs) I y II" (MERIMBE y

cols., 1984). Además se ha demostrado que ambos factores están ligados a una proteína de un peso molecular entre 40 y 45 Kd.

La concentración de IGF-I, el cual es idéntico a la somatomedina C, permanece constante a lo largo del embarazo, siendo aproximadamente de 20 ng/ml. Por contra, la concentración de IGF-II varía a lo largo de la gestación, siendo de 114 ng/ml entre las semanas 15 y 20, de 111 ng/ml entre las semanas 26 y 33 y de 65 ng/ml entre las semanas 38 y 40. En los dos primeros periodos la concentración de IGF-II permanece más o menos constante, a pesar de un gran descenso en la concentración de proteínas totales en líquido amniótico (5,2 mg/ml en el primer periodo y 2,3 en el segundo periodo). Sin embargo, en el último periodo ocurre un gran descenso en la concentración de IGF-II sin un descenso posterior en la concentración de proteínas. Por tanto, las variaciones de IGFs no se pueden achacar a la variación en la concentración de proteínas en líquido amniótico.

Estos resultados indican que existe un control dinámico de IGFs en líquido amniótico a lo largo del embarazo normal y, posiblemente, este control se extienda a otros muchos factores de crecimiento aún no detectados.

Hay que destacar también, que muchos efectos inmunorreguladores pueden ser entendidos como reguladores del crecimiento celular en general, es decir, que aunque sean detectados en células inmunes, no se restringen a las mismas, sino que el espectro de acción de estos efectos reguladores se extiende sobre otros muchos tipos celulares.

Un ejemplo de esta interrelación lo constituye la regulación de la producción de γ -interferón por diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FDGF) (JOHNSON y TORRES, 1985). Estos factores de crecimiento tienen propiedades inmunorreguladoras al reemplazar completamente las necesidades de interleukina-2 (factor regulador característico de células inmunes) en la producción de γ -interferón por parte de las células T

colaboradoras, pero al mismo tiempo, estos factores poseen un marcado efecto estimulador de la proliferación celular.

Por todas estas razones, consideramos imprescindible hacer un estudio amplio del crecimiento celular y de los factores reguladores del mismo dentro de esta introducción.

II. CRECIMIENTO CELULAR

1. GENERALIDADES

El estudio del crecimiento y maduración de tejidos normales y malignos, así como la respuesta de ambos ante agentes citotóxicos o citostáticos, requiere un conocimiento previo de la cinética y ciclo de replicación celular.

Tanto en tumores como en tejidos normales existe nacimiento y muerte celular. No obstante, las células de tejidos normales proliferan hasta obtener un tamaño fisiológicamente útil. Para mantener este tamaño útil, la muerte de las células normales igualará el nacimiento de éstas.

El control de los tejidos normales en situación estable no está bien conocido, pero dicho control puede ser positivo (estimulador), o negativo (inhibidor); humoral y efectivo a gran distancia (hormonal); por sustancias liberadas localmente (chalonas) o relacionadas con el contacto (inhibición por contacto o estimulación por la matriz producida por la célula).

En contraste con las células normales, en las células tumorales el nacimiento sobrepasa a la muerte celular; es decir, un tumor maligno es una población celular en incremento constante, hasta la muerte del portador.

Esto no implica que la tasa de proliferación en la célula tumoral sea muy superior a la de tejidos normales, ya que se ha observado que la proliferación de las células tumorales nunca excede a la tasa de crecimiento máximo de sus tejidos normales homólogos, e incluso, es inferior a la de tejidos embrionarios, hígado en regeneración o epitelio de la mucosa intestinal (SHAPOT, 1980).

2. CRECIMIENTO EN TEJIDOS NORMALES

2.1. ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE TEJIDOS NORMALES

Desde un punto de vista cinético, los tejidos normales en situación estable pueden dividirse en tres categorías:

A.- Tejidos con recambio celular o de renovación.

Están en constante proliferación para reemplazar a las células con una vida de duración limitada. Hay un alto índice de nacimiento y muerte celular. Ejemplos de éstos los encontramos en la piel, mucosas, sangre y células germinales.

B.- Tejidos no proliferativos o estáticos.

En estos tejidos no hay reemplazo celular por muerte de las células. El número de éstas no se incrementa durante la vida del individuo. Como ejemplo tenemos a las células neuronales y músculo estriado.

C.- Tejidos con poca o ninguna actividad proliferativa (de expansión).

Son tejidos que crecen hasta que el individuo es adulto, o bien, cuando existe una gran mortalidad celular. Músculo liso, tejido glandular, tejido conectivo, parénquima hepático y riñón son ejemplos de ello.

2.2. QUIESCENCIA Y PROLIFERACION CELULAR. "STEM CELLS"

La mayoría de las células "in vivo" se hallan en un estado quiescente (en reposo) y sólo una mínima parte de la población celular, entre ella, las células madre (stem cells), proliferan.

Las células quiescentes pueden permanecer en este estado, bien porque fisiológicamente no están capacitadas para abandonarlo (ej.: neuronas) o si lo están, no proliferan por encontrarse en una situación estable.

La quiescencia es un estado especial denominado G_0 que es diferente de cualquier estado de las células en crecimiento (EPIFANOVA, 1977). Las células madre se encuentran en situación activa, al menos en los tejidos de renovación y expansión. En los

tejidos estáticos es poco probable que existan células madre, y si es así, permanecen inactivas.

Algunas de las características generales de las células madre son las siguientes:

- Células no diferenciadas.
- Intensa capacidad proliferativa.
- Capacidad para dividirse durante toda la vida del sujeto.
- Posibilidad de autoperpetuarse y diferenciarse.

La proliferación de las células madre, como acabamos de decir, va dirigida en el sentido de autoperpetuarse y diferenciarse. En el primer caso, la célula madre entra en el ciclo de replicación celular, reproduciéndose a sí misma, para mantener un estado de reserva constante. En el segundo caso, proliferaría hacia una célula diferenciada (adulto) con el fin de reponer a otra que ya ha muerto o como respuesta a una necesidad fisiológica (proliferación de fibroblastos después de una herida, aumento del número de eritrocitos bajo una disminución de la presión de O₂ en los ascensos o altitudes, etc.).

Evidentemente, un mecanismo regulador finamente ajustado está involucrado en el mantenimiento de este balance (McCULLOCH, 1975; HELLMAN y cols., 1978).

Cuando las células madre evolucionan para diferenciarse, lo hacen siguiendo una serie de etapas. Partiendo de un estado elemental (inmaduro), con baja actividad proliferativa y en el cual la célula madre se autoperpetúa, se llega a un primer estado de diferenciación al que se le denomina "célula madre comprometida", de gran proliferación. Después, continúa su maduración a través de una serie de etapas sucesivas, hasta que se origina una célula adulta funcionante. Esta célula, que desarrollará su función hasta que muera, no suele dividirse. Sin embargo, éste no es el caso de las células inmunes específicas, que una vez que han madurado, al conectar con el antígeno, proliferan de nuevo alcanzando estadios posteriores de diferenciación celular.

3. CRECIMIENTO EN TEJIDOS TUMORALES.

La característica fundamental de cualquier célula tumoral es la de presentar una disregulación de su proliferación, aunque con esto no queremos decir que la tasa de proliferación en la célula tumoral sea muy superior a la de los tejidos normales, como veíamos antes.

Un tumor se desarrolle utilizando recursos del huésped, pero su crecimiento no está en absoluto relacionado con los requerimientos del mismo, perdiéndose toda posibilidad de homeostásis sobre las células tumorales y quedando éstas en una situación autónoma.

3.1. CELULAS MADRE (STEM CELLS) EN EL CANCER

Desde el punto de vista de los patólogos, el concepto de malignidad va íntimamente unido al de indiferenciación celular. Hasta hace poco, se ha venido pensando que cualquier célula del organismo, diferenciada o no diferenciada, podía transformarse neoplásicamente. Para el caso de transformación de una célula diferenciada, se suponía que esta sufría un proceso de dediferenciación. Actualmente, este punto de vista está desechado y se sabe, hoy en día, que las auténticas diana de la carcinogénesis son las células madre. Estas células madre transformadas pueden a su vez diferenciarse, más o menos, siguiendo los pasos fisiológicos de la diferenciación normal, aunque manteniendo su estado de transformación maligna.

3.2 TRANSFORMACION NEOPLASICA "IN VIVO"

Como ya hemos comentado, la carcinogénesis en humanos, y también en animales, está íntimamente relacionada con el desarrollo de una serie de defectos en la célula madre. Este proceso consta de dos fases: iniciación y promoción (BERENBLUM, 1982).

La célula madre es iniciada por carcinógenos químicos, físicos o por ciertos virus. Esta iniciación, que ocurre en un corto

intervalo de tiempo, es un proceso que produce una lesión irreversible en el DNA de la célula madre, que la hace susceptible a la acción de un agente promotor; es decir, se induce un cambio por el que la célula queda predispuesta a la transformación maligna. A nivel clínico se conoce esta situación como un estado preneoplásico, displasia severa o carcinoma "in situ", alteraciones que pueden persistir durante muchos años antes de convertirse en tumores.

Para que la transformación neoplásica ocurra, las células iniciadas deben estar expuestas a un agente promotor. La promoción ocurre en un período de tiempo más prolongado y necesita repetidas exposiciones a dicho agente.

Estos promotores no son por sí mismos mutagénicos y no inducen tumores, pero sí son mitogénicos (COLBURN, 1980), pudiendo producir hiperplasias y tumores benignos (BOUTWELL y cols., 1982). Su acción es reversible y se debe alcanzar un determinado umbral de dosis. Se han incluido en este grupo diversos compuestos, entre los que se encuentran la sacarina y el fenobarbital.

Algunas investigaciones (JAMES y BRADSHAW 1984; MASSAGUE, 1984) han indicado que los factores de crecimiento, y en concreto algunos factores polipeptídicos, pueden actuar como agentes promotores.

3.3 TRANSFORMACION NEOPLASICA "IN VITRO"

Los estudios en cultivo de las células tumorales han sido los que nos han proporcionado la mayor parte de los conocimientos que tenemos sobre éstas: capacidad de proliferar, actividad metabólica, transformación "in vitro" de células normales en células tumorales, etc.

El concepto de malignidad "in vivo" está más o menos delimitado; depende de la capacidad invasiva o metastatizante del tumor. Sin embargo, es difícil equiparar este concepto "in vitro".

Los investigadores continuamente están buscando una característica que al aparecer en una célula estudiada "in vitro", la pueda definir indistintamente como maligna. Sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado una característica claramente

diferenciadora. No obstante, existen una serie de propiedades que por sí solas no definen a una célula como tumoral, pero que en conjunto, nos permiten, muy aproximadamente, definirla como tal.

En un cultivo de tejido normal se observan las siguientes características:

- Las células tienen un crecimiento limitado (C.L.+): las células se dividen durante un cierto tiempo y después dejan de hacerlo.

- Tienen inhibición por contacto (I.C.+): las células dejan de dividirse al hacerse confluentes.

- A excepción de las células hematopoyéticas, que crecen en suspensión, las células normales crecen en monocapa (A.D.+; anclaje dependientes).

- Las células se mantienen euploides (2N+).

- Cuando son inoculadas en el animal de origen, su proliferación es controlada por los mecanismos homeostáticos del organismo (T-: no tumorigénicas).

Un ejemplo puede ser los fibroblastos humanos, que en cultivo conservan las características indicadas, dividiéndose durante 50 generaciones, para cesar al final en su crecimiento (HAYFLICK y MOORHEAD, 1961).

Algunas células normales en cultivo pasan a un estado de inmortalización, multiplicándose indefinidamente (C.L.-). Estas células son (A.D.+), (2N-), (I.C.+ y (T-). Pueden considerarse como células iniciadas. Los fibroblastos de ratón tienen facilidad de inmortalizarse en cultivo (TODARO y GREEN, 1963).

La acción de ciertas sustancias químicas y ciertos virus sobre células iniciadas pueden conducir a un estado avanzado de iniciación, siendo sus características más importantes: (I.C.-), (C.L.-), (A.D.+), (2N-) y (T-) (STILES y cols., 1976).

El siguiente estadio es la transformación neoplásica, en la que la célula transformada tiene: (C.L.-), (I.C.-), predominantemente (A.D.-), aunque hay células transformadas que suelen tener un cierto anclaje (A.D.+ y, fundamentalmente, producen tumores "in vivo" al ser inoculados en el receptor apropiado (T+) (PASTAN, 1979).

Todas estas características pueden identificar a una célula como tumoral.

4. EL CRECIMIENTO EN LA CELULA

4.1. FASES DEL CICLO DE CRECIMIENTO CELULAR

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 aplicadas "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 (1951), usando ^{32}P como marcador de las células que sintetizaban DNA. La timidina tritiada (^3H -Timidina) ha reemplazado posteriormente a este marcador.

Al ciclo celular lo podemos dividir en cuatro fases separadas.

Una fase de duración muy variable de unas células a otras (BASERGA, 1965), llamada G_1 (presíntesis). Es una fase sometida a un control específico del crecimiento. Es en esta fase donde las condiciones externas determinarán si la célula se mantendrá en el ciclo replicativo, se diferenciará o entrará en reposo.

Le sigue una fase de síntesis (S), cuya duración varía entre 8 y 30 horas, tanto en tejidos normales como malignos.

Una fase posterior es la G_2 , que es una fase de crecimiento cuya duración, determinada con poca precisión, es corta (alrededor de 1 hora).

Tenemos por último la fase M (fase mitótica), que en mamíferos suele ser corta (entre 0,5 y 1,5 horas).

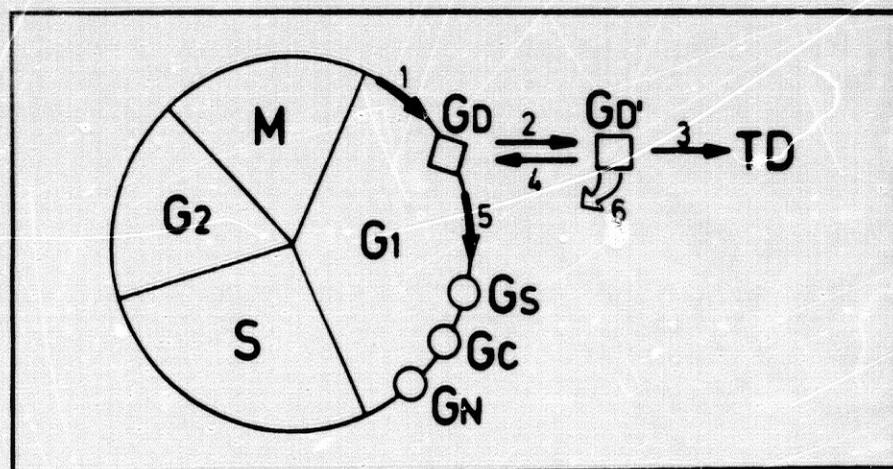
La fase M puede ser identificada en el microscopio óptico y la fase S por incorporación de ^3H -Timidina. Las fases G_1 y G_2 son los periodos entre S y M.

El término G_0 ha sido introducido para designar aquellas células que están en reposo, fuera del ciclo, pero que son incapaces de ser incorporadas al mismo (PRESCOTT, 1976; BROOKS y cols., 1980).

Algunos autores creen que la fase G_1 no es tan variable, sino que las medidas incluyen tanto a las células que se hallan en G_1 como a un número variable de células en G_0 .

Según SCOTT y cols. (1982a, 1984), que trabajaron con el sistema de proadipocitos 3T3, se pueden definir 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 .

FIGURA 1: Fases del ciclo celular (según SCOTT y col., 1984).



G_D es la primera etapa de G_1 , donde se regula el control de la proliferación y diferenciación celular. Aquí las células pueden permanecer quiescentes, reiniciar la proliferación o diferenciarse. A continuación, se encuentran los estadios G_S y G_C , donde la célula

es susceptible a la regulación por factores de crecimiento. Por último, se encuentra la etapa G_N , donde la célula presenta sensibilidad a nutrientes tales como isoleucina.

En el estadio G_0 encontramos a su vez varias etapas (Fig. 1, según SCOTT y cols., 1984).

Las células ejecutan una parada en la fase G_0 (flecha 1). Aquí, pueden permanecer en reposo, reiniciar la proliferación (flecha 5), o diferenciarse (flechas 2 y 3). Si ocurre la diferenciación, las células se salen del ciclo llegando a un estadio G_0' (flecha 2), en el que las células están diferenciadas, pero no totalmente. Este es un nuevo punto de control de la proliferación, donde las células pueden diferenciarse totalmente hacia el estadio TD (flecha 3), reiniciar la proliferación (flecha 6), desdiferenciarse volviendo al estadio G_0 (flecha 4), o bien permanecer quiescentes.

Existen factores fisiológicos y farmacológicos que regulan la proliferación y diferenciación a nivel G_0 (SCOTT y cols., 1982b; WIER y cols., 1983). Determinados factores de crecimiento pueden estimular la proliferación de células en reposo (G_0 ó G_0'). Además, se ha encontrado que ciertas vitaminas y drogas pueden inducir a las células en G_0' a que pierdan su diferenciación regresando a G_0 (SCOTT y cols., 1982b; YUN 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 controles del crecimiento a nivel de G_S , G_C ó G_N , son como procesos salvavidas que previenen a los proadipocitos para crecer en condiciones adversas (masificación o medio ambiente deficiente en factores de crecimiento o nutrientes).

SCOTT y cols. (1984) encontraron que mientras las células 3T3 normales tenían capacidad de parar en el estadio G_0 , diferenciarse, así como detenerse en los estadios G_C , G_S y G_N , las 3T3 transfectadas no podían parar en G_0 , diferenciarse, ni detenerse en G_C , pero sí podían efectuar paradas en G_S y G_N .

Observaron que ciertos clones de estas células, que tenían solamente un defecto en el paro en G_0 y diferenciación, no eran

células transformadas o tumorales, pero tampoco eran células tumorales aquellos clones, que presentando capacidad de paro en G₀ y diferenciación, tenían, sin embargo, algún defecto en algunos de los otros estadios de G₁.

La conclusión más inmediata es que para que una célula sea transformada o tumoral, debe de presentar no sólo un defecto en el paro en G₀ junto con un defecto en la diferenciación, sino además, en uno o más del resto de las etapas de G₁.

Se puede considerar, por tanto, que durante el proceso de iniciación de la carcinogénesis ocurrirían uno o más defectos a nivel de G₀ ó G₀, mientras que durante la promoción se desarrollarían alteraciones en los estadios G_s, G_c y G_n.

4.2. BIOQUIMICA 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 G₁, S y G₂; el grado de síntesis disminuye en G₂, 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 (RATTLE y cols., 1978).

La síntesis de DNA, al igual que las histonas, ocurre solamente durante la fase S. Una rápida incorporación de ³H-Timidina 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 contendrían unidades de replicación (replicones) que se duplicarían en diferentes momentos de la fase S. Por tanto, deben 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, cesando en la mitosis. 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 del mismo aumenta en pocas horas. Una fuerte inhibición de la síntesis de RNA bloquea la entrada de estas células estimuladas en la fase S, aunque algunos datos indican que no es esencial la presencia de nuevo RNA ribosómico (KLEIN, 1982).

Varios autores (BASERGA, 1985; PARDEE, 1985; CAMPISI y cols., 1986; PARDEE, 1987) han estudiado con detalle los acontecimientos bioquímicos, localizados en puntos definidos del ciclo celular, que parecen intervenir en el control del crecimiento.

Un paso fundamental en dicho control ocurre previamente a la entrada de las células en la fase S. Este paso parece regular, no sólo el comienzo de la síntesis de DNA, sino otros procesos que tienen lugar simultáneamente, tales como síntesis de histonas y enzimas específicas involucradas en la síntesis de DNA (ej.: timidina-kinasa). Las células están obligadas a completar la duplicación de su DNA aproximadamente dos horas antes del establecimiento de la fase S. Llegadas a este punto (punto de restricción), las células pueden continuar sintetizando DNA en ausencia de factores de crecimiento externos. Por tanto, la proliferación es controlada por procesos que ocurren durante la fase G₁, más que durante la fase S, G₂ ó M del ciclo celular. Los últimos estadios del ciclo son terminales y necesarios para la producción de una nueva célula, pero los procesos moleculares reguladores de dicha producción parecen ocurrir en G₀ y G₁.

Numerosos experimentos usando inhibidores han demostrado que la síntesis de proteínas es esencial para el tránsito del ciclo celular (CHAUDHURI y LIEBERMAN, 1968; TURNER y GARLICK, 1974;

RUDLAND y JIMENEZ DE ASUA, 1979; WASSERMAN y cols., 1982; WINKLER y cols., 1985). Las células deben ser capaces, no sólo de sintetizar proteínas, sino también de hacerlo rápidamente. Este requerimiento es específico para el período G₁ del ciclo celular. La sensibilidad particular a inhibidores de la síntesis proteica durante G₁, sugiere la idea de que una proteína inestable con una corta vida media (2,5 horas) es esencial para iniciar la fase S (SCHNEIDERMAN y cols., 1971; BROOKS, 1977; ROSSOW y cols., 1979).

Por otra parte, se ha demostrado que las condiciones que inhiben preferentemente el crecimiento de células no transformadas son aquéllas que limitan la síntesis proteica, tales como la falta de aminoácidos esenciales (PARDEE, 1974). Estos resultados sugieren que la proteína inestable esencial para iniciar la fase S del ciclo, de la cual hablábamos antes, puede tener una estabilidad incrementada en células transformadas (ROSSOW y cols., 1979; CAMPISI y cols., 1982; CAMPISI y PARDEE, 1984).

Por tanto, las células normales necesitarían una cantidad crítica de una proteína particular que es bastante inestable (con una vida media de unas 2,5 horas), para pasar el punto de restricción. Las células tumorales tendrían esta proteína estabilizada o en exceso, y esto, les permitiría escapar del control del crecimiento.

Varios estudios (SHILO y cols., 1979; POPOLO y ALBERGUINA, 1984; POPOLO y ALBERGUINA, 1986) han apuntado el papel central de una proteína lábil, que actúa específicamente al comienzo de la síntesis de DNA, regulando la progresión de células a través del ciclo. Sin embargo, esta proteína no se ha identificado aún. Los estudios anteriores han permitido establecer tres características fundamentales de dicha proteína:

- a) Debe ser producida en la fase G₁ del ciclo celular.
- b) En células normales, esta proteína debe ser inestable, con una vida media de 2 a 3 horas.
- c) La proteína debe estar alterada en células transformadas, de tal forma, que su estabilidad aparente esté incrementada.

CROY y PARDEE (1983) encontraron una proteína que cumplía estas características, y la llamaron p68, porque tenía un peso molecular de 68000.

La producción de cantidades adecuadas de proteína(s) lábil(es), incluyendo p68, ocurre durante las primeras cuatro horas del periodo G₁. La síntesis de esta proteína(s) requiere la presencia de factores de crecimiento (CAMPISI y cols., 1984a; ZETTERBERG y LARSSON, 1985) y es bloqueada por inhibición suave de la síntesis proteica. Se ha encontrado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) parece ser esencial para los acontecimientos iniciales de G₁. Sin embargo, el factor de crecimiento insulínico I (IGF-I) es el principal para las células murinas durante el último periodo de G₁, puesto que estas células pueden progresar durante 6 horas dentro de la fase S con aportes exclusivos de IGF-I (LEOF y cols., 1982; CAMPISI y PARDEE, 1984).

Relativamente poco se conoce acerca de los procesos específicos que ocurren en el periodo de 6 horas previo a la síntesis de DNA, excepto que durante este tiempo, el oncogén "ras" es activado (CAMPISI y cols., 1984b) y parece ser esencial para la progresión celular (MULCAHY y cols., 1985). También, excepto para la producción de la proteína p68, las diferencias durante este periodo entre células normales y cancerosas permanecen bastante desconocidas.

Los requerimientos metabólicos celulares cambian dramáticamente aproximadamente 2 horas antes del comienzo de la fase S (TEMIN, 1971; CAMPISI y cols., 1982; ZETTERBERG y LARSON, 1985). A partir de este punto, que como decíamos antes se llama punto de restricción, no se requieren factores séricos de crecimiento para completar el ciclo, ni ocurre una rápida síntesis protéica (CAMPISI y cols., 1982). Durante este periodo de 2 horas, que transcurre entre la pérdida de la dependencia sérica y el comienzo de la fase S, se producen enzimas que son necesarias para la síntesis de DNA, las cuales, se ensamblan en un complejo multienzimático que funciona para dar lugar a dicha síntesis.

La fase S no es sincrónica simplemente con la síntesis de DNA, sino que varios procesos más o menos estrechamente acoplados

ocurren al mismo tiempo (COPPOCK y PARDEE, 1985; YANG y PARDEE, 1986). Por ejemplo, la síntesis de histonas comienza con la síntesis de DNA y está estrechamente ligada a la misma, primariamente a través de cambios en la estabilidad del RNA mensajero (RNAm) de histonas (SITTMAN y cols., 1983). Si la síntesis de DNA es bloqueada por un inhibidor, el RNAm cae muy rápidamente y la síntesis de histonas se interrumpe temporalmente.

Algunas de las enzimas involucradas en la síntesis de DNA se incrementan bruscamente al comienzo de dicha síntesis. Por ejemplo, la actividad de la timidina-kinasa aumenta al menos 40 veces durante la fase S. Al comienzo de esta fase, hay un incremento del RNAm para dicha enzima, que se debe a un incremento en la cifra transcripcional y a un descenso en la cifra de degradación.

SEKI y MOLLER (1976) y VISHWANATHA y cols. (1986) han sugerido que el DNA es sintetizado en las células eucarióticas por un complejo multienzimático, más que por enzimas solubles. Posteriormente, se ha extendido este concepto, incluyendo no sólo enzimas involucradas en la síntesis de DNA, tales como DNA- α -polimerasa, topoisomerasas, etc., sino también enzimas de la síntesis de precursores de DNA, incluyendo ribonucleótido-reductasa, timidina-kinasa, timidilato-sintetasa y otras (REDDY y PARDEE, 1980). Todas estas proteínas forman parte de un gran complejo, denominado "replitasa" (NOGUCHI y cols., 1983). Este complejo tiene un peso molecular de alrededor de 5 millones, que corresponde aproximadamente al de un ribosoma.

El complejo está presente en las células en la fase S, pero está ausente de células en la fase G₁ (REDDY y PARDEE, 1980). Sin embargo, varias enzimas pueden estar presentes durante la fase G₁, localizadas en el citoplasma. Parece ser que el ensamblaje del complejo "replitasa" ocurre durante el período de 2 horas existente entre el punto de restricción y el comienzo de la fase S, y el complejo, una vez ensamblado, permite la síntesis de DNA.

Todos estos datos sugieren la importancia de un estado dinámico en la síntesis de DNA, y por tanto, en la regulación del crecimiento celular, lo mismo que ocurre en biología con la regulación a otros niveles.

4.3. PROCESOS BIOQUIMICOS INTRACELULARES DURANTE LA ESTIMULACION DEL CRECIMIENTO

El crecimiento de la célula normal "in vivo" e "in vitro" depende, principalmente, de factores externos (GOSPODAROWICZ, 1975; SATO y ROSS, 1979). 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. A continuación, vamos a 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.

Diversos trabajos realizados sobre la estimulación de linfocitos por mitógenos o antígenos, nos pueden llevar a resumir las secuencias bioquímicas en las siguientes etapas: recepción de la señal, alteraciones de la membrana plasmática, transferencia de la señal de la membrana al núcleo y cambios en el núcleo.

4.3.1. RECEPCION DE LA SENAL

En primer lugar, el mitógeno o antígeno ha de conectar con un receptor de la superficie celular, probablemente una glicoproteína (RESCH, 1979).

Parece ser, que la molécula activadora debe 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 ocurra.

4.3.2. ALTERACIONES DE LA MEMBRANA PLASMATICA

- A) 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^{++} ; también aumenta la actividad de la bomba Na^+/K^+ .

Algunos de estos incrementos se ha probado 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. 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 del 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 adenil-ciclase y la ATPasa Na^+/K^+ compiten por el mismo ATP, la función incrementada de la bomba Na^+/K^+ rápidamente agotaría este ATP.

- B) CAMBIOS EN LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA:

La estimulación del linfocito conduce a un enriquecimiento en la membrana de ácidos grasos poliinsaturados. Como consecuencia de esto, los fosfolípidos de membrana se encuentran menos densamente empaquetados, la membrana se hace más fluida y el grado de transporte resulta alterado.

- C) INTERPRETACION DE LOS CAMBIOS EN LA MEMBRANA:

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

Cuando se activa la FMT I metila a FE y la convierte en fosfatidil-N-monometil-etanolamina (FME). La FME es caracterizada ahora por FMT II, que la transforma, por adición de dos grupos metilos, en FC. Los fosfolípidos metilados son transportados, 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 y 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^{++} , enzima que regula el flujo de este ión al interior celular, se altera de tal forma que permite la entrada del mismo a la célula. En segundo lugar, se afecta la ATPasa Na^+/K^+ , intensificándose el transporte de estos dos iones. Finalmente, la adenilciclasa resulta también afectada, influyendo en los niveles de AMPc en el citoplasma.

4.3.3. TRANSFERENCIA DE LA SEÑAL DE LA MEMBRANA AL NUCLEO

Esta es la fase de mayor importancia en el proceso de activación celular y la que se conoce con menor exactitud. No obstante, en los últimos años parece haberse aclarado la forma de transmitir dicha señal al núcleo celular.

Desde hace tiempo, se ha involucrado un hipotético segundo mensajero como agente transmisor de la información desde el exterior al interior de la célula (el primer mensajero sería la molécula externa estimuladora).

En primer lugar, se relacionaron los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, con la regulación del crecimiento celular (PASTAN y JOHNSON, 1974). HADDEN y HADDEN (1972) estudiaron la transformación blástica de los linfocitos periféricos humanos inducida por mitógenos, como la fitohemaglutinina o concanavalina A, y observaron que, a los 20 minutos de adicionar el mitógeno, el nivel de GMPc aumentaba unas 10 ó 15 veces, mientras que el AMPc no variaba. También encontraron que el GMPc comenzaba a generarse en el momento en que la fitohemaglutinina conectaba con la membrana celular. Estos autores, por tanto, asumieron que el GMPc jugaba el papel de mediador que transmitía la señal desde la membrana al núcleo, provocando 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.

Sin embargo, FOKER y cols. (1979) encontraron en cultivos de linfocitos de ratón en presencia de mitógenos, un aumento inicial de los niveles de AMPc, que alcanzaba un máximo a las 30 horas de cultivo y coincidía con un pico de máxima actividad de las protein-kinasas, determinado por un incremento de las fosforilaciones de ciertas proteínas.

Las protein-kinasas AMPc-dependientes, enzimas que fosforilan una serie de proteínas aumentando o disminuyendo sus actividades (GREENGARD, 1978), parecían estar implicadas en este proceso, y existían evidencias al respecto (COFFINO y cols., 1976; HADDOX, 1980).

Como vemos, no existía un acuerdo con respecto a un único papel del AMPc ó GMPc en el control del crecimiento, con experiencias contradictorias en cuanto a la concentración y actuación precisa que estos metabolitos pudieran tener en la proliferación celular (KLEIN, 1982).

Otros candidatos para segundos mensajeros podían ser los iones Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ . Las concentraciones intracelulares de estos iones dependen de sistemas de transporte (WAIDITCH y CUNNINGHAM, 1977) y su captación es estimulada por suero y factores de crecimiento (McKEEHAN y McKEZHAN, 1980). Los iones activan varias enzimas y procesos metabólicos, incluyendo las protein-kinasas y ATPasas, estimulando la síntesis de proteínas y la producción de energía por el sistema glucolítico.

El Ca^{++} tiene una concentración extracelular óptima para la mitogénesis de 5×10^{-4} M (HESKETH, 1979), no existiendo estimulación ni división si los niveles de Ca^{++} extracelulares se mantienen elevados. No obstante, esto no parece afectar a las células neoplásicas (BOYTON y WHIFIELD, 1979). Parece ser, que el efecto de los mitógenos es, inicialmente, favorecer la entrada de Ca^{++} en la célula. Las funciones del Ca^{++} intracelular son mediadas posteriormente por la calmodulina, una proteína ligadora específica para este ión (CHEUNG, 1980; MEANS y DEDMAN, 1980).

Como hemos visto, todos los mensajeros anteriores podían intervenir en el fenómeno de transmisión de la señal de membrana al núcleo, activando la proliferación celular.

En los últimos años, se ha tratado de conexionarlos a través de un mecanismo común que desencadenara todas las modificaciones vistas anteriormente. Este mecanismo parece ser el metabolismo de los fosfoinositoles de membrana (BERRIDGE, 1984). La hidrólisis de estos fosfoinositoles de membrana puede representar una señal transductora fundamental que inicia una cascada, resultando en la movilización de Ca^{++} , la activación de proteína-kinasa C, la liberación de ácido araquidónico (para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) y la estimulación de guanilato-ciclasa para formar GMPc (BERRIDGE, 1984).

Según O'SHEA y cols. (1986), existen evidencias que sugieren que dicho metabolismo está implicado en la activación de los linfocitos T. No obstante, dada la importancia de este mecanismo en la activación, no sólo de los linfocitos T, sino de gran número de células, lo describiremos con más detalle en el apartado siguiente.

4.3.4. CAMBIOS EN EL NUCLEO

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 que afecta solamente al RNA transferente y ribosómico. Para la síntesis de RNA mensajero no se ha 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 diez veces superiores a los del linfocito no estimulado.

4.4. PAPEL ESENCIAL DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOINOSITOLES DE MEMBRANA EN EL CRECIMIENTO CELULAR

El metabolismo de los fosfoinositoles de membrana constituye un mecanismo central en la activación mediada por receptores y la transducción de la señal que se origina cuando son ocupados estos receptores en una amplia variedad de tipos celulares (HOKI, 1985).

Asimismo, un gran número de agonistas diferentes pueden estimular un incremento en el metabolismo de los fosfoinositoles de membrana. Estos agonistas incluyen neurotransmisores clásicos tales como acetilcolina (WEISS y PUTNEY, 1981), noradrenalina (PRICK y cols., 1982), histamina (JONES y cols., 1979), hidroxitriptamina (FAH y BERRIDGE, 1979), además de moléculas más complejas, tales como los péptidos vasopresina, taquikininas, bombesina (HANLEY, 1985), sustancia P (WEISS y cols., 1982), angiotensina (BILLAH y MITCHELL, 1979; PRICK y cols., 1982), pancreocimina (CALDERON y cols., 1980), ceruleína (PUTNEY y cols., 1983), factor liberador de tirotrópina (TRF) (MARTIN, 1983), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (BERRIDGE y cols., 1984) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (BERRIDGE y cols., 1984). En aquellos casos donde la farmacología está bien establecida, el cambio en el metabolismo de los fosfoinositoles es también específico para una clase de receptor particular, tales como el receptor colinérgico muscarínico, el receptor α_1 -adrenérgico, el receptor H_1 histaminérgico o el receptor V_1 -vasopresinérgico.

4.4.1. METABOLISMO DE LOS FOSFOINOSITOLES DE MEMBRANA

El término colectivo de los fosfoinositoles ha sido usado para describir los tres fosfolípidos aniónicos que contienen mioinositol en sus grupos principales (BERRIDGE, 1981). La forma más abundante es fosfatidilinositol (PtdIns) que contiene mioinositol ligado a un fosfato a través del grupo hidroxilo en posición 1. Los otros dos miembros están formados por fosforilación secuencial de grupo

hidroxilo en las posiciones 4 y 5 del PtdIns. Las membranas contienen una fosfatidilinositol-kinasa (PtdIns-kinasa), que fosforila específicamente el grupo hidroxilo en la posición 4 para producir fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns4P). Una fosfatidilinositol-4-fosfato-kinasa (PtdIns4P-kinasa) fosforila el grupo hidroxilo en la posición 5 para formar fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns4,5P₂). La conversión del fosfatidilinositol en estos dos polifosfoinositoles puede ser reversible por dos fosfomonoesterasas, que específicamente separan fosfato de las posiciones 5 y 4.

Las kinasas y fosfomonoesterasas que mantienen este equilibrio dinámico entre estos tres lípidos son algunas de las enzimas celulares más activas.

La interacción de un agonista con su receptor induce la hidrólisis de PtdIns4,5P₂ por la enzima fosfodiesterasa para formar dos compuestos intracelulares transmisores de la señal, diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato (Ins1,4,5P₃) (BERRIDGE, 1984). Los dos productos formados durante la hidrólisis de PtdIns4,5P₂ son conservados en su mayoría y se introducen en un ciclo lipídico y en un ciclo de inositol-fosfato, que finalmente se combinan para formar PtdIns.

Una inositol-trifosfatasa activa, defosforila específicamente Ins1,4,5P₃ a inositol-1,4-bisfosfato (Ins1,4P₂) (DOWES y cols., 1982). También hay evidencias de que una inositol-bisfosfatasa convierte Ins1,4P₂ a inositol-1-monofosfato (Ins1P) (BERRIDGE y cols., 1983). El paso final sería la conversión de Ins1P a mioinositol libre por una inositol-1-fosfatasa.

Por otra parte, una diacilglicerol-kinasa fosforila diacilglicerol para formar ácido fosfatídico (PA), el cual interacciona con citidina-trifosfato (CTP) para formar citidina-difosfato-diacilglicerol. Este último se recombina con inositol para rellenar el "pool" de PtdIns, con lo cual, se cierra el ciclo. El sustrato inmediato para estimulación por el receptor es PtdIns4,5P₂, que debe ser constantemente repuesto por fosforilación de PtdIns usando las enzimas kinasas descritas anteriormente.

Parece ser, que la formación de fosfoinositoles es dependiente de energía en forma de ATP (BERRIDGE, 1984).

Las células parecen tener un "pool" de inositoles relativamente pequeño, sensible a la estimulación de receptores por sus agonistas, que quizás se localice en la membrana plasmática. El mantenimiento de este "pool" dependerá del balance entre la proporción en que los fosfoinositoles son degradados por el mecanismo del receptor y la proporción de síntesis. Un nivel alto de mioinositol libre puede ser esencial para la resíntesis y, de este modo, contrarrestar la degradación mediada por el receptor. Un ejemplo de esto, lo tenemos con el litio, el cual inhibe a la enzima mioinositol-1-fosfatasa, que libera el mioinositol libre necesario para resintetizar PtdIns, y quizás de esto, dependa su acción terapéutica en el control de la enfermedad maniaco-depresiva (BERRIDGE, 1984).

Por tanto, cualquier proceso que interfiera con el aporte de inositol libre podría determinar cambios en la sensibilidad del receptor por alteración de la cifra del "pool" de inositoles, requerido para transmitir la señal de estimulación de dicho receptor.

4.4.2. FORMACION DE SEGUNDOS MENSAJEROS

Decíamos antes, que la consecuencia de la hidrólisis agonista-dependiente del PtdIns $4,5P_2$ es la formación de Ins $1,4,5P_3$ y diacilglicerol. Estos dos productos funcionan como segundos mensajeros activando dos mecanismos de señales independientes, pero paralelos.

El Ins $1,4,5P_3$ actúa liberando Ca^{++} de los reservorios intracelulares (BERRIDGE e IRVINE, 1984; JOSEPH y cols., 1984a; JOSEPH y cols., 1984b; PRENTKI y cols., 1984; STREB y cols., 1984). No se ha establecido del todo el mecanismo por el que el Ins $1,4,5P_3$ libera Ca^{++} interno. Pudiera ser, que actuara sobre un receptor interno para estimular la liberación, o también, pudiera inhibir el mecanismo de recaptación responsable de secuestrar el Ca^{++} intracelular (BERRIDGE, 1984). También, puede que exista un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{++} ,

pero la relación entre el metabolismo de los fosfoinosítoles y la entrada de Ca^{++} todavía no ha sido establecida.

Estudios con fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, han permitido comprobar que la liberación de Ca^{++} intracelular es específica de un determinado fosfoinosítol de membrana (IRVINE y cols., 1984; IRVINE y cols., 1986). Así, el inositol-1,4,5-trifosfato ($Ins1,4,5P_3$) moviliza Ca^{++} intracelular con una dosis media de $0,3 \mu M$, de forma similar al inositol-1,2,4-cíclico,5-trifosfato ($Ins1,2cic4,5P_3$). El inositol-1,3,4-trifosfato ($Ins1,3,4P_3$) requiere una dosis media de $9 \mu M$ para producir el mismo efecto. El inositol-2,4,5-trifosfato ($Ins2,4,5P_3$) y el glicerofosfoinosítol 4,5-bifosfato ($GroPIns4,5P_2$) requerían una dosis media de $1,6 \mu M$, el inositol-4,5-bifosfato ($Ins4,5P_2$) de $20 \mu M$, mientras que el inositol-1,4-bifosfato ($Ins1,4P_2$) y el inositol-1,3,4,5-tetrafosfato ($Ins1,3,4,5P_4$) eran inefectivos para liberar Ca^{++} intracelular. Por tanto, parece ser que los grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 son esenciales para el efecto movilizador de Ca^{++} del inositol-trifosfato, y que además, se requiere un grupo fosfato en la parte opuesta de la molécula, con preferencia en la posición 1.

El otro producto principal de la hidrólisis de $PtdIns4,5P_2$ es el diacilglicerol, el cual es capaz de activar a la protein-quinasa C en un complejo proceso que requiere Ca^{++} y fosfatidilserina como cofactores (ROZENGURT y cols., 1983; ROZENGURT y cols., 1984; ROZENGURT y cols., 1985).

Un aspecto particular de esta kinasa C, es que puede ser activada por los ésteres de forbol, los cuales, son promotores tumorales (BERRIDGE, 1984; ROZENGURT y cols., 1983; ROZENGURT y cols., 1984).

Cuando esta kinasa C es activada por el diacilglicerol o por ésteres de forbol (NISHIZUKA, 1984a), fosforila proteínas celulares específicas, que después contribuyen a varios procesos fisiológicos (particularmente secreción y proliferación), especialmente aquellos que ocurren a muy bajos niveles de Ca^{++} .

La acción de segundo mensajero del diacilglicerol es terminada por dos mecanismos. Puede ser fosforilado a ácido fosfatídico por

una diacilglicerol-kinasa, y éste, puede entrar en el ciclo de resíntesis de PtdIns (como decíamos anteriormente) o puede dar lugar a ácido araquidónico por medio de una fosfolipasa A₂ ácido fosfatídico específica (DAWSON y cols., 1984). Por otra parte, el diacilglicerol puede ser convertido en ácido araquidónico por medio de una diacilglicerol-lipasa (PRESCOTT y MAJERUS, 1983).

El ácido araquidónico, o uno de sus metabolitos, puede a su vez estimular la guanilato-ciclasa para formar GMPc a partir de GTP, y también, puede derivarse hacia la síntesis de prostaglandinas (BERRIDGE, 1984).

Por tanto, la hidrólisis de PtdIns4,5P₂ por agonistas representa una bifurcación en el mecanismo de transmisión de la señal que resulta en la formación de dos segundos mensajeros diferentes. Un brazo de este mecanismo depende del diacilglicerol, el cual, activa la kinasa C, y ésta, fosforila proteínas celulares específicas, mientras que el otro mecanismo depende del Ins1,4,5P₃, el cual, incrementa el Ca⁺⁺ intracelular, y éste, actúa a través de la calmodulina para fosforilar otro grupo de proteínas diferentes. Los dos mecanismos pueden contribuir a la respuesta final actuando, bien de forma cooperativa o de forma sinérgica. La importancia relativa de cada mecanismo puede estar referida al tiempo de actuación. El Ca⁺⁺ puede ser responsable de la iniciación, mientras que el diacilglicerol puede tener más importancia en mantener la respuesta (KOJIMA y cols., 1983).

El sistema bifurcador de señales genera un repertorio diverso de segundos mensajeros intracelulares que ocupan estos receptores con la versatilidad necesaria para controlar un amplio rango de los procesos celulares, incluyendo la proliferación celular.

Los dos acontecimientos iónicos principales que contribuyen al establecimiento de la proliferación celular son cambios en el nivel de Ca⁺⁺ y la activación de un transportador de intercambio iónico Na⁺/H⁺, que expulsa protones al exterior celular e introduce Na⁺, creando una marcada alcalinización del citoplasma (BERRIDGE, 1984).

El aumento del nivel de Ca⁺⁺ vendría determinado por el Ins1,4,5P₃, mientras que la activación del transportador de Na⁺ y

H⁺ vendria dada por el diacilglicerol, a través de la proteína-kinasa C.

El AMPc también parece contribuir a la acción mitogénica de algunos factores de crecimiento. Parece ser, que el ácido araquidónico, producido a partir del diacilglicerol, puede derivarse a la formación de una prostaglandina de tipo E, la cual, funciona de forma autocrina activando la adenilato-ciclasa, y ésta, transforma ATP en AMPc (BERRIDGE, 1984).

Por tanto, la hidrólisis de PtdIns4,5P₂ puede ser un acontecimiento clave en la acción de agentes mitogénicos, porque inicia una cascada de señales que resultan en niveles elevados de Ca⁺⁺, AMPc y Na⁺, así como una caída en los niveles de H⁺.

4.4.3. EJEMPLOS DE UTILIZACION DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOINOSITOLIOS DE MEMBRANA PARA TRANSMITIR LA SENAL DE ESTIMULACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

Este mecanismo de transmisión de la señal que estimula la proliferación celular ha sido observado en varios tipos celulares (POUYSEGUER y cols., 1982; MOOLENAAR y cols., 1983; L'ALLEMAIN y cols., 1984; PARIS y POUYSEGUER, 1984). Igualmente, dicho mecanismo puede ser estimulado por una amplia variedad de factores de crecimiento (ROZENGURT, 1985; ROZENGURT y MENDOZA, 1985).

Los fibroblastos 3T3 de ratón Swiss son una de las células en las que el mecanismo anterior ha sido mejor estudiado (BERRIDGE y cols., 1984; IRVINE y cols., 1984; HASEGAWA-SASAKI, 1985; IRVINE y cols., 1986; ZACHARY y cols., 1986; MENDOZA y cols., 1986).

La bombesina (ROZENGURT y SINNETT-SMITH, 1983) y péptidos estructuralmente referidos (ROZENGURT y SINNETT-SMITH, 1983; ZACHARY y ROZENGURT, 1985), al igual que otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (ROSS y VOGEL, 1978), y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FDGF) (DICKER y cols., 1981; ROZENGURT y cols., 1982), estimulan directamente la síntesis de DNA y la división en las células 3T3. Este efecto es mediado por receptores de alta afinidad, específicos para cada factor de crecimiento (ZACHARY y

ROZENGURT, 1985), e incluso, en el caso de la bombesina, es bloqueado por un antagonista del mismo (JENSEN y cols., 1984; ZACHARY y cols., 1986), la sustancia P. Sin embargo, el mecanismo de transmisión de la señal de estimulación de la proliferación celular parece ser el mismo para los distintos factores de crecimiento.

Este mecanismo parece ser un incremento en el mecanismo de los fosfoinositoles de membrana, que determina un aumento de inositol-1,4,5-trifosfato ($\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$) y de diacilglicerol en las células 3T3. El $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ actúa de segundo mensajero induciendo la movilización de Ca^{++} de los depósitos intracelulares (BROWN y cols., 1984; BERRIDGE y cols., 1984; HASEGAWA-SASAKI, 1985; IRVINE y cols., 1986). El diacilglicerol parece actuar activando una proteína de 80000 de Pm (denominada 80k).

Varios hechos parecen confirmar que esta proteína se trata de la proteína-kinasa C, la cual, puede ser activada también por ésteres de forbol (NISHIZUKA, 1984b), como decíamos antes. Estos hechos son los siguientes:

- a) Ésteres de forbol biológicamente activos o diacilglicerol añadidos de forma exógena (ROZENGURT y cols., 1984) o de forma endógena (ROZENGURT y cols., 1983) estimulan una rápida fosforilación de esta proteína.

- b) El pretratamiento prolongado de células 3T3 con ésteres de forbol, que conduce a un descenso marcado en el número de sitios de enlace de ésteres de forbol específicos (COLLINS y ROZENGURT, 1982a; COLLINS y ROZENGURT, 1982b; ROZENGURT y COLLINS, 1983; COLLINS y ROZENGURT, 1984) y a la desaparición de la actividad de proteína-kinasa C "in vitro" (RODRIGUEZ-PENA y ROZENGURT, 1984; ROZENGURT y cols., 1985), bloquea el incremento en la fosforilación de la proteína 80k, propio de los ésteres de forbol o diacilglicerol.

- c) La misma fosforilación de la proteína 80k puede ser generada en extractos libres de células por activación de proteína-kinasa C (RODRIGUEZ-PENA y ROZENGURT, 1986).

Estos hechos parecen confirmar que la proteína 80k se trata de la proteína-kinasa C, la cual, puede jugar un papel fundamental en

la estimulación de la proliferación de fibroblastos (ROZENGURT y cols., 1983; ROZENGURT y cols., 1985).

Por otra parte, se ha visto que varios mitógenos estimulan la entrada de Na^+ en células 3T3 (MENDOZA y cols., 1980a; MENDOZA y cols., 1980b; DICKER y ROZENGURT, 1981; LOPEZ-RIVAS y cols., 1984) a través de un sistema de cotransporte Na^+/H^+ . Este sistema incrementa el Na^+ intracelular y causa una alcalinización del citoplasma (SCHULDINER y ROZENGURT, 1982; BURNS y ROZENGURT, 1983; CASSEL Y cols., 1983; BURNS y ROZENGURT, 1984; VARA y cols., 1985). Puesto que la actividad de la bomba Na^+/K^+ es regulada por Na^+ intracelular (SMITH y ROZENGURT, 1978), hay una estimulación secundaria de la actividad de la bomba Na^+/K^+ , incrementando el K^+ intracelular y restaurando el gradiente electroquímico para el Na^+ (ROZENGURT y HEPPEL, 1975; LOPEZ-RIVAS y cols., 1982).

Estos cambios rápidos de los flujos de Na^+ , K^+ e H^+ ocurren en una variedad de otros tipos celulares tras su estimulación mitogénica (KOCH y LEFFERT, 1979; MOOLENAAR y cols., 1981; MOOLENAAR y cols., 1982; BENOS y SAPIRSTEIN, 1983; FELBER y BRAND, 1983; OWEN y VILLEREAL, 1983; MOOLENAAR y cols., 1984; POUYSSEGUR y cols., 1984), y parecen deberse a la fosforilación de la proteína-kinasa C, la cual parece ser la responsable de la activación del sistema de cotransporte Na^+/H^+ (VARA y cols., 1985; MENDOZA y cols., 1986). De ahí, la importancia de la proteína-kinasa C en la estimulación de la proliferación celular.

No obstante, algunos factores de crecimiento como la insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) parecen estimular el cotransporte Na^+/H^+ por un mecanismo desconocido, pero que es independiente de la proteína-kinasa C (VARA y ROZENGURT, 1985). Quizás, este mecanismo pudiera ser la activación de otra proteína, ya que se ha asociado a los receptores para los factores de crecimiento epidérmico (EGF), insulina e insulínico I (IGF-1), con la actividad tirosín-kinasa, la cual, parece estar en relación estrecha con el control de la proliferación celular (HASEGAVA-SASAKI, 1985).

Además, se ha comprobado que la tirosín-kinasa es una parte integral de la molécula del receptor para el factor del crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF), el cual, estimula la fosforilación de una proteína tirosín-específica (HASEGAWA-SASAKI, 1985).

Por tanto, el PDGF puede inducir la proliferación celular a través de dos mecanismos, el metabolismo de fosfoinosítoles de membrana y la tirosín-kinasa, aunque se desconoce la conexión que pudiera haber entre ambos. Es posible, que ambos mecanismos actúen sinérgicamente en la iniciación de la proliferación celular.

Otra de las células en cuya activación parece estar involucrado el metabolismo de los fosfoinosítoles de membrana es el linfocito T, y existen varias evidencias al respecto:

- a) La activación de células T inducida por mitógenos y por antígenos, así como la fijación de anticuerpos al complejo receptor de la célula T, parece asociarse con un incremento en el Ca^{++} intracelular (TSIEN y cols., 1983; HESKETH y cols., 1983; SHAPIRO y cols., 1985; OETTGEN y cols., 1985).

- b) Los ésteres de forbol, activadores farmacológicos de la proteína-kinasa C, han mostrado también su capacidad para activar linfocitos T (WEISS y cols., 1984; TRUNEH y cols., 1985).

- c) La activación de células T está asociada con un incremento de inositol-trifosfato ($Ins1,4,5P_3$) (IMBODEN y STOBO, 1985), así como de polifosfoinosítoles ($PtdIns4P$ y $PtdIns4,5P_2$) (TAYLOR y cols., 1984; BUON y cols., 1985).

Por tanto, parece ser que uno de los primeros acontecimientos en la activación de los linfocitos T es la estimulación de la enzima que fosforila al fosfatidilinositol (fosfatidilinositol-kinasa).

O'SHEA y cols. (1986) han logrado detectar esta enzima en la membrana de linfocitos T murinos y han llegado a caracterizarla. Es una proteína con Pm de 60000 aproximadamente, dependiente de Mg^{++} ó Mn^{++} , que utiliza como sustrato preferente GTP y cuya actividad es inhibida por fosfatidilinositol-4-fosfato ($PtdIns4P$) y por fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ($PtdIns4,5P_2$). Esta actividad enzimática tiene similares características en membranas derivadas de un hibridoma de células T, timocitos y clones de células T (O'SHEA y cols., 1986).

Por último, hay que reseñar que algunos oncogenes, cuya función se desconoce aún, pueden también codificar proteínas que participan en el mecanismo receptor que usa inositol-trifosfato ($\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$) y diacilglicerol como segundos mensajeros.

Así, el gen v-ros del virus del sarcoma aviar VR2 y el gen v-src del virus del sarcoma de Rous codifican proteínas que pueden fosforilar PtdIns para dar lugar a $\text{PtdIns}4\text{P}$ y $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ (MACARA y cols., 1984; SUGIMOTO y cols., 1984). Además, el gen v-src puede fosforilar diacilglicerol para formar ácido fosfatídico (SUGIMOTO y cols., 1984).

También, el gen v-sis del virus del sarcoma de simio codifica una proteína que es casi idéntica al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (DOOLITTLE y cols., 1983) y el gen erb-B produce una proteína que es muy similar a una parte del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (DOWNWARD y cols., 1984).

Por tanto, se ha encontrado que los oncogenes pueden modificar al menos tres aspectos claves del mecanismo procesador de la señal que emplean los fosfoinositoles. Codifican uno de los factores de crecimiento (sis), un receptor para factor de crecimiento (erb-B) y también enzimas (ros y src) que proveen el sustrato lipídico requerido para estos receptores.

Por otra parte, se ha visto que células 3T3 transformadas por tres genes diferentes "ras" presentan niveles alterados de $\text{PtdIns}4,5\text{P}_2$ y de sus catabolitos (FLEISCHMAN y cols., 1986).

Todo esto parece demostrar que existe una posible relación entre los oncogenes y el metabolismo de los fosfoinositoles de membrana, aunque la relación exacta se desconoce. De todos modos, este hecho puede indicar que las células neoplásicas utilizan los mismos sistemas de estimulación de la proliferación celular que las células normales, y que la diferencia entre ambas estaría en la intensidad de funcionamiento de dichos sistemas.

5. LA LINEA NIH 3T3 COMO MODELO DE CRECIMIENTO CELULAR

La línea celular NIH 3T3 fue seleccionada originalmente por repetidos pases de cultivo, a baja densidad, de células embrionarias de ratón (TODARO y GREEN, 1963). Posteriormente, esta línea celular continua fue desarrollada por JAINCHILL y cols. (1969), a partir de cultivos embrionarios de ratón Swiss, para el estudio de la infección y transformación de células por virus del complejo sarcoma-leucemia murino.

Los fibroblastos de ratón 3T3 exhiben una forma de control del crecimiento, en la cual, las células alcanzan sólo una baja densidad de saturación y pueden permanecer durante largos periodos en un estado viable de monocapa (TODARO y GREEN, 1963; STOKER y RUBIN, 1967). La densidad de saturación depende marcadamente de la concentración de suero, y este efecto de la concentración parece atribuible a la disponibilidad de sustancias específicas promotoras del crecimiento en el medio y a la liberación de inhibidores del crecimiento celular (HOLLEY y KIERNAN, 1968; DULBECCO y STOKER, 1970; STOKER y PIGGOTT, 1974; THRASH y CUNNINGHAM, 1975; STECK y cols., 1979). No obstante, se ha comprobado que el crecimiento de células 3T3 puede ser reiniciado por la adición de mitógenos (VOGEL y cols., 1980).

El crecimiento de células normales "in vitro" está sujeto a un control altamente efectivo que da lugar al cese de dicho crecimiento cuando se alcanza una densidad celular específica. Dos hipótesis principales intentan explicar esta regulación:

- a) La inhibición del crecimiento por mecanismos dependientes de densidad, debido a deplección del medio (HOLLEY y KIERNAN, 1968) o a la acumulación de moléculas inhibitoras en el medio (HSU y cols., 1984).

- b) Inhibición del crecimiento por interacciones específicas célula-célula (inhibición del crecimiento por contacto) a través de glicoproteínas de membrana plasmática (HAKOMORI y cols., 1974; WHITTENBERGER y GLASER, 1977; HAKAMURA y cols., 1983; PETERSON y LERCH, 1983).

Con respecto a la primera hipótesis, DUNN e IRELAND (1984) han sugerido que el fenómeno de inhibición de la proliferación que se da en las células 3T3 (también conocido como topoinhibición) se debe a la deplección local de algún factor de crecimiento, debido a que los contactos celulares dificultan la difusión del mismo. Estos autores han demostrado que estimulando el flujo forzado de medio en los cultivos celulares a través de una pequeña bomba se puede incrementar la cifra de crecimiento de células 3T3, lo cual refuerza la hipótesis anterior. No obstante, DUNN e IRELAND (1984) sugieren que dicho mecanismo de inhibición podría deberse también a la liberación por parte de las células de un factor soluble inhibidor, que sería transportado por el flujo al resto del cultivo, y que explicaría el que las células de los extremos, donde los contactos entre las mismas son menores, también se encuentren inhibidas.

Se ha visto que el tratamiento de cultivos de células 3T3 que proliferan espaciadamente con medio condicionado por exposición a cultivos de células 3T3 inhibidas por densidad, da lugar a una inhibición del crecimiento y de la división en las células diana, cuando se comparan con un tratamiento similar con medio no condicionado (STECK y cols., 1979). Esta actividad inhibitoria fue fraccionada, obteniendo una preparación que exhibía inhibición reversible del crecimiento e interacción directa con células diana 3T3 (STECK y cols., 1982; VOSSS y cols., 1982). Esta fracción, designada como FGR-s (fibroblast growth regulator, soluble form), contenía dos polipéptidos principales, de Pm 10000 y 13000, respectivamente (WANG y cols., 1982).

Usando procedimientos similares, WELLS y MALLUCCI (1983) han demostrado que cultivos secundarios de fibroblastos embrionarios de ratón liberan al medio un factor inhibidor, cuya composición polipeptídica y características fisicoquímicas, coinciden estrechamente con las del FGR-s.

Más recientemente (HSU y cols., 1984; HSU y WANG, 1986), se ha obtenido un anticuerpo monoclonal que neutraliza la actividad de FGR-s y que se liga específicamente al polipéptido de Pm: 13000,

por lo que éste parece ser el responsable, al menos en parte, de la actividad inhibidora observada.

Por tanto, estos resultados parecen indicar que se ha purificado un factor soluble regulador que actúa inhibiendo la proliferación de los fibroblastos 3T3 de forma autocrina.

VU y cols. (1985) han demostrado que ciertas líneas celulares similares a fibroblastos humanos pueden secretar un factor que inhibe la proliferación de varias líneas celulares tumorales, aunque no se ha demostrado si el mecanismo de actuación es similar al del factor encontrado en las células 3T3.

En cuanto a la segunda hipótesis, de la que hablábamos antes, aunque las moléculas que se supone están involucradas en la inhibición por contacto del crecimiento, han sido sólo parcialmente purificadas (RABEN y cols., 1981; NAKAMURA y cols., 1984a) existen claras evidencias de que dicha inhibición, ejercida por membranas plasmáticas o por proteínas de membrana purificadas, es de naturaleza específica. Los procesos característicos de cultivos de alta densidad pueden ser inducidos por la adición de membranas plasmáticas aisladas, o de moléculas de membrana plasmática solubilizadas, a células que crecen espaciadamente (RABEN y cols., 1981; NAKAMURA y cols., 1983; WIESER y cols., 1985).

Otras experiencias (WHITTENBERGER y GLASER, 1977; NATRAJ y DATTA, 1978; VALE y cols., 1984) han demostrado que fracciones de la membrana celular puede regular la replicación de células 3T3. LIEBERMAN y GLASER (1981) sugirieron que tales componentes de la membrana podían ser similares a factores involucrados en la adhesión celular. Estos factores parecen tener ciertas propiedades: inhiben específicamente a la célula de origen; no inhiben a células transformadas; la inhibición de la replicación no parece ser total; la inhibición es reversible.

WHITTENBERGER y cols. (1978) demostraron que 2 µg de membrana plasmática aislada de células 3T3 producían un 50% de inhibición de la replicación de dichas células. Este efecto podía ser contrarrestado por la adición de un exceso de suero, y la actuación inhibidora parecía deberse a un incremento de la proporción de células en G₁, implicando un bloqueo fisiológico en G₀ o un

intervalo prolongado de G₁. La sustancia inhibidora parecía ser una proteína de membrana, siendo solubilizada por el detergente octoglucósido.

Tres líneas de evidencias parecen involucrar a glicoproteínas de membrana plasmática en la inhibición del crecimiento dependiente de contacto (WIESER y OESCH, 1986):

- a) La inhibición del crecimiento causada por la adición de membranas plasmáticas se redujo extensamente cuando dichas membranas se aislaron de células previamente tratadas con tunicamicina (WEISER y cols., 1985), un antibiótico que inhibe la síntesis de la porción oligosacárida de glicoproteínas ligadas a asparagina.

- b) La inhibición del crecimiento fue reversible por tratamiento con NaIO₄ de proteínas inmovilizadas.

- c) La inhibición del crecimiento fue reversible por tratamiento con β -galactosidasa de moléculas de membrana plasmática inmovilizadas.

El hecho de que las células transformadas no sean sensibles al mecanismo de inhibición de la proliferación celular por contacto, podría explicarse porque estas células tienen un defecto en los receptores de glicoproteínas involucradas en dicho mecanismo (NAKAMURA y cols., 1984b), aunque la maquinaria intracelular que procesa la señal originada en esos receptores está intacta (PETERSON y LERCH, 1983).

Por tanto, parece ser que las glicoproteínas de membrana parecen estar involucradas en el control del crecimiento de las células 3T3. Una de las glicoproteínas que podría intervenir en dicho control es la fibronectina, la cual es uno de los factores promotores de la adhesión celular mejor caracterizados, y se sabe que está involucrada en mediar la fijación de fibroblastos a colágeno (NAGATA y cols., 1985) y a proteoglicanos (LARK y CULP, 1984). JONES y cols. (1986) han demostrado que la glicosilación de la fibronectina es muy importante para dicha función, ya que modula la adhesión y la expansión de los fibroblastos.

Otros autores han referido el papel de las glicoproteínas (NATRAJ y DATTA, 1978; KINDERS y cols., 1980; MANNINO y cols.,

1981; YAOI, 1984) y de los glicosaminoglicanos (FRITZE y cols., 1985) en el control del crecimiento. No obstante, el tratamiento con tripsina de las membranas plasmáticas aisladas, tiene relativamente poco efecto sobre su actividad inhibidora (WIESER y cols., 1985), por lo que parece poco probable que los glicosaminoglicanos sean responsables de los efectos observados.

HEIMARK y SCHWARTZ (1985) han demostrado que las interacciones membrana-membrana juegan un papel muy importante en la regulación del crecimiento de células endoteliales. Estos autores piensan que la proteína inhibidora, tanto en células 3T3 como en células endoteliales, podría estar localizada a nivel de los complejos de unión intercelular. MURPHY y cols. (1983) identificaron por medio de anticuerpos monoclonales una proteína de Pm: 100000, localizada a nivel de dichos complejos. Puede que esta proteína sea el agente, o uno de los agentes, responsable del efecto inhibidor referido anteriormente.

Por otra parte, se ha visto que las proteínas del citoesqueleto, aparte de estar involucradas en la morfogénesis celular, podrían intervenir en la formación de contactos por parte de fibroblastos cultivados y en el control de su proliferación. Una de estas proteínas puede ser la vinculina, la cual, tiene un Pm de 130 Kd, y se localiza en zonas de contacto y unión intercelular. UNGAR y cols. (1986) han propuesto que la síntesis de vinculina, al igual que la de otras proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina, citokeratina), tiene un mecanismo de control "feed-back", sensible a los contactos intercelulares y a los contactos entre las células y el sustrato. Estos autores han demostrado que la síntesis de vinculina es mucho más baja en cultivos de fibroblastos espaciados, que muestran cifras máximas de proliferación, que en cultivos con alta densidad celular. Igualmente, dicha síntesis es mucho menor en células proliferantes no adheridas, en experimentos donde el sustrato está alterado.

Estas observaciones demuestran el papel de los contactos intercelulares en la regulación del crecimiento, y sugieren que proteínas, tales como la vinculina, la cual está involucrada en la

construcción de las estructuras celulares, participan en dicha regulación.

IVANYI (1987) ha examinado el fenotipo antigénico de la línea celular NIH 3T3, usando anticuerpos monoclonales y aloantisueros específicos para antígenos H-2 y varios no-H-2.

El fenotipo de la línea celular NIH 3T3 examinada era H-2^a, Qa-2, Ly-6.2, Thy-1.2, Ly-23.2 y 9F 3⁺. La expresión de antígenos H-2 (K^a, D^a/L^a) fue menor que en los linfocitos T de la cepa B10.Q (H-2^a), y la expresión de Qa-2 fue muy baja. Del complejo Ly-6, el antígeno Ly-m6.2A fue el más fuertemente expresado, mientras que Ly-m.6B, Ly-m.6C y los antígenos ThB y H9/25 no se detectaron.

RICE y O'BRIEN (1930), estudiaron con detalle la historia genealógica de la cepa salvaje de ratones Swiss, demostrando sus experimentos que esta colonia salvaje retenía, aproximadamente en la misma extensión, la variabilidad genética encontrada en poblaciones murinas o humanas naturales. Por tanto, no existe un receptor singénico para la línea celular NIH 3T3 (obtenida a partir de ratones Swiss). No obstante, IVANYI (1987) identificó dos cepas endogámicas de ratón, B10.Q y DBA/1, cuyos antígenos eran idénticos a los examinados en su estudio sobre las células NIH 3T3, por lo que dichas cepas tienen un uso potencial para el trasplante con estas células.

El hecho de que la línea celular NIH 3T3 no se originara a partir de una cepa endogámica de ratón, podría determinar que inicialmente fuera heterogénea, ya que el subclonaje en diferentes laboratorios podría originar diferentes sublíneas. Esto, junto con la facilidad para la transformación espontánea, característica de las células NIH 3T3 a alta densidad (LEMOINE y cols., 1987), puede explicar el que el fenotipo antigénico de la línea NIH 3T3 obtenido por otros laboratorios en un futuro pueda ser diferente del obtenido por IVANYI (1987).

Las células NIH 3T3 han sido ampliamente usadas para el estudio de oncogenes activados en DNA derivado de tejidos neoplásicos, ya que esta línea de fibroblastos de ratón es un eficiente receptor para la transferencia de DNA y es susceptible de transformación completa por un sólo oncogén activado, produciendo

focos de células transformadas que pueden ser detectados directamente por inspección de los cultivos en monocapa (KRONTIRIS y COOPER, 1981; SHIH y cols., 1981; GOLDFARB y cols., 1982; LAND y cols., 1983). No obstante, la facilidad para la transformación espontánea en alta densidad de cultivo, de la que hablábamos antes, puede dificultar esos estudios. Es por ello, por lo que LEMOINE y cols. (1987) recomiendan para dicho fin utilizar cultivos con una baja densidad celular inicial, los cuales, son más apropiados para la detección de actividad transformante (SPANDIDOS, 1966).

Asimismo, se han utilizado anticuerpos monoclonales desarrollados tras la inmunización de ratones con células NIH 3T3 transformadas por oncogenes, en un esfuerzo de identificar antígenos de la superficie celular asociados con algún oncogén activado. De esta forma, se han definido determinantes antigénicos expresados en la superficie celular, que podrían estar relacionados con los fenómenos de transformación neoplásica (DREBIN y cols., 1984; SATO y cols., 1987). Además, la inoculación de ratones inmunocompetentes con células NIH 3T3 transformadas ha sido usada para estudiar genes que podrían ser específicos del fenotipo metastático (BERNSTEIN y WEINBERG, 1985). Para este tipo de estudios, es deseable que el receptor inmunocompetente sea también histocompatible con las células NIH 3T3 inoculadas, para excluir la respuesta inmune frente a antígenos de histocompatibilidad extraños en un experimento dado.

Decíamos anteriormente, que las células transformadas se pueden diferenciar de las NIH 3T3 simplemente por inspección de los cultivos. Pero además, su comportamiento va a ser diferente, en cuanto al crecimiento celular se refiere, en idénticas condiciones de cultivo.

Se ha visto que células 3T3 transformadas por el virus 40 de simio, expresan un número de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) muy inferior al expresado por células 3T3 normales (CHEN y cols., 1987), quizás debido a que una parte de esos receptores están ocupados por factores autocrinos en las células transformadas.

El ácido retinóico ha mostrado efectos sobre la proliferación celular en presencia de factores séricos (GOSPODAROWICZ, 1974; HARPER y SAVAGE, 1980; LOTAN, 1980) y en el enlace de EGF a diversas células (JETTEN y cols., 1979; JETTEN, 1980; JETTEN, 1981; JETTEN, 1982). CHEN y cols. (1987) han demostrado que el tratamiento con ácido retinóico de células 3T3 transformadas produce un rápido incremento de la fijación de EGF a dichas células, cosa que no ocurre con células 3T3 normales.

Por otra parte, trabajos con fibroblastos humanos han demostrado que el comportamiento de éstos es diferente también al de células transformadas. Así, BODINE y TUPPER (1984) demostraron que antagonistas de la calmodulina disminuyen el enlace de EGF a fibroblastos humanos transformados, pero no a sus homónimos normales, a pesar de que en ambos se podía aislar la calmodulina.

Aparte del EGF, otros factores de crecimiento pueden estimular la proliferación de células NIH 3T3 (BERRIDGE y cols., 1984; HASEGAWA-SASAKI, 1985; CORPS y cols., 1985), como decíamos en el apartado anterior de esta introducción. También decíamos que la mayoría de estos factores de crecimiento estimulaban la proliferación celular a través de una activación del metabolismo de los fosfolinositales de membrana (BERRIDGE y cols., 1984; IRVINE y cols., 1984; HASEGAWA-SASAKI, 1985; IRVINE y cols., 1986). Asimismo, se ha demostrado que la estimulación mitogénica de células NIH 3T3 en cultivo da lugar a diversos cambios en el modelo de síntesis protéica, con expresión alterada de proteínas específicas (THOMAS y THOMAS, 1986).

Todas estas características conocidas sobre los mecanismos de estimulación de la proliferación de células NIH 3T3, así como su facilidad para la transformación neoplásica, hacen de esta línea celular establecida un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos íntimos reguladores del crecimiento y de la transformación tumoral.

6. REGULACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las actividades celulares están estrechamente reguladas por un balance de influencias opuestas, estimuladoras e inhibitoras.

En los pasados años, los investigadores que han tratado de descubrir los misterios del cáncer, han concentrado sus esfuerzos sólo en las fuerzas que podían estimular activamente el crecimiento incontrolado de células cancerosas, tales como factores de crecimiento y oncogenes. De este modo, se han ignorado las fuerzas inhibitoras, cuyo déficit podría intervenir también en el desarrollo de tumores malignos.

Sin embargo, actualmente se admite la teoría del "Yin y Yang" del cáncer (MARX, 1986), según la cual, la pérdida de las respuestas inhibitoras puede ser tan importante para el desarrollo del potencial maligno de las células como la activación de las fuerzas estimuladoras. En realidad, ambas deben estar involucradas, lo cual encajaría con el hecho de que la mayoría de los cánceres se desarrollan lentamente porque se requieren diversos cambios celulares.

Además, existen moléculas que regulan el crecimiento celular y que pueden ser estimuladoras e inhibitoras dependiendo de las circunstancias.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) constituye un ejemplo de lo anterior. Esta molécula estimula el crecimiento de fibroblastos, pero al mismo tiempo, puede inhibir el de células epiteliales, keratinocitos y linfocitos (ROBERTS y cols., 1985b). Se ha visto, que la pérdida de respuesta a la acción inhibitora de TGF- β puede dar lugar a la división incontrolada de células cancerosas. Estas células pueden haber perdido la capacidad de convertir al TGF- β en su forma activa, o pueden carecer de receptores de membrana para dicho factor.

Otra molécula estimuladora o inhibitora, dependiendo de las circunstancias, es el factor de necrosis tumoral (TNF), el cual, constituye un punto de atención por su posible papel en el tratamiento anticáncer. Este factor es un potente estimulador para

cierto tipo de células normales, incluyendo fibroblastos, pero al mismo tiempo, estimula la producción de interferón tipo β , que inhibe la división celular (VILCEK y cols., 1986). Esto último, puede ser un mecanismo "feed-back" que mantiene el crecimiento en límites normales.

La toxina del cólera puede inhibir o estimular la síntesis de DNA y la división celular, dependiendo del tipo celular examinado (PRUSS y HERCHMAN, 1979; ROZENGURT y cols., 1981b).

Otro ejemplo lo constituye el TIF-1 (tumor cell growth-inhibiting factor) aislado por IWATA y cols. (1985) en la línea celular A-673 de un rhabdiosarcoma humano. Este factor puede inhibir el crecimiento de gran número de líneas celulares tumorales, mientras estimula el de varias líneas celulares normales.

Otros factores estimuladores del crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (BUSS y cols., 1982) e interleukina-2 (SUGAMURA y cols., 1985; HATAKEYAMA y cols., 1985), pueden inhibir el crecimiento de algunas líneas celulares transformadas.

Por tanto, los agentes estimuladores del crecimiento y los inhibidores pueden ser capaces de inducir respuestas contrapuestas. No obstante, no se puede hablar, en sentido estricto, con los términos anteriores, sino que es más correcto llamar a estos factores como predominantemente estimuladores o predominantemente inhibidores de la proliferación celular. Lo que finalmente le sucede a la célula (aumento o descenso en la división) depende de cuál de las actividades contrapuestas predomine. Un cambio celular que perturbe algunas de las fuerzas reguladoras puede alterar el delicado equilibrio entre ambas, determinando el desarrollo de un cáncer.

La transformación maligna celular, al menos en cultivo, parece deberse a los oncogenes. Aparentemente, estos se producen cuando los genes celulares, que controlan normalmente el crecimiento y la diferenciación, sufren una alteración estructural o regulatoria que determina una estimulación intensa de la proliferación celular.

No obstante, aunque no se han aislado todavía genes supresores de tumores, hay evidencias que indican que tales genes existen y que su pérdida puede ser uno de los pasos requeridos para el desarrollo del cáncer. Por tanto, las células normales pueden contener información genética que suprime el desarrollo de tumores. La forma exacta en que los genes supresores actúan no se conoce aún. Algunos podrían ser necesarios para la diferenciación normal, o incluso podrían contrarrestar la acción de los oncogenes.

La transformación maligna completa, "in vitro", de células normales requiere al menos dos pasos:

- 1) Deben ser inmortalizadas (capacidad de dividirse indefinidamente en cultivo) por carcinógenos químicos o por ciertos oncogenes.

- 2) Deben ser capaces de formar tumores malignos en animales.

Parece ser que para adquirir esta segunda propiedad, se requiere la pérdida de la función supresora, es decir, la pérdida de los genes supresores.

El esfuerzo de los investigadores se concentra en clonar los genes supresores de tumores. Si se llega a lograr esto, puede que el desarrollo de los factores que inhiben el desarrollo de la proliferación celular y la formación de tumores iguale al desarrollo de los factores estimuladores.

A continuación, vamos a estudiar los factores estimuladores de la proliferación celular y después los factores inhibidores, aunque como decíamos antes, hay algunos de ellos que pueden estimular o inhibir la proliferación según las circunstancias en que se encuentren, y las concentraciones a las que actúen.

7. FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO CELULAR

7.1. POLIAMINAS

La 1,4-butanodiamina (putrescina) y dos de sus poliaminas derivadas, espermidina (una triamina) y espermina (una tetramina), son compuestos básicos que se hallan en todas las células

vivientes. Se encuentran en concentraciones muy diversas en los tejidos, plantas, animales, bacterias y hongos, pero en general, su concentración es baja en las células de crecimiento lento e inactivas y alta en las células de crecimiento rápido.

Muchas observaciones han sugerido que la síntesis de poliaminas está íntimamente relacionada con la síntesis de ácidos nucleicos, y algunos investigadores han indicado que controlan la síntesis de estos ácidos.

HEBY y cols. (1978) demostraron que los cultivos celulares, en los que eran eliminadas las poliaminas, no sobrevivían más de una generación, siendo su presencia esencial para un óptimo crecimiento celular. Parece confirmar este hecho el que sustancias inhibidoras de la biosíntesis de poliaminas provocan una parada en las células a nivel de la fase G₁. Se ha evidenciado, igualmente, su papel estimulador en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. El mecanismo de actuación se debe al carácter polibásico de las poliaminas, que facilitan su conexión con los ácidos nucleicos (TABOR Y TABOR, 1984).

Por otro lado, el proceso de síntesis de las poliaminas, a partir de la ornitina, se realiza a través de un sistema de descarboxilación y reacciones de transferasas. La velocidad de la biosíntesis parece ser controlada por la primera enzima del sendero, la ornitina-descarboxilasa, que elimina el grupo carboxilo de la ornitina para producir putrescina. Se ha comprobado que esta enzima presenta unos niveles bajos durante el estadio de reposo celular, pero que se incrementa rápidamente durante la proliferación celular (HEBY, 1983).

En lo referente a tumores, se sabe que muchos de ellos contienen altos niveles de ornitina-descarboxilasa y poliaminas. Esto no implica una relación directa del proceso neoplásico con un incremento de poliaminas, sino que simplemente puede reflejar la variación normal del metabolismo de una célula proliferante.

7.2. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas son una clase de lípidos producidos en el organismo en cantidades diminutas y que son rápidamente degradados por enzimas catabólicas.

Todas las prostaglandinas son variantes de un ácido de 20 carbonos, que contienen un anillo de ciclopentano, el ácido prostanico. Su síntesis se realiza en el organismo a partir de ciertos ácidos insaturados, siendo uno de los precursores más comunes el ácido araquidónico. Dado que no hay indicación de que se produzca su almacenamiento intracelular y que la principal fuente productora de ácido araquidónico son los fosfolípidos, es probable que a medida que se vayan necesitando las prostaglandinas se sintetizen en las membranas celulares o bien cerca de ellas.

La PG $F_{2\alpha}$ es la prostaglandina estimuladora del crecimiento celular por excelencia. Su efecto parece estar modulado por hormonas tales como la insulina y la hidrocortisona (JIMENEZ DE ASUA y cols., 1982).

Según SMITH y cols. (1984), en la estimulación de la proliferación celular parece intervenir la PG $F_{2\alpha}$ en combinación con la PG E a bajas dosis y factores polipeptídicos del crecimiento. La PG $F_{2\alpha}$ estimula la proliferación en dos fases cinéticas: progresión a través de la fase que antecede a la intensa proliferación celular, y a continuación, la iniciación de la síntesis de DNA. La PG E, a bajas dosis, parece actuar en la estimulación de la proliferación celular, regulando la entrada en la fase S.

Se ha atribuido al AMPc el papel inhibidor de la proliferación celular característico de las prostaglandinas E_1 y E_2 , como veremos más adelante. Según OTTO y cols. (1982), la PG $F_{2\alpha}$ no afecta a los niveles de AMPc (debería disminuir), por lo que RUDLAN y JIMENEZ DE ASUA (1979) niegan el efecto regulador del AMPc.

7.3. OTROS LÍPIDOS ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO CELULAR

Se ha demostrado que las lipoproteínas de tumores murinos ascíticos, y los lípidos extraídos de estas lipoproteínas, inducen el crecimiento de macrófagos peritoneales *in vitro*.

Hasta ahora, se creía que los macrófagos eran células postmitóticas que no se dividen en condiciones normales en los tejidos (VIROLAINEN y DIFFENDI, 1967; VAN FURTH y cols., 1982). Sin embargo, se ha comprobado que la proliferación de macrófagos ocurre "in vivo" durante la inflamación (BITTERMAN y cols., 1984), en tumores (STEWART, 1983; EVANS y CULLEN, 1984) y en el bazo (VAN FURTH y DISSELHOFF-DEN DULK, 1984).

Parece ser, que los lípidos tienen un papel destacado en la proliferación tisular de los macrófagos. Se ha demostrado que estas células comienzan a proliferar tras la adición de fluido ascítico de tumores a medio de cultivo (YAMAZAKI y cols., 1983; YUI y cols., 1984), y que las lipoproteínas separadas del fluido ascítico y los lípidos de estas lipoproteínas (YUI y cols., 1985) inducen el crecimiento de macrófagos.

Además, varias funciones de los macrófagos, como fagocitosis y citotoxicidad de células tumorales, son influenciadas por lípidos (MAHONEY y cols., 1977; SCHROIT y GALLILY, 1979; TAKENURA-HATTORI y cols., 1980; SCHLAGER y cols., 1983).

Según YUI y YAMAZAKI (1986), los componentes de lipoproteínas estimuladoras de la proliferación de macrófagos son el colesterol y sus ésteres, así como los triglicéridos. Los fosfolípidos pueden ser esenciales por ser necesarios para formar vesículas lipídicas o liposomas, pero no parecen estimular directamente la proliferación. Así, la fosfatidilserina facilita la captación de liposomas por parte de los macrófagos (RAZ y cols., 1981).

Los hechos anteriores parecen tener una implicación clínica. Se ha demostrado que los ésteres de colesterol y los triglicéridos se acumulan en el citosol de macrófagos en el estado de hipertrigliceridemia (PARKER y cols., 1970; GIANTURCO y cols., 1982; LINDQUIST y cols., 1983). Por tanto, el crecimiento de macrófagos, estimulado por dichos ésteres de colesterol o

triglicéridos, podría ser una reacción defensiva frente a la acumulación lipídica.

Por otra parte, los macrófagos han sido implicados en la fisiopatología de la arterioesclerosis. De hecho, las células formadoras de las placas arterioescleróticas, parecen derivarse, al menos en parte, de macrófagos (FOWLERS y cols., 1979; SCHAFFNEER y cols., 1980). Además, los macrófagos pueden eliminar las lipoproteínas en exceso del espacio intersticial de la pared arterial (BROWN Y GOLDSTEIN, 1983) o las lipoproteínas alteradas o anormales (FOGELMAN y cols., 1980), las cuales, estimularían a su vez su proliferación.

7.4. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

El factor de necrosis tumoral fue descrito como una sustancia antitumoral presente en el suero de animales tratados con endotoxina (CARSWELL y cols., 1975). También se ha encontrado en el medio de cultivo de algunas células, tales como monocitos (MATTEWS, 1978; MATTEWS, 1981) y células leucémicas promielocíticas humanas (PENNICA y cols., 1984). Además, recientemente, se ha producido TNF recombinante humano en *Escherichia coli* (PENNICA y cols., 1984).

El TNF es una proteína derivada de monocitos/macrófagos, cuyo papel principal es, presumiblemente, ser mediador de citotoxicidad para células tumorales (HELSON y cols., 1979; HARAVAKA y cols., 1984). Este factor está referido, estructural y funcionalmente, a linfoquinas derivadas de linfocitos (PENNICA y cols., 1984), y ambos son citotóxicos o citostáticos para algunos tipos de células tumorales. Por contra, líneas celulares no transformadas son generalmente resistentes a la acción citotóxica o citostática de estas dos proteínas (RUFF y GIFFORD, 1981; EVANS, 1982). Recientemente, se ha atribuido al TNF un papel en la defensa frente a parásitos (TAVERNE y cols., 1984). Asimismo, se ha visto que está estrechamente ligado, o es posiblemente idéntico, a otra proteína derivada de monocitos, la caquetina (BEUTLER y cols., 1985a; BEUTLER y cols., 1985b).

TSUJIMOTO y cols. (1985) demostraron que las células susceptibles a la acción citotóxica del TNF, así como células

resistentes a la misma, podían tener un número similar de receptores específicos de alta afinidad para dicho factor. Por tanto, no se ha encontrado una correlación entre el número de receptores, o su afinidad para TNF, y la susceptibilidad de las células a la acción citotóxica del mismo (TSUJIMOTO y cols., 1986). Esto sugeriría, además, que el TNF podía mediar otra función biológica, y ésta, podría ser la estimulación de la proliferación celular.

LEE y cols. (1984) observaron que la linfoxina humana podía estimular el crecimiento celular. Posteriormente, VILCEK y cols. (1986) han referido que el TNF recombinante humano altamente purificado puede estimular la proliferación de la línea de fibroblastos humanos FS-4. La estimulación era demostrable a una concentración de 10 pg/ml de TNF, y era máxima a 10 ng/ml.

La acción estimuladora de la proliferación celular del TNF puede ser incrementada por otros factores de crecimiento, tales como insulina o factor de crecimiento epidérmico (EGF). La insulina parece tener un efecto sinérgico con el TNF, mientras que las acciones del EGF y TNF son menos que aditivas, sugiriendo que ambos pueden activar mecanismos idénticos o similares. Probablemente, tanto TNF como EGF, al igual que otros factores de crecimiento, podrían provocar cambios bioquímicos similares al unirse a sus receptores, tales como la activación de la proteína-kinasa C (COHEN y cols., 1980; EK y HELDIN, 1982) y la inducción de genes celulares involucrados en la regulación del ciclo celular, incluyendo c-myc (ARMELIN y cols., 1984) y c-fos (GREENBERG y ZIFF, 1984).

Otros factores derivados de monocitos/macrófagos, tales como la interleukina-1, han demostrado también su capacidad para estimular la proliferación de fibroblastos (SCHMIDT y cols., 1982).

Por contra, tanto el interferón gamma (IFN- γ) como el interferón beta (IFN- β), han demostrado su capacidad para inhibir la acción estimuladora de la proliferación celular por parte del TNF. El mecanismo se desconoce, pero puede que inhiban la expresión de genes reguladores, como el c-myc, inducida por factores de crecimiento (JONAK y KNIGHT, 1984). Puesto que los interferones y el TNF o linfoxina son producidos a menudo por las mismas

poblaciones celulares en respuesta al mismo estímulo (STONE-WOLFF y cols., 1984), las interacciones entre los mismos pueden tener una significación biológica "in vivo".

7.5. FACTORES DE CRECIMIENTO POLIPEPTIDICOS (PGFs: Polypeptide Growth Factors)

Los factores de crecimiento polipeptídicos parecen ser una pieza clave en el mecanismo de regulación del crecimiento celular, de tal forma, que es posible que, tanto los factores inhibidores como los estimuladores, desarrollen su efecto a través de los PGFs. Incluye este grupo una gran variedad de polipéptidos, responsables al parecer, de la proliferación y diferenciación de las células en tejidos específicos. Para algunos tejidos, estos factores de crecimiento, no sólo son necesarios para la estimulación de la proliferación de células inmaduras, sino también para su supervivencia (TUSHINSKY y WARNER, 1982).

Por otra parte, el estudio de los mismos no tiene sólo una importancia biológica, sino también clínica (CHATELAIN, 1985). Como ejemplo de esto, tenemos el efecto de factores de crecimiento en el proceso de replicación y diferenciación de células óseas, imprescindible en la consolidación de fracturas y reparación de diversas enfermedades de los huesos (CANALIS, 1985).

Según JAMES y BRADSHAW (1984), para que una sustancia pueda ser considerada como PGF debe reunir, como mínimo, una serie de requisitos:

- La mayor parte de la estructura está formada de material polipeptídico.
- La iniciación de la respuesta ocurre en el exterior de la célula diana.
- Las respuestas son iniciadas, exclusivamente, por la formación de complejos con el receptor específico.
- De la formación del complejo receptor-factor de crecimiento resulta una respuesta hipertrófica y/o hiperblástica.

- El PGF y su receptor son separados de la superficie celular por endocitosis receptor-mediada, con el fin de degradación (o reciclaje del receptor).

- Debe ser producida, transportada e interactuar con células diana de un modo consistente, en un proceso fisiológico normal o regulado.

La complejación del PGF con su receptor correspondiente produce respuestas rápidas o lentas de crecimiento, que generalmente envuelven estimulación del metabolismo anabólico de la célula y modulación en la expresión, sea en el nivel translacional o transcripcional.

Aunque la generación de segundos mensajeros, como resultado de la formación del complejo PGF-receptor, parece verosímil, hay opiniones contradictorias al respecto.

Los PGFs son claramente distintos de las hormonas que producen nucleótidos cíclicos como segundo mensajero, pero se ajustan, razonablemente bien, dentro de una vasta categoría de hormonas descritas como de mantenimiento permisivo, o de crecimiento (ANTONIADES y OWEN, 1982). A pesar de que los PGFs son claramente distintos de las hormonas que producen nucleótidos cíclicos como segundo mensajero, se ha visto que ambos estimulan la proliferación e inhiben la motilidad de fibroblastos quiescentes 3T3 (O'NEILL y cols., 1985). Además, como hemos visto con anterioridad, algunos factores de crecimiento polipeptídicos, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), pueden activar el metabolismo de los fosfoinositoles de membrana, incrementando los niveles de inositol-1,4,5-trifosfato ($\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$) y diacilglicerol, y éste último, a su vez, podría influenciar los niveles de nucleótidos cíclicos, en el proceso de transmisión de la señal de estimulación de la proliferación celular.

Por tanto, no parece estar claro si los nucleótidos cíclicos están involucrados como segundos mensajeros o no lo están. Puede que funcionen como tales para algunos factores de crecimiento y para otros no.

Se ha observado que ciertos factores de crecimiento polipeptídicos, al unirse a sus receptores específicos, provocan

que éstos desarrollen una actividad enzimática tirosín-kinasa, capaz de fosforilar residuos de tirosina en proteínas de membrana y citoplasmáticas (USHIRO y COHEN, 1980; NEWMARK, 1985). No obstante, al ser muchos los sustratos sujetos a esta acción enzimática, resulta difícil explicar cuáles de estas fosforilaciones de tirosina son las responsables de la división celular.

Por otra parte, se ha visto que diversos factores de crecimiento mitogénicos regulan la actividad colin-kinasa y la biosíntesis de fosfatidilcolina en fibroblastos 3T3 (WARDEN y FRIEDKIN, 1985).

Ultimamente, se han sugerido como sustratos más probables ciertas proteínas citoesqueléticas e intermedias, tales como tubulina, vinculina y actina. Se ha observado que basta que una pequeña proporción de estas proteínas (por ejemplo, las más cercanas a las membranas citoplasmática y nuclear) sean fosforiladas para que se produzcan cambios topográficos del citoesqueleto o de la matriz nuclear (STEINERT y cols., 1982); estas perturbaciones podrían, a su vez, estar relacionadas con el crecimiento celular. De esta manera, los PGFs serían los inductores de estas fosforilaciones de proteínas específicas del citoesqueleto.

Estas observaciones explicarían también la estrecha relación que se encuentra entre algunos factores de crecimiento, ciertos productos oncogénicos y proteínas citoesqueléticas.

El mecanismo de transporte de los PGFs a su célula diana parece ser principalmente paracrino, aunque se han identificado importantes ejemplos de mecanismo de transporte endocrino (insulina y factores de crecimiento insulín-semejantes) y autocrinos (factores de crecimiento transformantes). Dentro del transporte paracrino, los factores de crecimiento pueden ser producidos por células muy diferentes a aquellas sobre las que actúan. Recientemente, se ha descubierto un factor derivado de células endoteliales que estimula el crecimiento de células mononucleares sanguíneas periféricas (McCARTHY y cols., 1985).

La interacción de PGFs con las membranas plasmáticas, generalmente, produce una estimulación trópica que, en compañía de

otras respuestas, está caracterizada por una elevación metabólica y modulación de flujos iónicos (BRADSHAW y RUBIN, 1980). Estos cambios, presumiblemente, producen la activación de moléculas transportadoras apropiadas en la membrana, más que simples cambios en la porosidad de la misma. El efecto neto es el incremento del metabolismo anabólico, que puede servir para preparar la célula para el proceso de replicación (HAIGLER, 1983).

Los PGFs han sido subdivididos en dos grupos, según sea la respuesta de la célula tras su estimulación mitogénica: de progresión y de competencia (STILES y cols., 1979). Los factores de la clase de progresión son capaces de estimular a la célula a pasar a la fase S (síntesis de DNA). Los factores de competencia son solamente capaces de preparar las células, pero requieren asistencia, en la forma de factores adicionales, para llevarlos al principio de la síntesis de DNA.

La forma de actuación de estos PGFs no parece ser universal. Así, mientras que unos producen la respuesta mitogénica con cortos periodos de exposición, otros necesitan periodos mucho más largos.

A continuación, describiremos con más detalle algunos de los factores de crecimiento polipeptídicos mejor conocidos.

7.5.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF).

El factor de crecimiento epidérmico fue aislado, inicialmente, de la glándula submaxilar de ratón, cuyo extracto, inyectado en ratones recién nacidos, indujo una apertura precoz del párpado y la salida prematura de los incisivos (COHEN, 1962). Dicho efecto se debía a una estimulación del crecimiento epidérmico y de la keratinización (COHEN y TAYLOR, 1974).

Posteriormente, el DNA complementario del EGF clonado de ratón fue secuenciado por CARPENTER y COHEN (1979), encontrando que era un polipéptido de 53 aminoácidos, de bajo peso molecular (5700 d.), termoestable y no dializable. El gen que codifica al EGF humano se encuentra en el brazo q del cromosoma 4 (BRISSENDEN y cols., 1984), en la misma región que los genes del factor de crecimiento de células T (TCGF) y del factor de crecimiento transformante alfa

(TGF- α). Estos mismos autócoros sugieren que el EGF, TCGF y TGF- α deben pertenecer a la misma familia genética.

Se ha observado que la urogastrona, hormona antisecretoria gástrica, aislada por GREGORY (1975) en la orina humana, presenta una secuencia muy parecida a la de EGF. No obstante, se han detectado ciertas diferencias en la composición de aminoácidos, lo que hace pensar en una estrecha relación, pero no en su identidad.

Algunos factores pueden imitar parte o todos los efectos del EGF (KING y CARPENTER, 1983). No obstante, para que a un compuesto se le asignen propiedades similares al EGF, debe unirse, interaccionar o modular los receptores específicos de membrana para dicho factor (CARPENTER y COHEN, 1984). Un factor que cumple esas características es el TGF- α .

Decíamos antes, que el EGF estimula el crecimiento epidérmico y la keratinización. No obstante, los efectos del EGF no se limitan a tejidos epiteliales. Muchas líneas celulares responden mitogénicamente a dicho factor o presentan receptores para el mismo en su membrana. Entre éstas, se incluyen los fibroblastos, células del cristalino, células renales, células gliales, células de la granulosa del ovario y células de carcinoma epidermoide (DAS, 1982). Además, se ha detectado EGF en tiroides, páncreas, glándula submaxilar, duodeno, yeyuno, riñón y líquido cefalorraquídeo.

A nivel celular, se ha visto que el EGF estimula la síntesis de proteínas, RNA y DNA (KING y CARPENTER, 1982), aumenta la captación de nutrientes, incluido el Ca^{++} (SAWYER y COHEN, 1981), altera el metabolismo del fosfatidilinositol (SMITH y cols., 1983) y aumenta la liberación de ácido araquidónico (AOYAGI y cols., 1985)

La estructura completa primaria del receptor para EGF fue deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de los clones de DNA (ULLRICH y cols., 1984), tras conocer su secuencia parcial (DOWNWARD y cols., 1984). Su purificación se hizo por cromatografía de inmunoafinidad (YARDEN y cols., 1985). El gen que lo codifica está situado en el cromosoma 7 en el ser humano.

El receptor maduro es una glicoproteína transmembrana y está compuesto por 1186 residuos de aminoácidos, que están precedidos en

su extremo NH₂-terminal por un péptido señal de 24 aminoácidos hidrofóbicos.

Una vez que se une el EGF a su receptor, éste es internalizado a través de las membranas del retículo endoplasmático. Aquí, se rompe el péptido señal y el receptor es glicosilado y transportado a través del aparato de Golgi a la membrana plasmática (DAS, 1982).

El receptor maduro está compuesto de tres elementos estructurales principales. El primero es un dominio extracelular de enlace al EGF, compuesto de 621 residuos de aminoácidos, anclado a la membrana plasmática por una sola región transmembrana de 23 aminoácidos hidrofóbicos. La región transmembrana está seguida de una secuencia formada, en su mayoría, por residuos básicos.

El dominio citoplasmático del receptor para EGF está compuesto de 542 aminoácidos. Contiene una región de aproximadamente 300 residuos de aminoácidos, que es homóloga al dominio catalítico de la proteína tirosín-kinasa, codificada por el gen src de la familia de oncogenes (HUNTER y COOPER, 1985).

El dominio extracelular del receptor para EGF contiene una alta proporción de residuos de cisteína enclavados en dos regiones, cada 160 residuos aproximadamente. Estos dominios, ricos en cisteína, han sido encontrados también en el receptor para insulina (EBINA y cols., 1985; ULLRICH y cols., 1985), y en la proteína HER 2/neu, la cual, probablemente funcione como un receptor de membrana para un factor de crecimiento aún no conocido (SCHECHTER y cols., 1984; COUSSENS y cols., 1985). El dominio rico en cisteína de los receptores para factores de crecimiento, probablemente, derive de un gen ancestral común (LIVNEH y cols., 1985).

También se ha demostrado que el gen para el receptor EGF es amplificado y reexpresado en muchos tumores cerebrales de origen glial (LIBERMANN y cols., 1985). La sobreexpresión resultante del receptor para EGF puede jugar un papel en el desarrollo y progresión de estos tumores.

Otras experiencias (TODARO y cols., 1976; HIRATA y cols., 1983; HENDLER y OZANNE, 1984; LIBERMANN y cols., 1984; LIN y cols., 1984; KAMATA y cols., 1986; KORC y cols., 1986) han mostrado que el número de receptores para EGF puede estar incrementado o disminuido

en diversas células transformadas con respecto a sus homónimas normales. Igualmente, se ha demostrado que el ácido retinóico puede regular el número de receptores para EGF en la superficie celular en diversas líneas celulares establecidas de fibroblastos murinos transformados (JETTEN, 1980; JETTEN, 1982; ROBERTS y cols., 1984; ROBERTS y cols., 1985a).

Experimentos de fijación de 125 EGF al receptor para EGF en células vivas, han revelado dos estados de afinidad diferentes de dicho receptor (KING y CUATRECASAS, 1982). Aproximadamente, el 10% del total de receptores son de alta afinidad. Esto se correlaciona bien con la ocupación óptima requerida para iniciar la síntesis de DNA, y por eso, se ha sugerido que el receptor de alta afinidad juega un papel en el procesamiento de la señal mitogénica.

La fijación de EGF a su receptor induce la activación de la proteína tirosin-kinasa (CARPENTER y COHEN, 1979), la cual, fosforila varias proteínas celulares, así como, al propio receptor para EGF. Se ha sugerido que la autofosforilación de dicho receptor regula su capacidad para fosforilar sustratos exógenos (BETRICKS y GILL, 1985).

Algunos estudios (PRYWES y cols., 1986) han sugerido que la actividad tirosin-kinasa no es necesaria para internalizar el receptor para EGF, ni para estimular la mitogénesis. Esta última acción podría derivarse de la activación del ciclo del fosfatidilinositol de la membrana celular, que conlleva la movilización de Ca^{++} y la activación de la proteína-kinasa C, con liberación de ácido araquidónico y sus metabolitos (AOYAGI y cols., 1985). De hecho, el EGF parece modular la actividad de ciclooxigenasas o lipooxigenasas, alterando el metabolismo de las prostaglandinas, y esto, podría derivar de la liberación de ácido araquidónico y sus metabolitos. Además, dicha liberación es de gran interés, ya que esto podría probar su intervención en los mecanismos de crecimiento, promoción tumoral, inflamación, e incluso, transporte y secreción a través de membranas. No obstante, estas últimas acciones, atribuidas al EGF, podrían derivar de su interacción con otros factores de crecimiento.

Recientes hallazgos, sugieren que varios ligandos que actúan a través de una transmodulación del receptor (ROZENGURT y COLLINS, 1983), como ésteres de forbol (BROWN y cols., 1979; LEE y WEINSTEIN, 1979; SHOYAB y cols., 1979), vasopresina (ROZENGURT y cols., 1981a), bombesina (BROWN y cols., 1984); PDGF (WRANN y cols., 1980; BOWEN-POPE y cols., 1983; COLLINS y cols., 1983) y FDGF (ROZENGURT y cols., 1982), pueden modular la afinidad del receptor de EGF para un gran número de mitógenos, ligados estructuralmente al mismo (MAGUN y cols., 1980; SALOMON, 1981; SINNETT-SMITH y ROZENGURT, 1985).

Estos ligandos abolirían el estado de alta afinidad de dicho receptor, reduciendo su actividad tirosin-kinasa (COCHET y cols., 1984; IWASHITA y FOX, 1984). El mecanismo, a través del cual, realizan la acción anterior, podría ser diferente según el tipo de ligando. Así, los ésteres de forbol parecen bloquear la estimulación del intercambio Na^+/H^+ , inducida por el EGF (WHITELEY y cols., 1984; WHITELEY y cols., 1986). La bombesina podría incrementar la concentración de Ca^{++} en el citosol. No obstante, recientes hallazgos obtenidos con células intactas (DAVIS y CZECH, 1984; IWASHITA y FOX, 1984; SINNETT-SMITH y ROZENGURT, 1985) y con sistemas libres de células (COCHET y cols., 1984; HUNTER y cols., 1984), sugieren que la activación de la proteína-kinasa C puede jugar un papel central en la modulación de la afinidad del receptor para el EGF. Distintos ligandos heterólogos al EGF podrían estimular el metabolismo de los fosfoinosítoles de membrana, activando la proteína-kinasa C. Esta, a su vez, fosforilaría el receptor de EGF en varios sitios (CASTAGNA y cols., 1982; HUNTER y cols., 1984), determinando un mecanismo de retrocontrol negativo para la actividad del receptor de EGF (WHITELEY y GLASER, 1986), disminuyendo la afinidad por sus ligandos y su actividad tirosin-kinasa.

Como se ve, el funcionamiento del receptor para EGF parece ser un tanto complejo. Lo que sí está claro, es que dicho receptor es una proteína alostérica multifuncional, con varios sitios de regulación. Estos sitios modulan varias funciones del receptor, tales como: afinidad por ligandos, separación del receptor y

endocitosis, actividad tirosín-kinasa y el estado de fosforilación del receptor (SCHLESSINGER, 1986).

7.5.2. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF).

La posibilidad de que las plaquetas contuvieran factores mitogénicos se sugirió a partir de experimentos que comparaban la actividad promotora del crecimiento de sueros preparados en presencia y ausencia de plaquetas. El suero preparado en presencia de plaquetas era mucho más activo (KOHLER y LIPTON, 1974).

Dentro de las plaquetas, el PDGF ha sido localizado en los gránulos alfa, en estudios plaquetarios de pacientes con defectos específicos de dichos gránulos (GERRARD y cols., 1980), mediante fraccionamiento de las organelas subcelulares (KAPLAN y cols., 1979), y estudiando la distinta liberación de los componentes de los gránulos por plaquetas activadas con diferentes agentes (WITTE y cols., 1978).

El PDGF es un polipéptido termoestable de un peso molecular de 32000. Al parecer, consta de dos cadenas polipeptídicas de peso molecular: 14000 y 17000 d., unidas covalentemente por puentes disulfuro. No obstante, la electroforesis de preparaciones altamente purificadas de PDGF ha demostrado que existen al menos cuatro formas del mismo, con pesos moleculares de 27000, 28500, 29000 y 31000 d. (RAINES y ROSS, 1982). Todas las especies parecen ser activas en la estimulación de la síntesis de DNA y en la unión a los tipos celulares respondedores, y todos muestran una gran homología secuencial.

Estudios con cultivos celulares han demostrado que los efectos debidos al PDGF dependen de su tiempo de actuación.

Así, en pocos minutos, el PDGF estimula la fosforilación de la tirosina en una proteína de membrana de peso molecular 170000 d. (PIKE y cols., 1983), que se piensa que es el receptor para el PDGF. También estimula la fosforilación de varias proteínas citoplasmáticas, aumenta el metabolismo de fosfatidil-inositol y del ácido araquidónico, causa la aparición de rizos y microvilli en la membrana celular, reduce la unión de ^{125}I -EGF a su receptor,

aumenta la entrada de aminoácidos y estimula la actividad de la bomba Na^+/K^+ .

Tras un periodo de horas, el PDGF aumenta el número de receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDL) y para somatomedinas, induce la quimiotaxis de células de músculo liso vascular, fibroblastos y monocitos e incrementa la síntesis de proteínas.

Por último, tras varios días, el PDGF estimula la proliferación celular y mantiene su viabilidad.

Parece ser, que el PDGF predispone a la célula para la activación por otros factores de crecimiento (factores de competencia), como por ejemplo, las somatomedinas, la insulina y el EGF. Cada uno de estos factores actúa sobre distintos receptores de membrana, pero la conexión del PDGF con su receptor específico, durante breve tiempo, parece regular a los receptores para EGF y somatomedinas, que necesitan más tiempo de unión para estimular el crecimiento celular.

Con la publicación de la secuencia parcial de aminoácidos del PDGF humano (ANTONIADES y HUNKAPILLER, 1983), se ha observado una relación estructural muy estrecha entre dicho factor y una proteína sintetizada por células mesenquimales transformadas por el virus del sarcoma de simio (SSV) (DEVARE y cols., 1983).

En casi todas las ocasiones, la transformación por un virus tumoral tiene por resultado un marcado descenso en el número de receptores para PDGF en las células. En algunos casos, la reducción de los receptores se acompaña de secreción al medio de cultivo de moléculas PDGF-semejantes. También se ha encontrado, que células endoteliales vasculares cultivadas producen una molécula PDGF-semejante (DI CORLETO y BOWEN-POPE, 1983).

ROSS (1981) propuso que el PDGF juega un papel importante en la proliferación de células del tejido conectivo que caracteriza el proceso normal de reparación de heridas y la formación de lesiones arterioescleróticas. La hipótesis básica que subyace en esta teoría, es que el PDGF, normalmente, está secuestrado dentro de los gránulos alfa plaquetarios, y que circula así hasta que la plaqueta es inducida a desgranularse, por ejemplo, como resultado del

contacto con superficies subendoteliales expuestas como consecuencia de una lesión vascular. Una vez liberado, el PDGF se une y activa las células cercanas del tejido conectivo. El estímulo quedaría localizado en los sitios de activación plaquetaria, por la inactivación y aclaramiento del PDGF que es transportado lejos de los sitios de lesión, así como, por la capacidad del endotelio intacto de impedir el paso de PDGF a los tejidos no dañados.

Aparte de las células del tejido conectivo, se ha demostrado que otras células pueden unirse y responder al PDGF, tales como fibroblastos humanos, células de músculo liso arterial, células gliales y fibroblastos de ratón 3T3 (BOWEN-POPE y ROSS, 1984).

Las células del endotelio vascular no se unen ni responden al PDGF en cultivo, así como tampoco lo hacen las líneas celulares epitelioideas, células musculares estriadas, hematíes y linfocitos.

En todos los tipos celulares cultivados, que responden mitogénicamente al PDGF, se ha demostrado que expresan receptores específicos de alta afinidad para dicho receptor. Este número de receptores varía en las células musculares lisas vasculares entre 38000 en humanos y 79000 en asnos (BOWEN-POPE y ROSS, 1984).

La especificidad del receptor PDGF para este factor es muy estrecha. Otras proteínas humanas de los gránulos alfa plaquetarios, incluidas el factor 4 plaquetario, beta-tromboglobulina y trombospondina no compiten en la unión con el receptor (BOWEN-POPE y ROSS, 1984). Otras sustancias mitogénicas, como EGF, PDGF, NGF e insulina, también son incapaces de unirse al receptor de PDGF.

El receptor de PDGF es monomérico, con un peso molecular de 180000 d., y muy similar en tamaño al receptor para EGF y LDL. Parece ser, que la formación del complejo PDGF-receptor, se sigue rápidamente de la entrada de dicho factor en el interior de la célula y de su consiguiente degradación.

La unión del PDGF a su receptor activa el metabolismo de los fosfoinosítoles de membrana, y toda la serie de acontecimientos que derivan de dicha activación, como hemos visto anteriormente en esta introducción. Pero además, se ha comprobado que la tirosín-kinasa forma parte del receptor para el PDGF, el cual, estimula la

fosforilación de una proteína tirosín-específica (HASEGAWA-SASAKI, 1985).

Por tanto parece ser que el PDGF puede estimular la proliferación celular a través de un doble mecanismo, el metabolismo de los fosfoinositoles de membrana y la tirosín-kinasa, aunque la conexión que pudiera haber entre ambos permanece desconocida. Es posible que ambos mecanismos actúen sinérgicamente iniciando la proliferación celular.

7.5.3. FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF),

El NGF fue aislado inicialmente por COHEN (1960), a partir de glándulas submaxilares de ratones machos, como una proteína de peso molecular de 44000 d. Posteriormente, VARON y cols. (1967) mostraron que el NGF también podía ser purificado en forma de un complejo de alto peso molecular (140000 d.), que en presencia de buffers ácidos o alcalinos se disociaba en tres subunidades. Al complejo de estas proteínas con alto peso molecular se le denominó 7S-NGF.

SCHUBERT (1984) describe al NGF como un conjunto de tres subunidades denominadas α_1 , α_2 y β , que retienen uno o dos iones de Zn^{++} . Parece ser, que la fracción que tiene actividad sobre las células nerviosas es la β , que es un dímero estable de 118 aminoácidos y peso molecular de 13259 d.

Un hecho importante del monómero NGF- β , es su similitud estructural con la proinsulina y factores de crecimiento insulín-semejantes. Alrededor del 25% de la secuencia homologa de estas regiones en el NGF se corresponde con las cadenas A y B de la insulina, y uno de los tres puentes disulfuro del NGF está en posición análoga al de la insulina. Según esto, existe la posibilidad de que el NGF, la proinsulina y los factores de crecimiento insulín-semejantes gocen de un gen ancestral común. De cualquier forma, aunque existiera tal gen común, la estructura del NGF y de la insulina han divergido hasta el punto de que la insulina no se une al receptor para NGF (RIOPELLER y cols., 1980).

La subunidad γ del 7S-NGF es una glicoproteína de 233 aminoácidos y peso molecular de 28000 d. (THOMAS y cols., 1981). La

subunidad α , es una proteína de peso molecular: 26500 d., y al igual que la anterior no tiene una función definida.

El complejo 7S-NGF está compuesto por un dímero de NGF- β , dos subunidades α y dos γ . El complejo tiene también dos átomos de Zn^{++} , que le proporcionan una gran estabilidad. El papel fisiológico del 7S-NGF no es entendido del todo, pero parece estar relacionado con el hecho de que el NGF- β es inactivo biológicamente cuando forma parte de dicho complejo. Por tanto, el 7S-NGF, la forma en que el NGF es secuestrado por las glándulas submaxilares de ratón y por otras células, puede servir como un almacenamiento extracelular de NGF- β .

Las neuronas sensoriales y simpáticas son los dos blancos principales del NGF. Numerosos estudios sostienen la importancia de este factor en su desarrollo, supervivencia y funcionamiento. Las consecuencias fisiológicas del tratamiento de neuronas sensoriales y simpáticas con NGF incluyen la supervivencia neuronal, crecimiento axonal y niveles aumentados de neurotransmisores.

Un papel importante del NGF es la regulación de niveles de neurotransmisores. El NGF induce en las neuronas simpáticas la síntesis de enzimas que están involucradas en la producción de neurotransmisores adrenérgicos (GREENE y SHOOTER, 1980). Asimismo, la inyección de NGF en ratas eleva los niveles de sustancia P, somatostatina y péptido intestinal vasoactivo, en los ganglios sensoriales (OTTEN y LOREZ, 1983).

Además de las neuronas sensoriales y simpáticas, varios tejidos pueden ser el blanco del NGF. Entre estos, se incluyen el sistema nervioso central (WALKER, 1982), neuronas parasimpáticas (HARPER y THOENEN, 1981) y ganglios retinales (TURNER y cols., 1982).

El receptor para NGF es una glicoproteína, cuyo tamaño y estructura de las subunidades, puede variar. En las células del melanoma humano se presentan dos formas de receptor con pesos moleculares de 85000 y 200000 d. (PUMA y cols., 1983).

Para la acción del NGF es importante el transporte axonal retrógrado de material desde la periferia hasta el cuerpo celular. Si se interrumpe este transporte en ratas, se produce la

degeneración de las neuronas simpáticas y una disminución en los niveles de sustancia P en las neuronas sensoriales (GOEDER y cols., 1981). Se han dado dos posibles explicaciones a esta señal transportada retrógradamente:

- El NGF liberado a los tejidos periféricos es internalizado mediante un proceso mediado por el receptor, y entonces, es transportado retrógradamente hasta el cuerpo celular (THOENER y cols., 1978). Por tanto, se ha propuesto que el mismo NGF internalizado es la señal intracelular.

- La otra posibilidad es que la señal sea producto de la internalización del receptor unido al NGF, y ser transportado retrógradamente al cuerpo celular (STEINMAN y cols., 1983).

Si de hecho, el NGF o el receptor activado, es una señal intracelular, la señal debe llegar al núcleo. Se ha propuesto que pueden existir receptores nucleares que son sitios intracelulares de unión para el NGF internalizado. No obstante, el NGF que es transportado retrógradamente hasta el cuerpo celular se acumula en estructuras vesiculares en lugares distintos del núcleo (ROHRER y cols., 1982). Otra posible explicación de la presencia de receptores nucleares asociados al NGF, es la translocación de un receptor, activado desde la membrana plasmática, hasta el núcleo.

THOENER y cols. (1978) propusieron el modelo, por el cual, los tejidos periféricos inervados por neuronas sensoriales y simpáticas eran la fuente de NGF para dichas neuronas. Según esto, los tejidos periféricos dirigen su propia inervación secretando EGF. Diversos estudios han aportado evidencias indirectas que parecen confirmar esta hipótesis (GREENE y SHOOTER, 1980; RICHARDSON y EVELDAL, 1982).

Por tanto, se puede concluir diciendo que el NGF humano es probablemente necesario para el normal desarrollo de las neuronas sensoriales y simpáticas, para la inervación de tejidos diana por estas neuronas, para la regulación de la actividad neurotransmisora en neuronas sensoriales y simpáticas adultas, y como un factor de supervivencia de larga vida para las neuronas simpáticas (DAUGHADAY y HEATH, 1984).

También cabe señalar, que aparte del NGF, otros neuropéptidos tienen gran importancia en la coordinación de la proliferación celular (HANLEY, 1985). Dentro de ellos, destaca la sustancia P y la sustancia K, que son péptidos pertenecientes a la familia de las taquikininas. NILSSON y cols. (1985) han demostrado que estas dos sustancias estimulan la síntesis de DNA en cultivos de células de músculo liso arterial y de fibroblastos de la piel.

7.5.4. FACTOR DE CRECIMIENTO DE CELULAS T (TCGF) o INTERLEUKINA-2 (IL-2)

La IL-2, denominada originariamente factor de crecimiento de células T, representa un elemento en la cascada de linfocinas liberadas durante la respuesta inmune (FARRAR y cols., 1982). Asociada con la proliferación de células T, la IL-2, directa o indirectamente, también juega un papel importante en la proliferación y maduración de otros tipos celulares (SMITH, 1980, ROBB, 1984).

La IL-2 es liberada por las células T, como respuesta a dos señales. La primera señal (estímulo) es el antígeno presentado en el contexto de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y la segunda es la interleukina-1 (IL-1), una linfocina con muchos papeles biológicos (SMITH, 1980).

Aunque todas las subclases de células T parecen capaces de liberar IL-2, bajo las condiciones apropiadas, las células T "helper" parecen ser la mayor fuente de la misma (PFIZENMAIER y cols., 1984). Una vez liberada, la IL-2 promueve la proliferación de células T con receptor para la misma (células T respondedoras) (SCHREIER y cols., 1980).

El TCGF humano tiene un peso molecular de 15000 d., y no presenta especie-especificidad. Sin embargo, el TCGF de ratón, que tiene un peso molecular de 25000, sí es especie-específico. Se ha demostrado recientemente, que el gen que codifica la IL-2 está localizado en el brazo q del cromosoma 4 humano (FUJITA y cols., 1983).

Como sucede con las hormonas polipeptídicas y otros factores de crecimiento (CARPENTER y COHEN, 1979; NILSSON y cols., 1983), el

mecanismo de acción de la IL-2 en la estimulación de la proliferación de células T, comprende la unión a receptores específicos de la membrana celular. Esta interacción se caracteriza por una afinidad particularmente elevada (ROBB y cols., 1981).

Las células en reposo tienen pocos sitios de unión para el factor. Tras estimulación antigénica o mediante mitógenos, la célula T activada exhibe de 4 a 12000 sitios de unión. De esta forma la célula se transforma de un estado no sensible a la IL-2 a un estado sensible a la misma.

Poco se conoce acerca del mecanismo de transmisión al núcleo de la señal de unión de la IL-2 a la membrana celular. Algunos experimentos indican que el complejo IL-2-receptor debe ser fosforilado, aunque no se sabe con seguridad, si se debe a la acción de la tirosin-kinasa (como ocurre con otros factores de crecimiento), ni tampoco, si la reacción es ligando-dependiente (ROBB y cols., 1981).

Independientemente de la naturaleza de la señal que transmite la información, el efecto de la unión de la IL-2 a su receptor es hacer que la célula progrese de la fase tardía G₁ del ciclo celular a la fase S. Esta conclusión está basada en el hallazgo de que la supresión de IL-2 en células T que se están dividiendo activamente, origina una detención de dichas células en la interfase G₁/S. La readición de IL-2 hace que estas células entren en la fase S, tras un periodo de latencia de 10 a 12 horas. La proporción de células que cambia de fase depende de la concentración de IL-2 (KLAUS y HAWRYLOWICZ, 1984).

Aunque la IL-2 está reconocida como un factor de crecimiento para células T, hay otras células que presentan receptores para la misma. Además, la IL-2 puede estimular a las células T para que segreguen otras linfocinas.

Uno de los primeros papeles identificados en la IL-2, aparte de su acción como factor de crecimiento, fue su capacidad para inducir la secreción de gamma-interferón por las células T (FARRAR y cols., 1982). El gamma-interferón tiene un marcado efecto en gran variedad de funciones inmunes, incluidas la actividad de células

NK, producción de células T citotóxicas, activación de los macrófagos y modulación de la expresión de antígenos HLA.

Por otro lado, líneas celulares T fueron inducidas por IL-2 altamente purificada, a segregar un factor de crecimiento de células B (BCGF-1). La respuesta fue inhibida por un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2, sugiriendo que la misma interacción receptor-ligando era capaz de contribuir a la transición del ciclo celular y a la secreción de linfocinas (HOWARTH y cols., 1983).

La IL-2 también juega un papel directo en la estimulación de respuestas inmunes de células no T. Varios estudios han demostrado que el factor produce un aumento de la actividad de células NK y de linfocitos activadores de células K (LAK) (GILLIS y cols., 1981). La IL-2 puede contribuir también a la proliferación de tales células si bien se ha sugerido que es necesario un cofactor, el cual, puede inducir receptores para IL-2 (OLAUEENAGA y cols., 1983).

Asimismo, la IL-2 puede tener también un efecto directo sobre las células B, más allá del ejercido indirectamente a través de la inducción de linfocinas específicas de dichas células. Utilizando anticuerpos monoclonales, se ha encontrado que un número de células B activadas o transformadas, presentan receptores para IL-2 (MALLAT y cols., 1983; KORSMEYER y cols., 1983).

Se requieren estudios ulteriores para comprobar la acción directa de IL-2 sobre células B. No obstante, incluso si el efecto directo de esta linfocina sobre células B con receptor para la misma, representa solamente un artefacto "in vitro", ello sugiere que la IL-2 y los factores estimulantes de las células B comparten algunos escalones tras la unión con su receptor, tales que la IL-2 puede inducir su actividad (ROBB y cols., 1981).

7.5.5. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE FIBROBLASTOS (FDGF)

Este factor fue aislado por GOSPODAROWICZ (1975) a partir de la hipófisis bovina. Aunque su nombre se debe al hecho de que, en principio, estimulaba la proliferación de fibroblastos, más tarde

se comprobó que también estimulaba otra serie de células de origen mesodérmico (GOSPODAROWICZ y HANDLEY, 1976).

Su posible función biológica estaría relacionada con la regeneración de las heridas. Se trata de un péptido termolábil, de un peso molecular próximo a los 13000 d. Parece ser independiente del factor de crecimiento nervioso (NGF) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF), pues en este último caso, se observa que no se une al mismo receptor.

El FDGF induce la proliferación en células que han sido inhibidas por contacto. Recientemente, se ha comprobado también que el FDGF mantiene la supervivencia de neuronas "in vitro". "In vivo", se ha demostrado que induce angiogénesis en el cerebro de rata y regenera los nervios periféricos, experimentalmente seccionados.

7.5.6. INSULINA Y FACTORES DE CRECIMIENTO INSULIN-SEMEJANTES (IGFs I y II)

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos, que posee una gran variedad de actividades biológicas que son esenciales para el mantenimiento de la vida en animales superiores (CZECH, 1977).

Aunque el espectro de las acciones de la insulina es continuo, estas actividades están separadas, a menudo arbitrariamente, en dos categorías: efectos metabólicos agudos y actividades crónicas promotoras del crecimiento (KING y KAHN, 1984). Dentro de estas dos categorías se pueden distinguir, a su vez, varias actividades:

- a) METABOLICAS:
 - Transporte de glucosa y síntesis de glucógeno.
 - Antilipólisis.
 - Transporte de aminoácidos.
 - Síntesis de proteínas.
- b) PROMOCION DEL CRECIMIENTO:
 - Síntesis de RNA y DNA.
 - Proliferación celular.

En general, los efectos metabólicos de la insulina son observados a bajas concentraciones (0,1 a 1 nM), y el tiempo de

comienzo de estas acciones es muy corto, generalmente, a los pocos minutos de la exposición de las células a la insulina. En contraste, los efectos de promoción del crecimiento, tales como la estimulación de la síntesis de DNA y la proliferación celular, son generalmente observados a concentraciones de 0.1 a 1 μM , y el tiempo de incubación requerido es de horas a días (KING y KAHN, 1981).

Los factores de crecimiento insulín-semejantes (IGFs) son una familia de hormonas polipeptídicas, que son definidas por su habilidad de imitar los efectos biológicos de la insulina, aunque se diferencian estructuralmente de la misma (ZAPF y cols., 1978).

Han sido definidos dos IGFs, llamados IGF-I e IGF-II. Son polipeptidos de 70 y 67 residuos de aminoácidos y son idénticos en un 62% de su secuencia primaria (RINDERKNECHT y HUMBEL, 1978).

La estructura del IGF-I es semejante a la insulina en un 49% de los residuos de aminoácidos.

Fisiológicamente, los IGFs parecen ser controlados, más por el nivel de la hormona del crecimiento que por el nivel de glucosa. Además, diversas experiencias sugieren que los IGFs pueden mediar el efecto de la hormona del crecimiento sobre el sistema óseo (ZAPF y cols., 1978).

Los IGFs aparentan ser idénticos a otras clases de hormonas polipeptídicas. Las somatomedinas, aisladas de plasma humano y de ratón, tienen exactamente el mismo espectro de propiedades biológicas. Datos recientes sugieren que la somatomedina C es inmunológicamente indistinguible del IGF-I.

Hay por lo menos dos tipos de receptores de IGF, que pueden ser distinguidos basándose en su relativa afinidad por IGF-I e IGF-II, y por su habilidad para interactuar con insulina (ZAPF y cols., 1978). El tipo I de receptor reacciona preferentemente con IGF-I, y también, con insulina a altas dosis. El tipo II de receptor reacciona preferentemente con IGF-II, y no reconoce a la insulina, aún a muy altas concentraciones.

Algunas células, tales como linfocitos humanos cultivados, poseen solamente receptores para IGF-I e insulina (ROSENFELD y cols., 1980). Otras tales como las células de hígado, sólo tienen

receptores para IGF-II y para insulina. Por último, otras, como los fibroblastos humanos, poseen receptores para los tres tipos de péptidos (NISSLEY y RECHLER, 1978).

El receptor para insulina es el mejor caracterizado y consiste en dos tipos de subunidades enlazadas por puentes disulfuro. La subunidad α tiene un peso molecular de 135000 d., y contiene el lugar de anclaje para la insulina (PILCH y CZECH, 1980). La subunidad β tiene un peso molecular de alrededor de 95000 d., y parece tener actividad proteína-quinasa tirosín-específica (KASUGA y cols., 1981). En el receptor nativo, estas subunidades están enlazadas por medio de puentes disulfuro, formando una estructura de peso molecular: 350000 d.

El receptor para IGF-I parece ser muy similar en su estructura al receptor de la insulina, con una subunidad enlazante de peso molecular: 130000 d., y otra subunidad de peso molecular: 90000 d. (KASUGA y cols., 1981). La electroforesis en gel, bajo condiciones no reductoras, sugiere que estas subunidades están unidas en el receptor nativo formando un complejo de peso molecular mayor de 300000 d.

El receptor para IGRF-II es un único polipéptido de peso molecular: 260000 d., con puentes disulfuro intracatenarios (KASUGA y cols., 1981).

Los efectos metabólicos, o bien estimuladores del crecimiento, podrán ser producidos por la insulina, o por los IGFs, según el tipo de receptor con el que interaccionen (KING y KAHN, 1984).

Así, si la insulina interacciona con su receptor, se producen intensos efectos metabólicos, y se duda que se produzcan efectos estimuladores del crecimiento. Si interacciona con un receptor para IGF, se produce el fenómeno inverso.

Algo similar ocurre con los IGFs. Si interaccionan con receptores para insulina, producen efectos metabólicos, pero si lo hacen con sus propios receptores, estimulan la proliferación celular (KING y KAHN, 1984).

7.5.7. FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTES (TGFs)

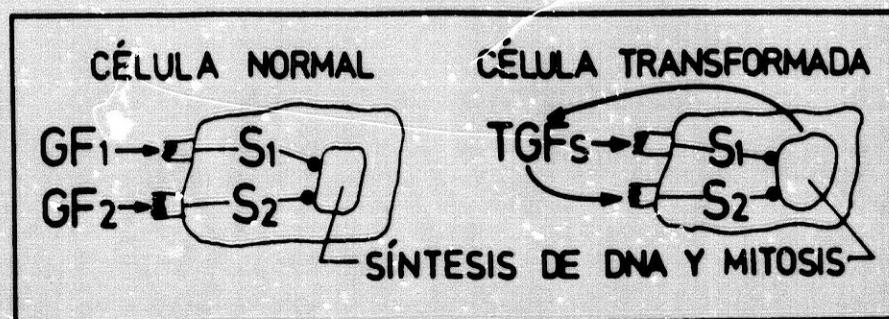
Los PGFs que actualmente tienen mayor importancia son los factores de crecimiento transformantes (TGFs). Son factores polipeptídicos secretados, principalmente, por células tumorales, aunque también se ha encontrado que pueden ser sintetizados por células normales (MASSAGUE, 1984).

Estos factores inducen en células normales una transformación semejante como si fueran tumorales, pero su efecto es reversible; es decir, si eliminamos los factores del medio, las células vuelven a comportarse como normales (MASSAGUE, 1984). Asimismo, estos factores, al ser secretados por células tumorales, permitirían que éstas se volvieran autónomas en relación con su crecimiento celular, por no depender de la presencia de factores de crecimiento exógenos. Como ejemplo del proceso anterior, se ha demostrado la presencia de niveles elevados de factores de crecimiento en células embrionarias de ratón, transformadas por tratamiento con N,N-dimetil-formamida (LEVINE y cols., 1985), lo cual garantiza su autonomía.

También hay evidencias de que células transformadas en cultivo muestran unos requerimientos disminuidos de factores de crecimiento exógenos, si se comparan con sus homónimas normales (DULBECCO, 1970; HOLLEY, 1975; CHERINGTON, 1979; SIILES y cols., 1980; McCLURE, 1983). La explicación que se da al hecho de que las células transformadas hayan sobrepasado las limitaciones de la proliferación, impuestas por el aporte de factores exógenos, es que tales células sintetizan sus propios factores de crecimiento, y por tanto, incrementan la concentración local de factores mitogénicos en el microambiente que rodea a las células.

Tras la identificación de los factores de crecimiento transformantes por SPORN y TODARO (1980), se sugirió un mecanismo de transporte autocrino para los mismos. Las células, después de la transformación, producirían TGFs, que al contactar con receptores de membrana de las propias células productoras, estimularían su crecimiento. El resultado neto es una descompensación del mecanismo normal regulador de la división celular (Fig. 2).

FIGURA 2: Mecanismo de crecimiento de células normales y transformadas (MASSAGUE, 1984).



Una célula normal recibe factores de crecimiento del medio extracelular. Estos conectan con los receptores de membrana y provocan una señal extracelular que llega al núcleo, produciéndose la síntesis de DNA y mitosis. Una célula transformada no necesita los factores de crecimiento externos, ya que ella misma produce los TGFs que se unen a los receptores de la membrana celular, induciendo la replicación celular.

= = = = =

Esta hipótesis es reafirmada por los hallazgos de que oncogenes codifican proteínas con actividad similar a factores de crecimiento, o que recuerdan receptores para los mismos.

La propagación de la señal inducida por los TGFs al complejarse con su receptor, parece producirse al ser estimulada una membrana quilasa, la cual, estimula una cascada de fosforilaciones intracelulares (ABDEL-GHANY y cols., 1983).

Dentro de los TGFs han sido identificados tres tipos: el TGF- α (MARQUARDT y TODARO, 1982), el TGF- β (ASSOLAN y cols., 1983) y el TGF- γ (YUNIS y cols., 1983), aunque hay autores que sólo reconocen la existencia de los dos primeros (MOSES y cols., 1985).

El TGF- α es producido por varias células animales y humanas (TODARO y cols., 1980). Este factor de crecimiento es un miembro de la familia del gen que codifica el EGF. Se fija a células portadoras del receptor para EGF, con una afinidad similar a la de dicho factor, y estimula su proliferación.

El TGF- α y el EGF tienen una semejanza estructural entre un 30 y un 40%, y esta semejanza podría explicar el que ambos factores compartan los mismos receptores (MOSES y cols., 1985).

El TGF- α ha sido encontrado en muchas células cancerosas, y se ha sugerido que su acción autocrina, estimulando el crecimiento de células portadoras del receptor para EGF, puede jugar un papel muy importante en la transformación maligna (SPORN y ROBERTS, 1985). También, se ha demostrado que el TGF- α humano determina una apertura parpebral precoz en ratones recién nacidos (SMITH y cols., 1985b). Asimismo, la reciente clonación de los genes para el TGF- α en el hombre y en la rata (LEE y cols., 1985), permitirá una mayor investigación en su mecanismo molecular de actuación, aunque es probable que sea similar al del EGF.

El TGF- γ está peor conocido estructuralmente, y como decíamos antes, hay autores que dudan de su existencia (MOSES y cols., 1985). Si se sabe que no presenta reacción cruzada con el receptor para EGF, como ocurre con el TGF- α .

En cuanto al TGF- β , es el que tiene actualmente mayor importancia dentro de los TGFs. Este factor fue identificado por su habilidad para causar transformación fenotípica de fibroblastos de ratón (ROBERTS y cols., 1981; TUCKER y cols., 1983). Muchas células diferentes sintetizan TGF- β (ANZANO y cols., 1985; ASSOIAN y SPORN, 1986), y esencialmente todas tiene un receptor específico de alta afinidad para este péptido (FROLIK y cols., 1984; TUCKER y cols., 1984a; MASSAGUE y LIKE, 1985). Por tanto, el TGF- β es una molécula regulatoria fundamental, actuando a través de ambos mecanismos, autocrino y paracrino. Recientes estudios indican un importante papel para el TGF- β en células del sistema inmune (KEHRL y cols., 1986; ROOK y cols., 1986), tejido conectivo (IGNOTZ y MASSAGUE, 1986; ROBERTS y cols., 1986), así como, en epitelios (SHIPLEY y cols., 1986).

El TGF- β es una molécula multifuncional (ROBERTS y cols., 1985b), puesto que puede estimular o inhibir la proliferación, puede estimular o inhibir la diferenciación, y puede estimular o inhibir otros procesos críticos en la función celular.

La estructura del TGF- β corresponde a un dímero (peso molecular: 25000 d.), formado por dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos (MASSAGUE, 1985; DERYNCK y cols., 1985). Sólo el dímero es biológicamente activo.

La secuencia total de los TGF- β humano (DERYNCK y cols., 1985) y murino (DERYNCK y cols., 1986) difiere sólo en un aminoácido. El TGF- β bovino (ROBERTS y cols., 1983) también han sido secuenciado parcialmente, y es idéntico a la molécula humana.

Otros péptidos han mostrado una estructura muy similar, si no idéntica, al TGF- β . Entre éstos tenemos un inhibidor aislado del medio condicionado de células de riñón de mono (BSC-1) (TUCKER y cols., 1984b) y un péptido inductor de cartilago (CIF-A), aislado de hueso bovino (SEYEDIN y cols., 1985). Asimismo, la inhibina (MASON y cols., 1985), un polipéptido inhibidor de la secreción de FSH, es un heterodímero y un producto de la familia de genes que incluye al TGF- β . Por último, el MIS (sustancia inhibitoria Mülleriana), producida por el testículo y responsable de la regresión del conducto Mülleriano en el embrión macho (BUDZIK y cols., 1985), tiene una estructura muy similar al TGF- β (CATE y cols., 1986).

El TGF- β se liga a un receptor específico de alta afinidad en la membrana celular, que se encuentra esencialmente en todas las células, normales o malignas, epiteliales o mesenquimales, incluyendo células de origen hematopoyético, tales como linfocitos (TUCKER y cols., 1984a; SHEIFETZ y cols., 1986). No hay reactividad cruzada para este receptor con otros factores de crecimiento.

Es una molécula grande (aproximadamente 500 a 600 Kd.), con dos subunidades unidas por puentes disulfuro (MASSAGUE, 1985; FANGER y cols., 1986). No parece tener actividad tirosín-kinasa, al contrario que los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento.

Aunque los estudios originales sobre el TGF- β midieron su capacidad para estimular la proliferación de fibroblastos de rata en agar (ROBERTS y cols., 1981), estudios posteriores han demostrado que su papel principal, en cuanto a la proliferación celular se refiere, es inhibidor.

No obstante, el TGF- β estimula otras funciones celulares. Estimula el transporte de glucosa y aminoácidos, así como la glicolisis en fibroblastos (SPORN y cols., 1986). Asimismo, incrementa la formación de colágeno y fibronectina en estas células (IGNOTZ y MASSAGUE, 1986; ROBERTS y cols., 1986; SPORN y ROBERTS, 1986) y estimula su quimiotaxis "in vitro" (POSTLETHWAITE y cols., 1987). "In vivo", estas acciones dan lugar a una respuesta fibrótica en el lugar de inyección (ROBERTS y cols., 1986).

El TGF- β también incrementa la liberación de prostaglandinas y la movilización de calcio en órganos en cultivo, mientras que en células de la granulosa ovarica potencia marcadamente la habilidad de la hormona folículo-estimulante (FSH) de inducir la producción de progesterona y estrógenos (YING y cols., 1986), lo cual altera la formación de receptores para la hormona luteinizante (LH), inducida por FSH. Por último, el TGF- β induce la diferenciación escamosa y producción de una envoltura córnea en células epiteliales bronquiales (POSTLETHWAITE y cols., 1987).

De estas funciones, propias del TGF- β , se derivan ciertos hechos de importancia clínica.

Por ejemplo, ciertos tumores (carcinoma escirro de mama y estómago y fibrosarcomas) se caracterizan por una excesiva reacción fibrótica, la cual, podría ser causada por su liberación de TGF- β (LENNOX, 1986).

Asimismo, durante la embriogénesis, el TGF- β puede jugar un papel crítico en dirigir la migración de fibroblastos que sintetizan la matriz necesaria para la organogénesis (POSTLETHWAITE y cols., 1987).

Por otra parte, la liberación de TGF- β por parte de plaquetas, linfocitos y monocitos/macrófagos, en sitios de daño tisular, puede jugar un papel crítico para lograr la migración de fibroblastos de tejidos conectivos vecinos e incrementar la producción de colágeno y fibronectina por parte de los mismos (SPORN y cols., 1986). De este modo, se lograría reparar el daño tisular.

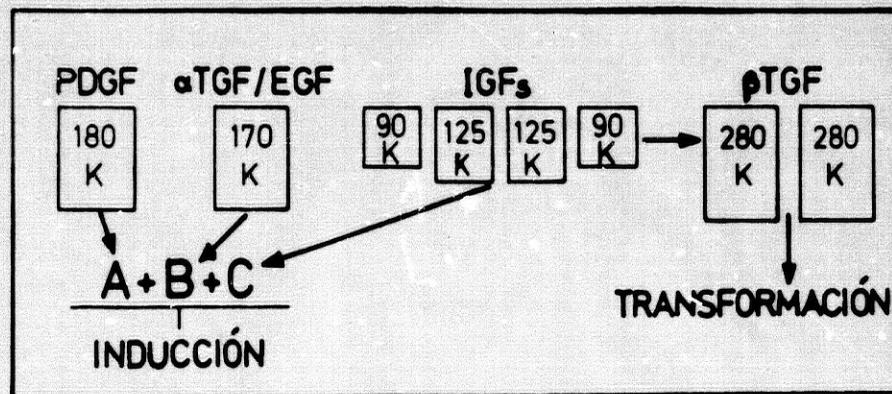
Por último, la habilidad del TGF- β de promover la formación de colágeno, puede tener implicaciones en una enfermedad metabólica, tal y como la osteoporosis, en la que una inadecuada formación de

colágeno, u otros componentes de la matriz ósea, pueden contribuir a su patogénesis (SHAPIRO y cols., 1984).

Dentro del funcionamiento autocrino en células cancerosas se pueden incluir, aparte de los factores transformantes α y β , otros como el PDGF y bombesina (SPORN y ROBERTS, 1985). Sin embargo, el mecanismo de funcionamiento autocrino no parece restringirse a células cancerosas, y recientes estudios con péptidos PDGF- semejantes en células de músculo liso en animales, así parecen probarlo. Asimismo, se ha demostrado la regulación de la proliferación celular por factores estimuladores e inhibidores difundidos a partir de cultivos de células 3T3 (HAREL y cols., 1985).

Según MASSAGUE (1984), cada tipo de TGF no produce una transformación neoplásica por sí solo, sino que tiene que haber una colaboración entre ellos y otros factores polipeptídicos ya vistos, como PDGF e IGFs.

FIGURA 3: Inducción y transformación en las células por acción de diversos PGFs.



Cada factor de crecimiento conecta con su receptor específico. Producen cada uno una acción determinada sobre la célula receptora (A,B,C). El efecto producido en la célula por la suma de estas acciones se considera como que dicha célula alcanza el estadio de inducción en la transformación neoplásica.

La acción de TGF-B sobre su receptor en una célula inducida completa el ciclo de transformación neoplásica.

= = = = =

Las acciones combinadas de PDGF, IGFs y TGFs/EGF producirían la inducción en la célula normal. La transformación vendría dada por la acción del TGF- β (Fig. 3).

Hay otras evidencias de la actuación conjunta de varios factores de crecimiento polipeptídicos. Entre ellas, tenemos la estimulación de la glicólisis y captación de aminoácidos en células NRK-49F por TGF- β y EGF (BOERNER y cols., 1985), y la estimulación de la captación de glucosa por TGF- β , para la cual, se requiere la activación del receptor para EGF (INMAN y COLOWICK, 1985):

7.6. ONCOGENES

Muchos virus (especialmente retrovirus) oncogénicos, contienen secuencias genómicas que parecen ser responsables de la inducción de neoplasia. Estos genes son llamados oncogenes virales (v-onc).

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 del 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 (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 las evidencias disponibles sugieren 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.

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 transcripcional 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 reguladoras 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. De hecho, genes claramente oncogénicos (c-onc) parecen jugar un importante papel durante el desarrollo embrionario de un ratón.

La tasa de crecimiento exhibida por tejidos proliferantes embrionarios y algunos malignos son similares. Así, los c-onc pueden participar en la proliferación o diferenciación de un tejido normal embrionario, y ser programados para llegar a ser relativamente quiescentes en células diferenciadas (GALLO y WONG-STAAAL, 1982).

Las causas que activan a un c-onc no se conocen claramente. No obstante, se han 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).

Esta cobrando importancia la idea de la existencia de unos posibles genes reguladores que controlarían la expresión de los oncogenes, de tal manera, que se podrían explicar los diversos

mecanismos de activación de los mismos, que determinan la transformación neoplásica.

Existen determinados virus oncogénicos que no poseen oncogén (por ejemplo: el virus de la leucemia aviar), pero que cuando se inocula en un ave da lugar a un linfoma. Este linfoma expresa, con gran intensidad, el oncogén c-myc. Se ha demostrado que el genoma del virus se integra en el de la célula en un lugar próximo a la localización del c-myc. Es probable, que el genoma del virus se integre en un lugar ocupado o relacionado con la actividad de un posible gen regulador del c-myc, bloqueando su actividad y desreprimiendo 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, 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, 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 oncogén 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 oncogén (REDDY y cols., 1982). Tanto en un caso como en otro el oncogén celular podría activarse y determinar la formación de una neoplasia.

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

La acción de los virus oncogénicos hay que entenderla en el ámbito de los factores de crecimiento polipeptídicos. Estos virus pueden producir o inducir una proteína (producto oncogénico) que, normalmente, activa la vía del complejo factor de crecimiento-receptor, y que puede imitar la acción del factor de crecimiento (BURGUESS, 1985).

Una proteína estructural o enzimática que pudiera perturbar o simular algunos aspectos de la acción de un factor de crecimiento, podría esperarse que tuviera un potencial oncogénico. De este modo, un producto oncogénico podría ser:

- a) El factor de crecimiento al que la célula, normalmente, responde. Se ha demostrado que el oncogén c-sis codifica una de las dos cadenas del PDGF (DOOLITTLE y cols., 1983; WATERFIELD y cols., 1983). Otros ejemplos son el oncogén lym y la transferrina (GOUBIN y cols., 1983) y el gen T medio del poliovirus y la gastrina (BALDWIN, 1982).

- b) Una forma alterada (o un número incrementado) del receptor o receptores (BARGYNN y cols., 1986). De esta manera, la célula diana siempre estaría en un estado estimulado. Si los productos son receptores, al incrementar el número de éstos, harían a la célula más susceptible a la actuación de los factores de crecimiento. El oncogén v-erb B codifica una proteína (YAMAMOTO y cols., 1983) que equivale al receptor de EGF truncado (DOWNWARD y cols., 1984), y tiene actividad tirosin-quinasa intrínseca (KRIS y cols., 1985; LAX y cols., 1985). Esta proteína induciría la transformación funcionando como un receptor para un factor de crecimiento activado. Asimismo, las proteínas de los oncogenes v-erb B y v-fms presentan estructuras parecidas a los receptores para EGF y PDGF (DOWNWARD y cols., 1984), y lo mismo ocurre con el gen fms y el receptor para el factor estimulador de colonias (GSF) (SCHER y PETTENMIER, 1986) y para el erb A y el receptor para la hormona tiroidea (WEINBERGER y cols., 1986; SAP y cols., 1986).

- c) Un cambio en la naturaleza molecular o concentración de un sustrato intracelular para el receptor del factor de crecimiento (ITO y cols., 1983). Candidatos para sustratos de los receptores parecen ser componentes del citoesqueleto o enzimas que modifican las proteínas del citoesqueleto, estrechamente asociados con la cara interna de la membrana celular.

- d) Una proteína celular involucrada en la activación de la cromatina eucariótica, ya sea por conexión directa con el DNA, o por alteración de la matriz nuclear (COLBY y cols., 1983).

Por medio de una de estas cuatro posibilidades, o por varias de ellas, los oncogenes pueden determinar la formación de una neoplasia, a través de mecanismos involucrados en la regulación del crecimiento de células normales.

8. FACTORES INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO CELULAR

Como hemos dicho al hablar de la regulación del crecimiento celular, hoy se considera éste como un proceso dinámico en el que tienen tanta importancia los factores estimuladores como los inhibidores del mismo. Esta teoría ha dado gran importancia a estos últimos.

Por otra parte, y como hemos visto anteriormente también, algunos factores pueden ser estimuladores o inhibidores, según la célula sobre la que actúen, según a la concentración a la que lo hagan o según las condiciones del medio circundante.

Por ello, a continuación, estudiaremos algunos factores inhibidores, que hemos referido anteriormente como estimuladores. Aparte, estudiaremos otros factores exclusivamente inhibidores.

8.1. AGOTAMIENTO DEL MEDIO

El mecanismo más simple que determina la inhibición del crecimiento celular es el agotamiento del medio, en el que se desarrolla la célula. La deplección de nutrientes, y principalmente de factores de crecimiento (STOKER, 1973), así como la acumulación de productos de desecho y variaciones de pH, son factores, que por sí solos, son capaces de inhibir la proliferación celular. No obstante, pensamos que la inhibición celular no depende únicamente de estas situaciones aleatorias, sino que existen una serie de factores y sistemas que contribuyen activamente a esta inhibición.

8.2. INHIBICION POR CONTACTO

ABERCROMBIE y HEAYSMAN (1964) definieron la inhibición por contacto como el fenómeno ocurrido en los cultivos de células

normales, mediante el cual, al producirse el contacto entre las mismas, cesa su proliferación y motilidad, así como, la irregularidad de sus membranas.

De este modo, se forma una monocapa confluyente, en la que las células vecinas contactan unas con otras. Si tal monocapa es agredida o lesionada con una aguja, de tal forma que se cree una franja libre de células en la placa de cultivo, las células de los bordes de la línea se extienden hacia el interior de la zona libre y allí se dividen.

Esto indica que la supresión del crecimiento en una lámina intacta confluyente está bajo un control local, fenómeno conocido como "topoinhibición" (DULBECCO, 1970).

La causa de este fenómeno puede ser el agotamiento de algún factor de crecimiento localizado (DUNN e IRELAND, 1984), o bien, el paso de sustancias químicas de bajo peso molecular de una célula a otra.

BURTON (1975) denomina a esta hipotética sustancia como "sustancia clave", y ésta, tendría la particularidad de inhibir el ciclo celular en G₁. Cuando a nivel intracelular alcanzase un determinado umbral, esta sustancia pasaría por simple difusión de una célula a otra, actuando sobre células en asincronía. Según BURTON, esta sustancia podría ser H⁺ u OH⁻ o más concretamente, variaciones en el pH que se transmitirían de unas células a otras. Sin embargo, considera también que otros posibles candidatos podrían ser los iones Na⁺ y K⁺, o incluso, poliaminas y prostaglandinas.

Otros autores (HAKOMORI y cols., 1974; WHITTENBERGER y GLASER, 1977; NAKAMURA y cols., 1983; PETERSON y LERCH, 1983) opinan que la inhibición por contacto se debe a glicoproteínas de la membrana plasmática celular. Aunque las moléculas implicadas en esta inhibición sólo han sido parcialmente caracterizadas (RABEN y cols., 1981; NAKAMURA y cols., 1984a; 1984b), parece ser, que su actuación es de naturaleza específica y que requiere el contacto célula-célula. Anteriormente, al referirnos a las células NIH 3T3, hemos comentado con detalle las moléculas involucradas en esta forma de inhibición, y su posible mecanismo de actuación.

8.3. CHALONAS

La actividad mitótica es superior durante el sueño y menos intensa durante el ejercicio o stress. Esto es debido a ciertas hormonas liberadas durante el stress, principalmente adrenalina y glucocorticoides, que inhiben la mitosis en todo el organismo. Sin embargo, estas hormonas son sólo una parte del mecanismo regulador de la mitosis. Existen otras sustancias que actúan como inhibidores mitóticos, llamadas chalonas (frenadoras) y que, probablemente, sean liberadas o activadas por las hormonas del stress. Las chalonas son tejido-específicas, pero no especie-específicas. Por ejemplo, las chalonas de la piel de conejo inhibirán la mitosis de las células epidérmicas de conejo o de ratón, pero no inhibirán la mitosis de cualquier otro tejido.

La primera idea de chalonas la apuntó BULLOUGH (1962), considerándolas como reguladoras de la proliferación celular mediante un mecanismo "feed-back". Las chalonas se han descubierto en numerosos tejidos y células, y aunque no están definidas bioquímicamente de forma exacta, parecen ser polipéptidos o proteínas de bajo peso molecular. Son capaces de inhibir de forma específica, pero reversible, la mitosis de tejidos diferenciales.

En la epidermis y otros tejidos de mamíferos se producen dos tipos de chalonas. Una de ellas, la chalona G_1 , bloquea el paso de la fase G_1 a la fase S, y es una sustancia termoestable de bajo peso molecular (2000 a 10000 d.). Sustancias con propiedades semejantes a la chalona G_1 han sido detectadas también en la glándula mamaria y en el hígado.

La chalona de tipo G_2 impide la entrada de la célula en mitosis, y tiene un peso molecular más alto (entre 25000 y 50000 d.). Se ha detectado en linfocitos humanos y fibroblastos.

No se sabe el mecanismo, a través del cual, actúan las chalonas, aunque algunos autores piensan que se localizan en la membrana celular impidiendo el paso de nutrientes, especialmente el Ca^{++} , al interior de la célula.

La capacidad de síntesis de chalonas permanece en células tumorales (TERSKIKH, 1973), aunque el aumento de la permeabilidad de la membrana hace que no retengan chalonas y, por lo tanto.

tengan cantidades bajas de ellas. No obstante, se cree que los tumores tienen capacidad de ser regulados por las chalconas, ya que la inoculación de estas sustancias dentro de un tumor ha inducido la regresión del mismo.

8.4. POLIAMINAS

Decíamos anteriormente, que la presencia de poliaminas es esencial para un óptimo crecimiento celular. Sin embargo, paradójicamente, dichas sustancias pueden actuar como potentes inhibidores de la proliferación celular. El mecanismo, en este caso, depende de una enzima, la poliaminaoxidasas, que desamina los grupos amino-terminales de la espermidina y espermina, convirtiéndolas en aminoaldehidos, los cuales, serían los auténticos responsables de la inhibición del crecimiento celular (SMITH y cols., 1983).

Probablemente, las poliaminas a bajas concentraciones ejercen un papel estimulador del crecimiento celular. Estas células, al proliferar, sintetizarían altas concentraciones de poliaminas que, a su vez, inhibirían el crecimiento celular.

Las células tumorales secretan gran cantidad de poliaminas, aunque éstas no inhiben su proliferación. Este hecho podría explicarse por una menor sensibilidad de estas células a la regulación por poliaminas, igual que sucede con otros factores inhibidores del crecimiento, tales como prostaglandinas (QUASH y cols., 1979) y los factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular (CPIF) (BORDES y cols., 1988). No obstante, estas poliaminas secretadas en gran cantidad por la célula tumoral, pueden acumularse en los líquidos orgánicos e inhibir la proliferación de células normales, especialmente, las inmunes, dando lugar al estado de inmunosupresión característico de un paciente avanzado de enfermedad neoplásica (BYRD y cols., 1977).

8.5. HISTAMINA

La histamina, inyectada subcutáneamente a dosis de 10 mg/kg, se ve un efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos tisulares en ratones (AL-IMAPA y DALE, 1985). Este efecto se debe a

la inhibición de la síntesis de DNA, cuantificada por la incorporación de 5-¹²⁵I-2'-deoxiuridina, siendo muy marcado en bazo y algo menor en pulmón, hígado y ganglios linfáticos. Puesto que se sabe que la histamina activa células supresoras a través de receptores H₂, se cree que este sería su mecanismo de actuación para inhibir dicha síntesis de DNA.

8.6. INSULINA Y FACTOR DE CRECIMIENTO INSULIN-SEMEJANTE I (IGF-I)

Tanto la insulina, como el IGF-I, parecen ser importantes para el proceso de proliferación linfocitaria, como se deduce de las siguientes observaciones.

En primer lugar, linfocitos activados por mitógenos o por antígenos, portan en su superficie celular receptores para insulina (KRUG y cols., 1972; HELDERMAN y STROM, 1978; BHATHENA y cols., 1982) y para IGF-I (KOZAK y cols., 1985), que están ausentes o se expresan mínimamente en linfocitos quiescentes.

En segundo lugar, concentraciones nanomolares de insulina o de IGF-I incrementan los procesos anabólicos (HELDERMAN y EDWARDS, 1981) o la síntesis de DNA (HEULIN y cols., 1982; SCHIMPFF y cols., 1983), respectivamente, en cultivo de linfocitos activados por mitógenos a concentraciones de suero que son subóptimas para el crecimiento.

HUNT y EARDLEY (1986) han descrito un efecto adicional, e inesperado, de los factores anteriores sobre la síntesis de DNA inducida por interleukina-2 (IL-2).

El IGF-I, a concentraciones séricas aproximadamente fisiológicas, y la insulina, a concentraciones suprafisiológicas, suprimen potentemente, tanto la proliferación de linfocitos, como la generación de células productoras de anticuerpos. Estos efectos no son reversibles por un incremento de la concentración de IL-2 y están mediados, probablemente, por ocupación del receptor para IGF-I, el cual, es ocupado de forma cruzada por la insulina a concentraciones suprafisiológicas (ZAPP y cols., 1978; KING y cols., 1984; CAMPISI y PARDEE, 1984).