

El factor de crecimiento insulín-semejante II (IGF-II), probablemente, podría ser también inmunosupresor, ya que se fija al receptor para IGF-I, con una afinidad intermedia a la de IGF-I e insulina (ADAMS y cols., 1983). Por otra parte, es improbable que la inmunosupresión observada por HUNT y EARDLEY (1986), sea debida a la ocupación del receptor para IGF-II, ya que la insulina no tiene afinidad detectable por el mismo, aunque IGF-I tiene una afinidad moderada por él (CZECH, 1982).

Estas observaciones sugieren la posibilidad de que los péptidos insulín-semejantes ligan los sistemas inmune y endocrino, aunque esta afirmación precisa una confirmación por otra serie de experimentos.

De todas formas, es interesante el hecho de que la concentración de IGF alcanza un pico al mismo tiempo que algunos mecanismos de tolerancia inmune neonatal están ocurriendo (BILLINGHAM y cols., 1953; STROBER, 1984).

#### 8.7. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

Anteriormente, nos hemos referido al factor de necrosis tumoral (TNF), al hablar de sus efectos estimuladores sobre la proliferación celular. Sin embargo, este factor, presente en suero, causa la necrosis de ciertos tumores trasplantados en ratón "in vivo", y es citotóxico o citostático para una serie de líneas celulares "in vitro", siendo de gran importancia para inhibir el crecimiento de ciertos tumores.

SATO y cols. (1986) han demostrado que el TNF murino inhibe la proliferación de las células endoteliales de aorta bovina, de capilares y de vena umbilical humana. Igualmente, tiene un efecto citotóxico sobre células endoteliales de capilares bovinos.

Según esto, el TNF puede inducir un daño en células endoteliales vasculares y puede limitar la formación vascular en tumores. Suprimiendo la neovascularización de esta forma, el TNF restringe el aporte de nutrientes a los tejidos tumorales y, finalmente, provoca la regresión de los tumores, ya que la angiogénesis, o formación de nuevos vasos, es esencial para el

crecimiento de tumores sólidos y estos carecen de vascularización colateral.

El TNF ha demostrado también una acción sinérgica con interferones en la inhibición del crecimiento de células tumorales "in vitro".

Sin embargo, algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), interfieren los efectos antiproliferativos del TNF sobre células tumorales (SUGARMAN y cols., 1987). Asimismo, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) antagoniza significativamente los efectos citotóxicos del TNF en fibroblastos NIH 3T3 (SUGARMAN y cols., 1987). Puesto que otros factores, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que también estimulan el crecimiento de estos fibroblastos (al igual que el TGF- $\beta$ ), no interfieren la actuación del TNF, parece ser, que este efecto característico del TGF- $\beta$  no se debe exclusivamente a un estímulo de la proliferación celular.

De esto puede deducirse que los factores de crecimiento que estimulan la proliferación tumoral pueden hacerlo por un doble mecanismo:

- a) Por estimulación autocrina del crecimiento celular tumoral.
- b) Por interferir con mecanismos efectores normales de la defensa del huésped.

### **8.8. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ )**

Anteriormente, hemos referido que el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) puede ser considerado como una molécula multifuncional (ROBERTS y cols., 1985b). Efectivamente, aunque los estudios iniciales definieron al TGF- $\beta$  por su capacidad de estimular el crecimiento de fibroblastos (ROBERTS y cols., 1981), posteriormente, se demostró que el TGF- $\beta$  era idéntico, esencialmente, a un inhibidor del crecimiento que había sido identificado previamente y parcialmente caracterizado en células de ríñon de mono (HOLLEY y cols., 1980), el cual, inhibiría su

proliferación por un mecanismo autocrino (TUCKER y cols., 1984a; TUCKER y cols., 1984b).

Estudios posteriores han descrito los efectos inhibidores del TGF- $\beta$  sobre la proliferación de muchas líneas celulares, tanto neoplásicas como no neoplásicas, tanto en monocapa como en ágar (TUCKER y cols., 1984b; ROBERTS y cols., 1985b; MOSES y cols., 1985).

Más recientemente, se ha demostrado que el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la proliferación en muchos cultivos celulares primarios o secundarios, incluyendo hepatocitos (HAYASHI y CARR, 1985), fibroblastos embrionarios (ANZANO y cols., 1986), linfocitos T (KEHRL y cols., 1986) y keratinocitos (MOSES y cols., 1985; SHIPLEY y cols., 1986).

Desde hace tiempo, se conoce que el suero puede inhibir el crecimiento de muchas células epiteliales en cultivo, y el TGF- $\beta$ , el cual se encuentra en altas concentraciones en suero (CHILDS y cols., 1982), e inhibe la proliferación de la mayoría de las células epiteliales, parece ser uno de los principales mediadores de este efecto. El TGF- $\beta$  está presente en plaquetas (ASSOIAN y cols., 1983) en una cantidad equivalente al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y es liberado de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas cuando la sangre coagula (ASSOIAN y cols., 1986).

En una célula de origen mesenquimal, el TGF- $\beta$  puede estimular o inhibir su proliferación dependiendo del resto de factores de crecimiento que actúen sobre esa célula (ROBERTS y cols., 1985b); esto es, el significado biológico de la señal generada por la fijación del TGF- $\beta$  a su receptor depende del contexto de otros factores de crecimiento presentes. Así, en fibroblastos transformados con el gen *myc*, el TGF- $\beta$  estimula su crecimiento en ágar en presencia de PDGF, mientras que idénticas concentraciones de TGF- $\beta$  inhiben el crecimiento de las mismas células en presencia de EGF (ROBERTS y cols., 1985a).

Aunque el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la proliferación de keratinocitos (SHIPLEY y cols., 1986) y hepatocitos (HAYASHI y CARR, 1985) normales, las células malignas derivadas de estas fuentes, pueden haber perdido su habilidad para ser inhibidas por

este péptido (LECHNER y cols., 1983; SHIPLEY y cols., 1986), sugiriendo que la pérdida de este control negativo del crecimiento puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a su proliferación ilimitada.

Un fenómeno parecido ocurre en las células del carcinoma de pulmón humano A549, el cual, secreta grandes cantidades de TGF- $\beta$  en una forma inactiva o latente (KRYCZEVE-MARTINERIE y cols., 1985). La activación ácida del medio condicionado por estas células, o la adición de TGF- $\beta$  exógeno de plaquetas, da lugar a una inhibición potente de la proliferación, sugiriendo que el crecimiento incontrolado de estas células puede ser debido a su incapacidad de activar la forma latente de TGF- $\beta$  secretada.

Un mecanismo fundamental de la acción antiproliferativa del TGF- $\beta$  es su habilidad de antagonizar los efectos mitogénicos de otros factores de crecimiento peptídicos. Aunque la descripción original de TGF- $\beta$  involucraba su acción sinérgica con EGF (ó TGF- $\alpha$ ), estimulando el crecimiento en suspensión de células NRK en ágar (ROBERTS y ANZANO, 1981), se ha visto que el TGF- $\beta$  antagoniza los efectos mitogénicos de estos dos péptidos cuando las células NRK son cultivadas en monocapa (ROBERTS y cols., 1985b).

Además, el TGF- $\beta$  bloquea potentemente los efectos mitogénicos del PDGF sobre fibroblastos embrionarios de ratón (ANZANO y cols., 1986), de EGF en fibroblastos myc-transformados (ROBERTS y cols., 1985a), de factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FDGF) sobre células endoteliales vasculares (HOTTA y BAIRD, 1987), y de interleukina-2 (IL-2) sobre linfocitos T (KEHRL y cols., 1986).

En el caso de linfocitos T, se conoce que la síntesis, tanto de IL-2 como de TGF- $\beta$ , es inducida cuando estas células están activadas (DERYNCK y cols., 1985; KEHRL y cols., 1986). Por ello, el TGF- $\beta$  puede actuar como un control negativo sobre la expansión clonal excesiva.

El TGF- $\beta$  actúa a través de mecanismos distintos a los del PDGF y EGF (ROBERTS y cols., 1985b), y las señales generadas a partir del receptor para el TGF- $\beta$ , a menudo, bloquean aquéllas de otros muchos péptidos que promueven un estado proliferativo en la célula.

Aparte de su efecto sobre la proliferación, el TGF- $\beta$  puede actuar sobre la diferenciación celular. Así, puede estabilizar el efecto diferenciador que tiene la insulina e hidrocortisona sobre células epiteliales de riñón (FINE y cols., 1985). Igualmente, bloquea la diferenciación de fibroblastos 3T3 en adipocitos (GREEN y KEHINDE, 1975; IGNOTZ y MASSAGUE, 1985) inducida por insulina y glucocorticoides.

También se conocen varios efectos inhibidores del TGF- $\beta$  sobre la función celular. Este factor bloquea la función natural killer (NK) en linfocitos (ROOK y cols., 1986) y suprime la esteroidogénesis inducida en células adrenales por adrenocorticotropina (ACTH) (HOTTA y BAIRD, 1986). La habilidad de interleukina-2 para regular su propio receptor en linfocitos T activados es también inhibida por TGF- $\beta$  (KEHRL y cols., 1986).

Por tanto, parece ser que el TGF- $\beta$  dirige o regula la naturaleza de las respuestas celulares a otras señales, especialmente, aquellas inducidas por otros factores de crecimiento peptídicos u hormonas.

Por último, hay que señalar que la acción supresora del TGF- $\beta$  sobre linfocitos T y B sugiere aplicaciones prácticas como un agente antiinflamatorio o inmunosupresor.

## 8.9. PROSTAGLANDINAS

La difusión de las prostaglandinas en el organismo es muy amplia. Esto podría sugerir que fueran factores de crecimiento, probablemente, implicados en la inhibición por contacto, y que dado su carácter lipídico, penetrarían en la célula desarrollando una labor inhibidora.

Se ha observado que ciertos factores de crecimiento estimulan la producción de prostaglandinas, especialmente de PG E<sub>2</sub> (LEVINE, 1982), por lo que podemos pensar, que estos factores estimulan el crecimiento celular y las células, al proliferar, aumentan la producción de PG E<sub>2</sub>, que a su vez, mediante un mecanismo "feed-back", inhibirá la proliferación, quedando de esta manera regulada. Este mecanismo de regulación explicaría, igualmente, los resultados de SMITH y cols. (1984), en los cuales, bajas concentraciones de PG

E estimulan el crecimiento celular, mientras que concentraciones elevadas, producen una inhibición del mismo.

Por otro lado, la PG E<sub>1</sub> y la PG E<sub>2</sub> estimulan la formación de AMPc en determinados tejidos y células, y algunos autores encuentran que altas concentraciones de este nucleótido cíclico parecen tener un efecto negativo en la proliferación celular. Por tanto, se puede considerar que la acción inhibidora de estas prostaglandinas podría derivar del incremento de la formación de AMPc.

Una gran parte de los tumores producen elevadas dosis de prostaglandinas, especialmente PG E. Sin embargo, salvo algunas excepciones (TURNER y cols., 1982), no se produce una inhibición de su proliferación. Esto podría ser debido a que estas células no son sensibles a la actividad inhibidora de altas concentraciones de PG E (AGLIETTA y cols., 1983), o bien, como sugieren SMITH y cols. (1984), cabría la posibilidad de que los tumores pudiesen estimular su crecimiento a altas dosis de PG E.

Las prostaglandinas parecen tener un papel destacado en la regulación de la respuesta inmune (STENSON y PARKER, 1982; GOODWIN y CEUPPENS, 1983).

Así, la PG E<sub>2</sub> inhibe la proliferación de células T estimuladas por antígenos y mitógenos (GOODWIN y cols., 1977; ELLNER y SPAGNUOLO, 1979). También inhibe la producción de linfocinas, tales como la interleukina-2 (TILDEN y BALCH, 1982; RAPPAPORT y DODG, 1982; CHOUAIB y FRADELIZI, 1982), interferón  $\gamma$  (HASLER y cols., 1983a; HASLER y cols., 1983b) y factor inhibidor de la migración de leucocitos (KELLY y cols., 1982). Además, la PG E<sub>2</sub> estimula la producción de linfocitos T supresores (GOODWIN y cols., 1977; TILDEN y BALCH, 1982; TING y HARGROVE, 1984), inhibiendo de esta forma la respuesta inmune.

También, se ha visto que la PG E<sub>2</sub> podría suprimir la síntesis de DNA y la proliferación de células B de sangre periférica altamente purificadas, tras ser estimuladas por *Staphylococcus aureus* (THOMPSONS y cols., 1984). Igualmente, inhibe la generación de células secretoras de inmunoglobulina (ISC), cuando células B son estimuladas por el mismo agente anterior (JELINER y cols.,

1985). Esta inhibición es inicialmente manifiesta en las células hijas generadas tras la primera parte del ciclo celular y, parece ser, resultado del incremento de los niveles de AMPc intracelular (SIMKIN y cols., 1987).

Por otra parte, los macrófagos producen grandes cantidades de PG E<sub>2</sub>, tras una estimulación apropiada (HUMES y cols., 1977; KURLAND y BOCKMAN, 1978). Esta PG E<sub>2</sub> puede regular la actividad tumoricida macrofágica, y puede ser un importante mecanismo autorregulador de retroalimentación para la activación de estas células (SCHULTZ y cols., 1978; TAFET y RUSSELL, 1981; TAFET y cols., 1981). Los macrófagos de ratones portadores de tumores producen grandes cantidades de PG E<sub>2</sub> (PELUS y BOCKMAN, 1979), y pacientes con varios tipos de cáncer tienen elevados niveles de PG E<sub>2</sub> y metabolitos de ésta (SEYBERTH y cols., 1975; POWLES y cols., 1977; CUMMINGS y ROBERTSON, 1977; BENNETT y cols., 1985), y tienen inhibidas las respuestas inmunes, las cuales, pueden ser estimuladas "in vitro" con indometacina (GOODWIN y cols., 1977), un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. La administración de indometacina en ratones ha demostrado retardar o suprimir el crecimiento de tumores (PLESCIA y cols., 1975; LYNCH y SALOMON, 1979), así como, dificultar las funciones inmunes célula-mediadas cuando se añaden a sus células esplénicas "in vitro" (PELUS y STRAUSSER, 1976).

También se ha demostrado que los macrófagos (ELIAS y cols., 1985) y células mononucleares (DAYER y cols., 1979; KORN y cols., 1980; WHITELEY y NEEDLEMAN, 1984) inhiben el crecimiento de fibroblastos y células sinoviales por estimulación de la producción endógena de PG E<sub>2</sub>. Esto sugiere un mecanismo de "feed-back" negativo, en el cual, uno o varios factores de crecimiento liberados por las células mononucleares estimulan la síntesis de PG E<sub>2</sub> por los fibroblastos, la cual, a su vez, modula la proliferación celular.

Asimismo, BAUD y cols. (1987) han demostrado que los leucotrienos C<sub>4</sub> y D<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>), otros productos de células mononucleares activadas, estimulan la proliferación de fibroblastos humanos sólo en presencia de indometacina, la cual, suprime la

síntesis de prostaglandinas. Este efecto es abolido totalmente por la adición de PG E<sub>2</sub>, la cual, inhibe el efecto estimulador de los leucotrienos sobre la proliferación de fibroblastos.

Finalmente, LIU y cols. (1986), han demostrado que ratones DBA/2 con tumores en estadio latente (linfoma L5178Y) pueden desarrollar ascitis tumoral tras un tratamiento con PG E<sub>2</sub>, la cual, parece inhibir la respuesta inmune célula-mediada, responsable de mantener el tumor en dicho estadio latente. Asimismo, el tratamiento con indometacina (inhibidor de la síntesis de PG E<sub>2</sub>), bloqueaba el crecimiento tumoral.

#### 8.10. ACIDOS GRASOS

Los lípidos, como hemos visto antes con las prostaglandinas, parecen jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune (BEISEL, 1981), e incluso, en la susceptibilidad al cáncer (BOUYENS y MAGUIRE, 1985).

Dentro de los ácidos grasos, los poliinsaturados (PUFAs) parecen ser responsables de la supresión de varias respuestas inmunológicas.

Varios estudios, tanto "in vivo" como "in vitro", reflejan que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) deprimen la respuesta inmune célula-mediada (SMITH y cols., 1985a; UTERMOHLEN y TUCKER, 1986). Así, se ha visto una disminución en el rechazo de injertos cutáneos, una disminución de la sensibilidad retardada en pacientes cancerosos y una disminución de la respuesta linfocítica a mitógenos.

Según ELLIS y cols. (1986), hay varios mecanismos, a través de los cuales, los PUFAs pueden regular la respuesta inmune:

- Un cambio en la composición de ácidos grasos de la membrana de células linfoides, ya que la incubación de linfocitos con ácido linoléico altera la formación de rosetas dependientes de complemento.

- Un contenido alto de PUFAs en el citosol de células esplénicas, lo cual, ha sido correlacionado con la capacidad reducida de dichas células para responder a fitohemaglutinina (PHA).



- Factores séricos inhibidores, ya que estos factores, algunos de los cuales son lipoproteínas, están presentes en ratones que reciben dietas ricas en PUFAs.

Sin embargo, estos mismos autores creen que el mecanismo principal puede estar mediado por células esplénicas o por sus productos. La inyección subcutánea diaria, durante diez días, de PUFAs (ácido linoléico, linolénico y araquidónico) en ratones C57BL/6 redujo la respuesta de células esplénicas a mitógenos en un 70%, la respuesta linfocitaria mixta en un 90%, y células esplénicas de estos ratones suprimieron la respuesta blastogénica inducida por mitógenos de células esplénicas controles, en más de un 90%.

La capacidad inhibidora se enriqueció al aislar los macrófagos esplénicos, y dicha capacidad fue abolida por la adición de indometacina, así como, por el tratamiento con agentes tales como hierro carbónico y metil-ésteres de leucina, los cuales, producen una deplección de macrófagos.

Por tanto, ELLIS y cols. (1986) atribuyen el efecto de los PUFAs sobre la respuesta inmune a la producción de prostaglandinas, ya que el ácido linoléico y el araquidónico son precursores de las mismas, y dicho efecto es abolido por la indometacina (un inhibidor de su síntesis). Probablemente, este efecto inhibitor se deba a la PG E<sub>2</sub>, la cual, como hemos visto antes, tiene probada su capacidad de inhibir diversas respuestas inmunes.

Sin embargo, otros estudios han reflejado que los PUFAs tienen un efecto citotóxico, tanto sobre células tumorales (BENNETT y CONNON, 1957; TOLNAI y MORGAN, 1962; KATCHMAN y cols., 1963; ANDO y cols., 1970) como sobre células normales, tales como cerebrales (AHMED y THOMAS, 1971), espermáticas (SIEGEL y cols., 1986), neutrófilos (HAWEY y GORDON, 1976) y fibroblastos (ROSENTHAL, 1981).

Además, la capacidad citotóxica de estos ácidos grasos puede contribuir a los mecanismos de defensa inespecíficos (KOCHAN y BERENDT, 1971; ALY y MAILBACH, 1981; CONE y cols., 1982) y a las propiedades citotóxicas de células efectoras, tales como linfocitos

OKUDAIRA y cols., 1970; KOGOSHI e ITO, 1973) y macrófagos (CHAIT y cols., 1982).

SIEGEL y cols. (1987) han demostrado en estudios "in vitro" con células del tumor ascítico Mat1376b, que los ácidos grasos poliinsaturados, tales como palmitoleico, oleico, linoleico, linolenico y araquidónico, son significativamente más citotóxicos que los correspondientes ácidos grasos saturados del mismo número de carbonos, incluyendo, ácido palmítico, estearico y araquidico. Dentro de los insaturados, el ácido oleico es el menos tóxico para las células tumorales, mientras que el ácido palmítico es el más tóxico de los saturados.

Asimismo, estudios "in vivo" con ratas F344 inoculadas con dicho tumor (SIEGEL y cols., 1987), han demostrado que la inyección de ácido linoleico y linolenico, incrementa la supervivencia de estos animales portadores de tumores. En estos estudios "in vivo", hay que tener en cuenta que los ácidos grasos, usualmente, se combinan con la albúmina, la cual puede neutralizar su efecto citotóxico (SPECTOR y FLETCHER, 1978).

Por tanto, de estos últimos estudios parece deducirse que, aparte de su posible papel como reguladores de la respuesta inmune, los PUFAs podrían ser utilizados, bajo ciertas condiciones, como agentes efectivos en el tratamiento del cáncer, por su efecto citotóxico.

### 8.11. GANGLIOSIDOS

Los gangliosidos son glicoesfingolípidos cargados negativamente, que contienen ácido siálico. Fueron inicialmente descubiertos en células cerebrales, pero ahora se sabe que son constituyentes de todos los tipos celulares en mamíferos.

Son moléculas anfipáticas, que contienen una región hidrofóbica de ceramida, y una porción hidrofílica oligosacárida (FISHMAN y BRADY, 1976). Esta última está compuesta de ácido siálico, hexosas y/o hexosaminas N-acetiladas, los cuales, están ligados a través de un enlace glicosídico a la ceramida. La región hidrofóbica de ceramida ancla los gangliosidos dentro de la bicapa

lipídica de la membrana, y la región oligosacárida de ácido siálico está presente en el exterior de la membrana plasmática.

Se ha sugerido que la composición de gangliósidos de membrana puede formar parte de un mecanismo homeostático significativo en la regulación del crecimiento celular normal (FISHMAN y BRADY, 1976). Además, las alteraciones de los gangliósidos de membrana, durante la transformación maligna, se correlaciona en cierto grado con una inhibición por contacto aberrante de las mitosis (HAKOMORI, 1975; FISHMAN y cols., 1976; DYATIOVITSKAYA y cols., 1976; ROSENFELDER y cols., 1977).

También se ha sugerido la posible interrelación entre la expresión de gangliósidos de membrana y las propiedades funcionales de las poblaciones linfocitarias. Por ejemplo, la composición de gangliósidos de membrana, no sólo difiere entre distintas subpoblaciones linfocitarias, incluyendo células natural killer (STEIN y MARCUS, 1977; YOUNG y cols., 1980), sino que también depende del estado de activación linfocitaria (NARASIMHAM y cols., 1976).

Además, se piensa que los gangliósidos pueden ser secretados de la membrana de linfocitos T activados en forma de complejos solubles (ESSELMAN y MILLER, 1977; LADISCH y cols., 1983).

Los gangliósidos, bien desde la membrana celular o bien en forma de complejos solubles, podrían modular la actividad de numerosas células, incluyendo una amplia variedad de funciones inmunes. Así, pueden inhibir la producción de anticuerpos "in vivo" (AGARWAL y NETER, 1971), la generación de células formadoras de anticuerpos "in vitro" (MILLER y ESSELMAN, 1975) y la respuesta proliferativa de linfocitos a mitógenos y antígenos "in vitro" (LENGLE y cols., 1979; WHISLER y YATES, 1980; YATES y cols., 1980; KRISHNARAJ y KEMP, 1982).

También se ha visto, que los gangliósidos son capaces de inhibir la proliferación de células autorreactivas (OFFNER y VANDENBARK, 1985; JACKSON y cols., 1987), lo cual sugiere que pudieran intervenir como inmunomoduladores en el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes. De hecho, se han detectado niveles elevados de gangliósidos en ciertas enfermedades con

anomalías inmunorreguladoras, tales como artritis reumatóide y esclerosis múltiple.

Asimismo, los gangliósidos podrían regular la actividad de los macrófagos. Se ha demostrado que estos lípidos bloquean la inhibición de la fagocitosis Fc-dependiente por lipopolisacárido en dichas células (COLEMAN y cols., 1986). También, pueden inhibir la fijación de lipopolisacárido a monocitos humanos, y de este modo, previenen la producción de interleukina-1 (IL-1) por los mismos (CAVAILLON y cols., 1987).

Todo esto ha llevado a algunos autores a afirmar que los gangliósidos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune (RYAN y SHINITZKY, 1979; SPIEGEL y cols., 1979; SELA, 1980; MARCUS, 1984).

Estos efectos son independientes de la procedencia de los gangliósidos, ya que se ha comprobado que tanto los gangliósidos cerebrales (MILLER y ESSELMAN, 1975; LENGLE y cols., 1979), como gangliósidos obtenidos a partir de un tumor murino (LADISCH y cols., 1981; LADISCH y cols., 1983), inhiben la activación por mitógenos y antígenos de linfocitos murinos "in vitro". No obstante, mientras los gangliósidos cerebrales no se encuentran presentes en la circulación periférica, los tumorales sí pueden estarlo (PORTOUKALIAN y cols., 1978). De este modo, los gangliósidos secretados por células tumorales entrarían en contacto con el sistema inmune "in vivo" más fácilmente, afectándolo significativamente.

Como decíamos antes, los gangliósidos pueden ser secretados por células tumorales, tanto "in vitro" como "in vivo", detectándose en fluido ascítico de ratones portadores de neoplasia (LADISCH y cols., 1983; GONWA y cols., 1984). Estos gangliósidos pueden producir una inmunosupresión generalizada, la cual, es característica de pacientes cancerosos (LENGLE y cols., 1979).

Se ha visto que la cantidad de gangliósidos en plasma o suero está aumentada en humanos (KLOPPPEL y cols., 1977; PORTOUKALIAN y cols., 1978) y animales (SKIPSKI y cols., 1975; LENGLE, 1979) con enfermedades malignas. KATOPODIS y cols. (1982) han cuantificado la cantidad de gangliósidos presentes en el suero de humanos con

cáncer y han demostrado niveles de más de 90  $\mu\text{g/ml}$ , mayores que los encontrados en el suero de controles normales.

Asimismo, KRISHNARAJ y cols. (1982) han demostrado que los niveles de gangliósidos circulantes estaban muy elevados en ratones con leucemia, y que estos niveles elevados podían interferir con las funciones linfocitarias normales en estos animales, como quedaba demostrado al analizar la respuesta inmune "in vitro" de timocitos y células esplénicas de dichos ratones, en presencia de niveles similares de gangliósidos.

Aunque ha habido autores (KRISHNARAJ y SAAT, 1981), que han atribuido la actividad inmunosupresora a gangliósidos procedentes de otras células presentes en el tejido canceroso, pero distintas de las tumorales, KOPROWSKI y cols. (1981) y MAGNANI y cols. (1981) han demostrado la secreción de un gangliósido asociado a un tumor, por medio de un anticuerpo monoclonal específico de dicho gangliósido en pacientes con carcinoma de colon.

YOGESWARAN y SALK (1981) sugirieron una relación entre el contenido total de ácido siálico en la membrana celular y el potencial metastático de un tumor, aunque se han obtenido resultados conflictivos al analizar el contenido total de gangliósidos (SKIPSKI y cols., 1980; YOGESWARAN y SALK, 1981). No obstante, ALESSANDRI y cols. (1987) han demostrado que los niveles de gangliósidos pueden influenciar el crecimiento del tumor primario y las metástasis, tanto en células humanas como en murinas.

Por tanto, de las experiencias anteriores se deduce que la inmunosupresión característica de los estados neoplásicos puede ser debida, al menos en parte, a la acción de los gangliósidos. Sin embargo, las células tumorales también son susceptibles de ser inhibidas por estos glicosfingolípidos. RITTER y cols. (1986) han demostrado que macrófagos estimulados son capaces de inhibir el crecimiento de ciertas células tumorales. La actividad inhibidora estaba localizada en la membrana macrofágica y correspondía a los gangliósidos.

La actuación de los gangliósidos como agentes inmunosupresores ha sido estudiada, sobretodo, en la proliferación de células T.

WHISLER y YATES (1980), sugirieron que la habilidad de los gangliósidos para inhibir las respuestas linfocitarias se veía influenciada por dos factores.

El primero, era que los gangliósidos ligados a liposomas eran generalmente inhibidores más efectivos de las respuestas proliferativas linfocitarias que los gangliósidos solos. No obstante, parecía haber resultados contradictorios al respecto (MILLER y ESSELMAN, 1975; LENGLE y cols., 1979), pudiendo explicarse éstos porque la capacidad inhibidora depende también de la subpoblación linfocitaria sobre la que actúen los gangliósidos.

El segundo factor era el estadio de activación linfocitaria, siendo la inhibición máxima cuando los gangliósidos están presentes durante el estadio prerreplicativo temprano, de forma similar a las lipoproteínas inmunorreguladoras (CURTISS y EDGINGTON, 1976; CHISARI, 1977). Por tanto, se requería una preincubación de aproximadamente 72 horas con gangliósidos, para que éstos pudieran inhibir la respuesta linfocitaria, y una de las explicaciones dadas por WHISLER y YATES (1980), es que la fijación temprana de gangliósidos puede ser de naturaleza diferente que la requerida para la inhibición de la activación linfocitaria, pudiendo ser ésta la inserción de gangliósidos sintetizados endógenamente por los propios linfocitos. De hecho, los estudios de KEEDAN y cols. (1974) y de CALLIES y cols. (1977) habían mostrado que las características de gangliósidos exógenos, fijados al plasmalema de eritrocitos, diferían de aquéllas de gangliósidos sintetizados de forma endógena por las propias células.

Los estudios recientes sobre el mecanismo de actuación de los gangliósidos se han centrado en la interacción de éstos con los mitógenos de células T (MERRIT y cols., 1984; ROBB, 1986; MARCUS y cols., 1987).

La proliferación de linfocitos T ha sido dividida en varios estadios. Durante el estadio inicial, la estimulación antigénica o mitogénica determina la secreción de la linfokina interleukina-2 (IL-2), así como, la expresión de un receptor en la superficie celular para este factor (CANTRELL y SMITH, 1984; ROBB, 1984). La

fijación de IL-2 a su receptor hace pasar a las células de la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular.

Según MERRIT y cols. (1984), los gangliósidos podían interferir en uno o más de los siguientes pasos en el proceso mitogénico de linfocitos T:

- 1) Interacción de gangliósidos con el mitógeno, resultando en la inhibición de una interacción productiva del mismo con macrófagos y/o células T.

- 2) Inhibición de la aparición de receptores para linfokinas, tales como IL-1 e IL-2.

- 3) Inhibición de la producción de estas linfokinas.

- 4) Inhibición de la proliferación de células T dependientes de linfokinas, particularmente, la proliferación terminal IL-2 dependiente.

En cuanto al primero de ellos, aunque se sabe que los gangliósidos pueden ligarse a la concanavalina A (ConA) (BOLDT y cols., 1977), éste no parece ser un mecanismo probable. LENGLE y cols. (1979) han mostrado que los gangliósidos no interfieren en la fijación de <sup>125</sup>I-ConA a timocitos. La producción de linfokinas y la aparición de receptores para IL-2, tampoco parecen aceptarse por la presencia de gangliósidos. Por tanto, el mecanismo más probable de actuación parece ser el cuarto. Este cuarto mecanismo, a su vez, presenta dos alternativas.

Los gangliósidos pueden interaccionar con la IL-2 en el medio, determinando una reducción de la concentración efectiva de la misma, o pueden interaccionar con la superficie celular, con incorporación en la membrana y subsiguientes efectos en el metabolismo celular, que determinarían la inhibición de la proliferación dependiente de linfokinas.

En cuanto a la primera alternativa, se sabe que los gangliósidos pueden ligarse a la IL-2 (PARKER y cols., 1984). Además, se sabe que los gangliósidos pueden interaccionar con otras linfokinas (MERRIT y cols., 1984), tales como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), interferón (IFN) y factor estimulador de colonias (C-SF).

Tanto ROBB (1986), como MARCUS y cols. (1987), han afirmado que uno de los principales mecanismos, por los cuales, los gangliósidos inhiben la proliferación de linfocitos T, es por secuestro o inactivación de la molécula de IL-2, impidiendo su interacción con su receptor de alta afinidad en el linfocito T activado. De este modo, impedirían la transición de las células T de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular. Además, ambos autores coinciden en que esta acción inhibitoria se acentúa con una incubación previa de los gangliósidos con IL-2. La explicación que dan a esto es que la afinidad de esta molécula por los gangliósidos es mucho menor que por su receptor de alta afinidad y, por tanto, sin esa preincubación, la IL-2 se uniría a su receptor estimulando la proliferación celular.

Sin embargo, la preincubación de células con gangliósidos no tenía ningún efecto en la afinidad de la IL-2 por su receptor, si los gangliósidos libres eran separados inmediatamente antes de realizar el ensayo. Esto sugiere que el efecto inhibitorio está mediado por una interacción directa entre la IL-2 y los gangliósidos, reafirmando esta idea el hecho de que estos lípidos bloquean también el enlace entre IL-2 y anticuerpos anti-IL-2.

Varios autores (HARDT y cols., 1981; MACA, 1983) han referido la presencia de un inhibidor de IL-2 en suero murino, pero no se ha llegado a identificar la naturaleza de dicha sustancia inhibitoria.

ROBB (1986), trabajando con distintas poblaciones linfocitarias, demostró que el efecto de los gangliósidos sobre la proliferación IL-2-dependiente de líneas de células T murinas y de linfoblastos humanos de 5 días, estimulados con PHA, podía ser reversible si se añadían niveles altos de IL-2. Sin embargo, en el caso de linfocitos frescos periféricos humanos, estimulados con mitógenos, la inhibición inducida por gangliósidos no era reversible por un incremento de los niveles de IL-2 exógena.

Esto demostraba que la inhibición de la proliferación por gangliósidos puede ser dividida en dos tipos de mecanismos, IL-2-reversible e IL-2-irreversible, el último de los cuales, predominaba durante el estadio inicial de activación celular. El mecanismo IL-2-reversible se explicaría por una competición entre



los gangliósidos y el receptor celular por el enlace con IL-2, es decir, por un secuestro o inactivación de la molécula IL-2, antes de fijarse a su receptor. En cuanto al mecanismo IL-2-irreversible, no se conoce con exactitud. Se ha sugerido que, aunque la IL-2 regula el nivel de su propio receptor (REEM y YEH, 1984; WELTE y cols., 1984), la activación de señales mediante la movilización de  $Ca^{++}$  y/o proteína-kinasa C, también parecen estar involucradas (DEPPER y cols., 1984; FARRAR y ANDERSON, 1985; TRUNEH y cols., 1985), y estas señales podrían ser susceptibles de una inhibición no competitiva por parte de los gangliósidos.

Todas estas experiencias han sido realizadas "in vitro", y no se conoce con exactitud si tendrán una equivalencia en experimentos "in vivo". Los gangliósidos están presentes en membranas celulares y en lipoproteínas, pero su concentración, respecto a otros lípidos, es muy baja, por lo que es difícil que los gangliósidos en su ambiente natural sean inmunosupresores. No obstante, se ha demostrado que estos lípidos se encuentran aumentados en diversas situaciones con anomalías inmunorreguladoras, tales como enfermedades autoinmunes y cáncer, y aquí, sí podrían jugar un importante papel inmunosupresor.

En cuanto a la mayor actividad inhibidora de unos tipos de gangliósidos sobre otros, los resultados son un tanto contradictorios, aunque en general, todos parecen ser inhibidores, siendo esta inhibición dependiente de la dosis y reversible al retirar los gangliósidos del medio.

MERRIT y cols. (1984), trabajando con gangliósidos de procedencia cerebral, demostraron que el monogangliósido  $GM_2$  era más inhibidor que el  $GM_1$  y el  $GM_3$ , y atribuyeron esta capacidad a la presencia de un residuo terminal de N-acetilgalactosamina en  $GM_2$ . La actividad del digangliósido  $GD_{1a}$  y del trigangliósido  $GT_{1b}$  era parecida a la de  $GM_2$ , mostrando que la presencia de una o más moléculas de ácido siálico es importante también en la capacidad inhibidora.

Por su parte, RITTER y cols. (1986), trabajando con gangliósidos macrofágicos, encontraron que los más inhibidores eran

el monogangliósido GM<sub>1</sub> y el digangliósido GD<sub>3</sub>, lo cual, contradecía en parte los resultados de MERRIT y cols. (1984).

Aparte de su efecto inmunosupresor, los gangliósidos han sido reconocidos como factores que inhiben el crecimiento celular en otros sistemas.

Se ha encontrado un incremento de la concentración de ciertos glicoesfingolípidos en la membrana celular de fibroblastos confluentes en cultivo, al comienzo del contacto entre célula y célula (HAKOMORI, 1975). Este incremento de glicoesfingolípidos, dependiente del contacto celular, no se observó cuando las células estaban transformadas. Las células transformadas tienen un modelo de glicoesfingolípidos diferente al de las células originales, y no dependen de este mecanismo de inhibición (FISHMAN y BRADY, 1976). No obstante, las células transformadas sí se inhiben cuando se añaden gangliósidos exógenos al cultivo. Efectos similares se observan también añadiendo mono, di o trigangliósidos cerebrales a células 3T3.

Se ha especulado también la posibilidad de que los macrófagos puedan ser capaces de reconocer gangliósidos modificados en células transformadas, y para inhibir su crecimiento, presentarían a dichas células sus propios gangliósidos de membrana (RITTER y cols., 1986).

Todas estas experiencias hablan en favor de la participación de los gangliósidos en los mecanismos de inhibición de la proliferación celular por contacto.

Por último, también se ha comprobado que la habilidad de una variante murina de fibroblastos para organizar fibronectina en la matriz extracelular, depende de ciertos gangliósidos (SPIEGEL y cols., 1986). La fibronectina es una proteína responsable de los mecanismos de fijación de los fibroblastos. No obstante, estos mismos autores han observado que la adhesión celular a fibronectina es independiente de estos gangliósidos.

## 8.12. OTROS FACTORES INHIBIDORES

Se han descrito otros muchos factores inhibidores, de diverso origen, que no están totalmente caracterizados.

Dentro de estos factores, algunos son de procedencia tumoral. KAMO y cols. (1975) demostraron que las células de un mastocitoma murino eran capaces de inducir inmunosupresión cuando se añadían a cultivos de células esplénicas de ratones normales. Igualmente, homogeneizados libres de células, preparados a partir del mastocitoma, así como, del fluido ascítico de los ratones portadores del tumor, tenían el mismo efecto.

Posteriormente, se han descrito otros factores de origen tumoral (OH y MOOLTEN, 1981a; OH y MOOLTEN, 1981b; ROTH y cols., 1982; ROTH y cols., 1983), parcialmente caracterizados. Incluso, aparte de caracterizar el factor inhibidor, algunos autores han descrito su forma de actuar.

EBERT y cols. (1987) han detectado un factor inmunosupresor, derivado de carcinoma de colon, que bloquea la proliferación de células T inducida por mitógenos, así como la producción de IL-2 por dichas células. Este factor tiene un peso molecular aparente de 56000 d., un punto isoeléctrico de 7,9, y es sensible a endopeptidasas, calentamiento a 56°C y valores extremos de pH. Su actuación sobre la división celular es posterior a la activación de las células T, y no parece disminuir la expresión de receptores para IL-2 en dichas células, ni tampoco, impedir la interacción de IL-2 con su receptor.

Otros autores han demostrado que los factores supresores, en pacientes cancerosos, pueden proceder de las propias células del huésped, aunque su liberación esté inducida por el tumor. MEDOFF y cols. (1984) demostraron que el antígeno carcinoembrionario (CEA), puede inducir la liberación de un factor inmunosupresor inespecífico por parte de células mononucleares humanas de sangre periférica "in vitro". Posteriormente, MEDOFF y cols. (1986), han detectado en ascitis de pacientes cancerosos, con un alto nivel de CEA, una molécula cuyas características fisicoquímicas son similares o idénticas al factor anterior. Ambas moléculas tienen un peso molecular similar (50000 d.), igual punto isoeléctrico (pI:3,4) y son estables a 70°C y en medio ácido, y resistentes a proteasas. La oxidación por periodato destruye la capacidad supresora del factor, sugiriendo la importancia de los

carbohidratos en la molécula, para su actuación como inmunosupresora.

Asimismo, FUJIWARA y ELLNER (1986) han demostrado que la línea celular macrofágica U937 produce espontáneamente un factor no dializable que inhibe la blastogénesis inducida por interleukina-1 (IL-1), interleukina-2 (IL-2) y fitohemaglutinina (PHA) en timocitos murinos. Esto sugiere que los macrófagos también jugarían un papel importante en la inmunosupresión. De hecho, se ha demostrado una supresión por células mononucleares adherentes en diversas enfermedades, incluyendo tuberculosis (ELLNER, 1978), infecciones fúngicas crónicas (STOBO, 1977), infecciones por parásitos (OTTESEN, 1979) y tumores sólidos (BERLINGER y cols., 1976).

Por tanto, parece ser que estos factores inhibidores pueden ser producidos, tanto por células tumorales como por células normales, y dichos factores pueden formar parte del mecanismo fisiológico de regulación del crecimiento.

Un ejemplo de esto, lo constituye un factor supresor de células T detectado en bazo de ratones DBA/2 por STEELE y cols. (1985). Estos autores describen un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con dicho factor (TsF) y con células T supresoras de los mismos ratones. El TsF parece ser un dímero, en condiciones naturales, de un peso molecular de aproximadamente 80 a 90 Kd., y que puede disociarse en dos moléculas iguales, a la hora de actuar.

Asimismo, MOOTON y cols. (1985) han demostrado que el suero murino normal inhibe la proliferación de linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2, indicando que probablemente un componente del suero murino normal es directamente inhibidor de la proliferación dependiente de esta linfokina. Sin embargo, el suero murino también inhibe la proliferación de células independientes de IL-2, así como, la de varias líneas celulares tumorales, por lo que es dudoso que dicho factor inhiba específicamente la IL-2.

Posteriormente, LELCHUK y cols. (1987) han sugerido la existencia de un factor de similares características en el suero humano. No obstante, al igual que ocurría con el suero murino, la

inhibición no era específica de células dependientes de IL-2, por lo que también parece dudosa su existencia.

Lo que sí parece estar claro es que, tanto en suero murino como en suero humano, existen factores que inhiben la proliferación linfocitaria, y que estos factores pueden tener una importancia fisiológica.

GUEVARA y cols. (1986) han descrito también un factor en el suero de ratones normales que inhibe el crecimiento tumoral (GIF). Es posible que este factor sea similar al descrito por HOOTON y cols. (1985), pero no se ha llegado a caracterizar. No obstante, GUEVARA y cols. (1986) han relacionado los niveles de GIF con la actividad NK en ratones, por lo que la asociación con el factor inhibidor de IL-2 no parece tan probable.

Se han descrito otros factores inhibidores en relación con la proliferación de fibroblastos.

Así, CORPS y cols. (1985) han descrito un péptido que inhibe la estimulación mitogénica de células 3T3 de ratón Swiss por bombesina o vasopresina. Este péptido se ha identificado como un análogo de la sustancia P (D-Arg<sup>1</sup>, D-Pro<sup>2</sup>, D-Irp<sup>7,8</sup>, Leu<sup>11</sup> sustancia P) y es improbable que su efecto inhibidor se deba a la estimulación de un receptor inespecífico, puesto que la proliferación inducida por otros factores estimuladores, como el PDGF, no es antagonizada por dicho factor.

Por otra parte, se ha aislado a partir de medio condicionado por exposición a células 3T3 inhibidas por contacto, un factor regulador del crecimiento que inhibe reversiblemente la síntesis de DNA y la proliferación de fibroblastos (HSU y WANG, 1986), del cual, hemos hablado ya anteriormente. Este factor, denominado FGR-s (fibroblast growth regulator, soluble form) contiene dos polipéptidos principales, y parece actuar inhibiendo la proliferación celular a través de un mecanismo autocrino.

Las principales características de la actuación del FGR-s sobre células 3T3 son:

- a) La curva de dosis-respuesta indica que el 50% de inhibición se obtiene a una concentración de 3 mg/ml, correspondiente a 0,23 nM.

- b) El efecto del FGR-s sobre dichas células es reversible y no puede atribuirse a citotoxicidad.

- c) El efecto del FGR-s sobre la síntesis de DNA es más prominente a alta densidad de las células diana.

- d) La inhibición de FGR-s sobre células 3T3 es más potente a bajas concentraciones de suero fetal.

Previamente, WELLS y MALLUCI (1983), habían descrito que cultivos secundarios de fibroblastos de embriones de ratón liberaban al medio un factor inhibidor del crecimiento, cuyas características podían corresponder al descrito posteriormente por HSU y WANG (1986). También, hay que destacar que se han descrito por varios autores (NATRAJ y DATTA, 1978; WHITTENBERGER y cols., 1978; PETERSON y cols., 1982; HAREL y cols., 1984) fracciones solubles y asociadas a la membrana de células 3T3, con capacidad de inhibir el crecimiento celular y que, igualmente, podrían tener propiedades similares al FGR-s.

Por otra parte, se ha demostrado que fibroblastos humanos pueden dividir o modular el crecimiento de algunas líneas celulares tumorales humanas (KIRK y cols., 1981; KIRK y cols., 1983; IMANISHI y cols., 1983). Asimismo, WU y cols. (1985) han demostrado que el crecimiento de líneas celulares de linfoma de Burkitt y de melanoma humano es inhibido por ciertas líneas celulares humanas similares a fibroblastos, especialmente, por miofibroblastos humanos. El efecto inhibidor es dependiente del tiempo y la concentración, reversible, y sensible al tratamiento con pronasa.

Otros autores han referido diversos factores inhibidores liberados por fibroblastos humanos, cultivados "in vitro". GARCIA-GIRALT y cols. (1970) describieron un inhibidor detectado en el sobrenadante de células WI-38, exhaustas tras repetida estimulación por sucesivos cambios de medio. STROBEL-STEVENS y LACEY (1981) mostraron que se podía extraer un inhibidor de fibroblastos humanos por lavados con PBS, el cual, inhibía la proliferación de la línea celular de la cual derivaba. Asimismo, KIRK y cols. (1981) demostraron que una línea fibroblástica neonatal inhibía el crecimiento de células de cáncer de próstata.

Se han descrito otros factores inhibidores en diversos tejidos de animales. Se ha purificado a partir de hígado de rata un inhibidor de la proliferación de hepatocitos (McMAHON y LYPE, 1980; McMAHON y cols., 1982). Este factor inhibe, reversiblemente, la proliferación de células de hígado de rata en cultivo, pero no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células de hepatoma. También, se ha descrito una fracción glicopeptídica en células del córtex cerebral bovino, que inhibe la síntesis protéica y el crecimiento de células normales, pero no de células neoplásicas (KINDERS y JOHNSON, 1982). Finalmente, un inhibidor del crecimiento de células del carcinoma de mama Ehrlich, ha sido purificado a partir de la glándula mamaria bovina (BOHMER y cols., 1984; BOHMER y cols., 1985).

Aparte de todos estos factores, que en su mayoría son de tipo peptídico, existen otra serie de factores, aún no bien caracterizados, cuya composición es lipídica.

BORDES y cols. (1988) identificaron en un linfoma de ratón (MCG3) los llamados "factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular" (CPIF). Son moléculas con un tamaño inferior a los 12000 d., cuya actividad no es específica de especie (inhiben células de ratón y humanas), ni de tipo de tejido, ni del carácter tumorigénico o no de las células.

Los CPIF producen inhibición de la síntesis de RNA y DNA, lo que podría inducir a pensar, que provocan un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, en la que se sintetiza RNA, y por lo tanto, no pasarían a la fase S, en la que se sintetiza el DNA.

Su desarrollo por cromatografía en capa fina evidenció dos picos importantes de actividad, demostrando que los factores activos pertenecían a una familia de lípidos de alta polaridad, probablemente gangliósidos, los cuales son lípidos que también presentan inhibición de la proliferación celular (KRISHNARJ y cols., 1982). Este desarrollo cromatográfico no demostró relación con otros factores inhibidores de la proliferación celular, tales como prostaglandinas, aldosterona y cortisona.

El equivalente humano del CPIF podría ser el SIF (soluble inhibitory factor), detectado por WOLF y MERLER (1979) en

sobrenadante de linfocitos T humanos, estimulados por mitógenos. El SIF es una linfokina supresora, derivada de células T, y ha sido encontrada también en suero normal humano (WOLF y ANDREONI, 1982). Igualmente, WOLF y cols. (1983) han demostrado su existencia en cultivos de otros tumores humanos de estirpe no inmune, tales como el coriocarcinoma JEG-3.

Como el CPIF, el SIF también tiene actividad inmunosupresora, pero también inhibe células no inmunes. El SIF, de forma probablemente análoga al CPIF, es transportado en el suero por una proteína de un peso molecular de 150000 d.

GARCIA-OLIVARES y RODRIGUEZ-VEDIA (1985) y WILE y cols. (1984) han detectado factores lipídicos que inhiben la proliferación celular en el fluido ascítico de varios tumores. Igualmente, COLLINS y cols. (1987) han detectado un factor(es) de tipo lipídico en el medio condicionado de un cultivo de células leucémicas, que inhibe la proliferación linfocítica.

Todos estos factores pueden ser similares a los CPIF, y todos ellos pueden ser liberados al medio extracelular por los tumores, uniéndose en dicho medio a proteínas transportadoras, formando una lipoproteína (GARCIA-OLIVARES y RODRIGUEZ-VEDIA, 1985). Su mecanismo de acción se podría explicar, entonces, por dos medios: bien penetrando en el interior de la célula, debido a su carácter lipídico, o bien unido a una macromolécula transportadora, podría actuar sobre un receptor de membrana específico para ella.

Los CPIF se ajustan al concepto de lo que BURTON (1975) denominó "sustancia clave", responsable, según él, de la inhibición por contacto.

Asimismo, los CPIF parecen inhibir más intensamente a las células normales que a las tumorales. Estos factores serían secretados por las células al proliferar, y mediante un mecanismo "feed-back", regularían esta proliferación celular. Si la célula es de carácter neoplásico, tendría un mecanismo de regulación defectuoso, y por lo tanto, es de esperar que no sean tan efectivamente inhibidas como las normales.

Según este comentario, habría que encuadrar a los CPIF dentro del grupo de factores inhibidores de la proliferación celular, que



junto con los factores de crecimiento polipeptídicos (PGF) y las poliaminas, son secretados por las células al proliferar.

Por último, hay que referir que membranas plasmáticas de linfocitos murinos y de células tumorales linfoides pueden inhibir, reversiblemente, el crecimiento, tanto de linfocitos normales como de linfocitos transformados (STALLCUP y cols., 1984a; STALLCUP y cols., 1984b). El inhibidor puede ser extraído con solventes orgánicos y tiene propiedades características de un componente lipídico, o similar a un lípido, de la membrana (STALLCUP y cols., 1984c).

Posteriormente, STALLCUP y cols. (1986) han detectado el mismo factor en membranas celulares de un hibridoma macrofágico. Este inhibidor es probable que tenga un papel fisiológico en el control del crecimiento y en la inmunorregulación mediada por macrófagos, y quizás, actúe a través de un mecanismo que involucra el contacto célula-célula.

Aunque no se conoce la naturaleza exacta de los factores lipídicos descritos por STALLCUP y cols., es probable que sean idénticos o parecidos a los CPIF, y que ambos formen parte de un mecanismo general regulador de la proliferación celular, pudiendo intervenir también en el funcionamiento íntimo de la inhibición por contacto.

OBJETIVO

---

---

Los factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular (CPIF) han sido descritos, previamente, en un linfoma T de ratón y en células de bazo de ratón. Dado que el líquido amniótico está en íntimo contacto con células que presentan una intensa proliferación y que están sometidas a un estrecho control inmunológico, el objeto de la presente Tesis es detectar estos factores (CPIF) en el líquido amniótico humano.

Se estudiará el efecto del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la proliferación de células de distinta especie y estirpe, así como su mecanismo de actuación.

Caracterizaremos los lípidos incluidos en dicho extracto (AFLE) por cromatografía en capa fina y, asimismo, analizaremos la actividad de cada fracción lipídica sobre la proliferación celular.

También investigaremos la presencia de estos factores en otras células o fluidos, tanto humanos como murinos, de distinta naturaleza.

Finalmente, estudiaremos la dinámica de crecimiento del sistema de fibroblastos NIH 3T3, los cuales presentan capacidad de inhibirse por contacto, así como la posible participación de los lípidos inhibidores en los mecanismos que regulan la proliferación de este tipo de células.

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

---

---

**I. MATERIAL**

## 1. MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO

Se han utilizado 90 muestras de líquido amniótico (de 5 a 10 cm<sup>3</sup> cada una) obtenidas por amniocentesis, en condiciones estériles, en la U.C.I.F. del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico "San Cecilio" de Granada. Se rechazaron las muestras contaminadas, a simple vista, por sangre o meconio.

## 2. MUESTRAS DE SUERO SANGUINEO

Se han utilizado 20 muestras de suero obtenidas a partir de sangre venosa periférica de individuos adultos normales.

## 3. ANIMALES UTILIZADOS

Se han utilizado ratones de las siguientes cepas:

- BALB/C.
- DBA/2.
- Swiss albino.

Todos ellos procedían de padres donados por Charles River (Francia) y han sido criados en el criadero de animales del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

## 4. CELULAS UTILIZADAS

### 4.1. LINFOCITOS HUMANOS

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de sangre venosa periférica de individuos adultos normales.

#### 4.2. CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON

Estas células fueron obtenidas a partir del fémur y tibia de ratones de la cepa endogámica BALB/C.

#### 4.3. LINEAS CELULARES ESTABLECIDAS

Todas las líneas celulares establecidas se conservan congeladas en nitrógeno líquido (-196° C).

##### 4.3.1. CELULAS HUMANAS

Nombre	Tipo	Inducción	Cultivo
HELA	Carcinoma	Espontánea	Monocapa
K-562	Eritroleucemia	Espontánea	Suspensión
CHANG	Células hepáticas	Células normales	Monocapa
EHRlich	Carcinoma	Química	Suspensión

##### 4.3.2. CELULAS DE RATON

Nombre	Tipo	Inducción	Cepa	Cultivo
A1	Plasmocitoma	Choque alógeno	BALB/C	Suspensión
MCG3	Linfoma T	3-metil-colantreno	B-10	Suspensión
P815X2	Mastocitoma	3-metil-colantreno	DBA/2	Suspensión
SL2	Linfoma T	Espontánea	DBA/2	Suspensión

Dentro de estas líneas celulares establecidas, distinguimos, como un punto aparte, los fibroblastos de ratón NIH 3T3.

Estas células son originarias de la cepa de ratón Swiss albino. Son células "iniciadas", es decir, no presentan crecimiento limitado en cultivo, y crecen en monocapa. A partir de las mismas, y por cultivo continuado con cantidades crecientes de suero fetal de ternera durante 2 meses, renovando el medio pero sin despegar la monocapa de células, obtuvimos otro estadio de transformación neoplásica, diferente al anterior, tanto en su morfología como en las características de crecimiento.

Por tanto, trabajamos con una célula (NIH 3T3) en 2 estadios diferentes de transformación neoplásica:

- NIH 3T3 INICIADAS (NIH 3T3 I): Crecen en monocapa y presentan inhibición por contacto.

- NIH 3T3 TRANSFORMADAS (NIH 3T3 T): Crecen en monocapa, pero debido a que tienen deteriorada la inhibición por contacto, pueden crecer también en suspensión. Su ritmo de crecimiento es superior a las anteriores y, al inocularlas "in vivo" en el receptor apropiado (ratón Swiss albino), originan un tumor, es decir, son tumorigénicas. Nosotros inoculamos 5 ratones con las células NIH 3T3 T, y en los 5 se originó una ascitis tumoral.

En las siguientes fotografías podemos observar las características morfológicas de estos dos tipos celulares (NIH 3T3 I y NIH 3T3 T). Estas fotografías están tomadas a 600 aumentos con el equipo fotográfico de un microscopio de contraste de fases.

En la fotografía (A) podemos observar varias células NIH 3T3 I en un estado de "no confluencia", es decir en un estado de baja densidad celular.

La fotografía (B) corresponde a una panorámica de células NIH 3T3 I totalmente confluentes.

En la fotografía (C) podemos observar una célula NIH 3T3 I que se está dividiendo, dando origen a una nueva célula.

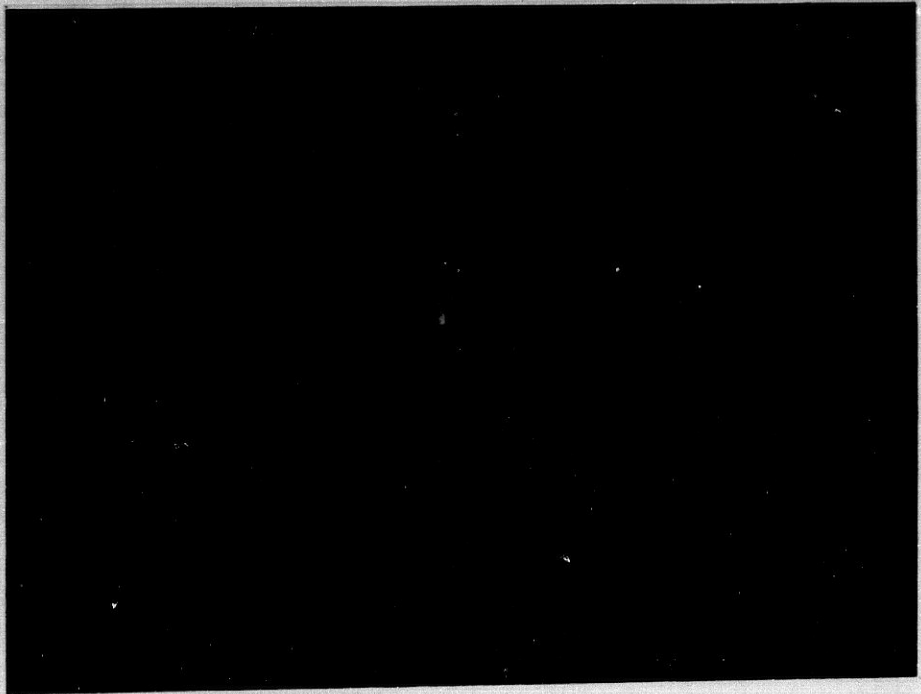
Por último, en la fotografía (D) se observan varias células NIH 3T3 T, las cuales se están multiplicando activamente.



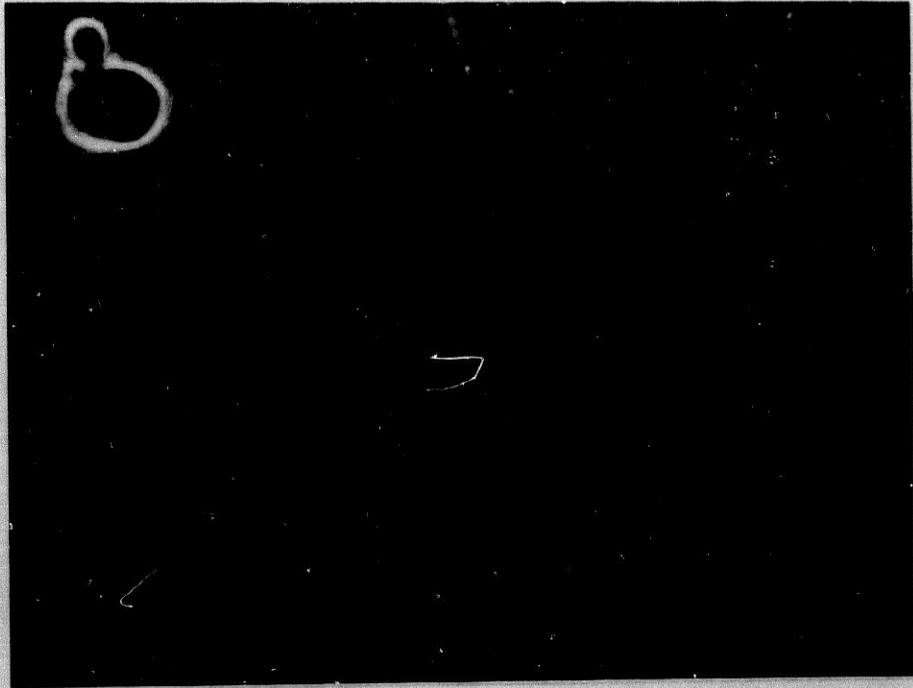
**A**



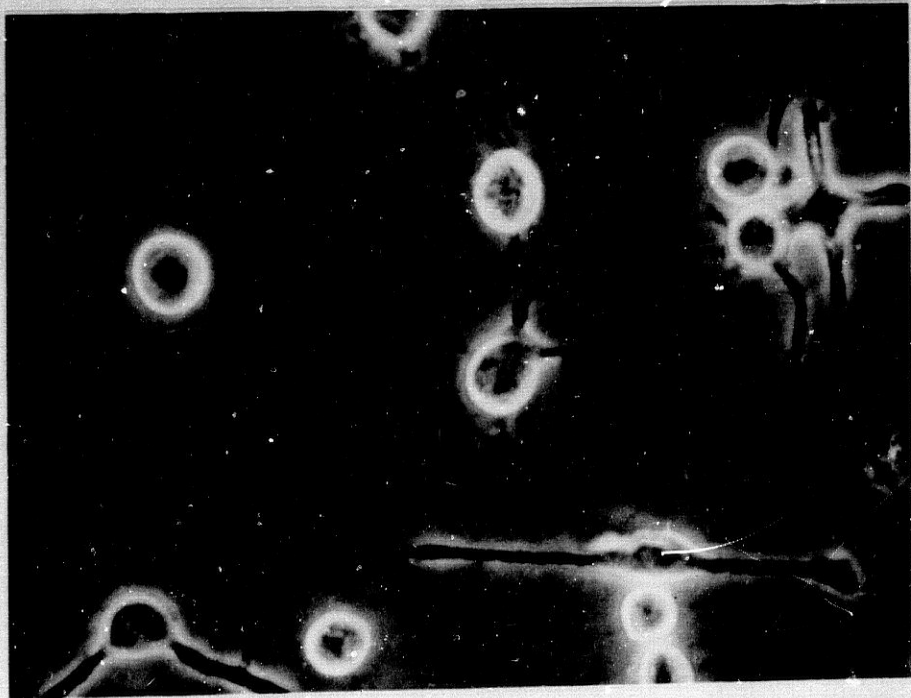
**B**



C



D



## 5. REACTIVOS

- PBS: solución salina tamponada con fosfato.

Componentes:

- NaCl (Merck, R.F. Alemania).
- KCl (Merck, R.F. Alemania).
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, R.F. Alemania).
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, R.F. Alemania).

- Buffer tripsina-EDTA.

Componentes:

- PBS.
- Tripsina (Sigma, E.E.U.U.).
- EDTA (Sigma, E.E.U.U.).

- Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM).

Componentes:

Sobre de DMEM con glutamina (0,584 g/l), hepes (5,959 g/l) y glucosa (4,5 g/l) (Sigma, E.E.U.U.).

- Penicilina G sódica (Antibióticos S.A., España).
- Gentamicina (Antibióticos S.A., España).
- Fungizona "Squibb" (Flow, Inglaterra).
- Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Merck, R.F. Alemania).

- Suero fetal de ternera (Flow, Inglaterra).

- Medio de separación de linfocitos "Ficoll-Paque" (Pharmacia, Suecia).

- Fitohemaglutinina (PHA) (Wellcome, Inglaterra).

En forma liofilizada, se diluye en PBS estéril a la concentración de 0,5 µg/µl, congelándose a -20°C.

- Disolventes orgánicos:

- Etanol absoluto (Merck, R.F. Alemania).
- Cloroformo (Merck, R.F. Alemania).
- Metanol (Merck, R.F. Alemania).

- Estándares de lípidos para cromatografía:

- Prostaglandinas: PG E<sub>2</sub> y PG F<sub>2α</sub> (Sigma, E.E.U.U.).

- Gangliósidos (Sigma, E.E.U.U.).
- Fosfatidil-inositol (Sigma, E.E.U.U.).
- Fosfatidil-colina (Sigma, E.E.U.U.).
- Esfingomiéline (Sigma, E.E.U.U.).
- Ácidos grasos (Wako Chemicals, E.E.U.U.).
- Yodo resublimado (Panreac, España)
- Material para radioanálisis:
  - Timidina tritiada ( $^3\text{H-T}$ ) (Amershan, Inglaterra).
  - Concentración radioactiva: 1  $\mu\text{Ci/ml}$ .
  - Líquido de centelleo:
    - Toluol (Merck, R.F. Alemania).
    - PPO (2,5-difeniloxazol) (Merck, R.F. Alemania).
    - POPOP (P-bis 2,5 feniloxazol-benceno) (Merck, R.F. Alemania).

## 6. MATERIAL PLÁSTICO

- Placas de microcultivo de fondo plano (Sterilin, Inglaterra).
- Placas de microcultivo de fondo en U (Sterilin, Inglaterra).
- Frascos de cultivo celular "Falcon", de 25  $\text{cm}^2$  de superficie (Flow, Inglaterra).
- Tubos de ensayo universales (Labclinics, España).
- Placas de Petri (Sterilin, Inglaterra).
- Pipetas estériles (Nunc, Dinamarca).
- Tubos de 1  $\text{cm}^3$  para congelación de líneas celulares establecidas (Nunc, Dinamarca).
- Jeringas de insulina (Ico, España).

## 7. MATERIAL DE VIDRIO

- Pipetas (Brand, R.F. Alemania).
- Pipetas Pasteur (Brand, R.F. Alemania).
- Matraces Erlenmeyer (Schot Duran, R.F. Alemania).
- Matraces aforados (Schot Duran, R.F. Alemania).
- Vasos de precipitado (Schot Duran, R.F. Alemania).
- Probetas (Schot Duran, R.F. Alemania).
- Bolitas para desfibrinación sanguínea (Eurolab, España).

## 8. INSTRUMENTOS Y APARATOS

- Autoclave (Hirayama, Japón).
- Estufa Pasteur (Comercial Técnica Hospitalaria S.A., España).
- Contenedor de nitrógeno líquido, "Dx55AT" (L'air liquide, Francia).
- Bombona de nitrógeno gaseoso (Oxhidrica Malagueña, España).
- Cámara estéril por flujo laminar "Gel'aire" (Flow, Inglaterra).
- Centrifugas:
  - Macrotronic (Selecta, España).
  - Refrigerada "TJ-6" (Beckman, E.E.U.U.).
  - Ultracentrifuga "TG-65" (Kontron, Suiza).
- Microscopio óptico de contraste de fases (Zeiss, R.F. Alemania).
- Microscopio óptico de contraste de fases y de fluorescencia, con equipo de fotografía incorporado (Olympus, Japón).
- Cámara de recuento microscópico celular "Neubauer" (Saaringia, R.F. Alemania).
- Estufa regulada a 37°C con atmósfera humidificada (Forma Scientific, E.E.U.U.).

- Sonicador, 30 micrones (Atalo, España).
- Homogeneizador "Politron" (Kinematica Kriens-Luzem, Suiza).
- Recolector semiautomático de células, "Titertek" (Skatron, E.E.U.U.).
- Contador de radioactividad  $\beta$ , "Betamatic" (Kontron, Suiza).
- Peachímetro 601 A/digital (Orion Research, E.E.U.U.).
- Balanza de precisión "H-15" (Mettler, Suiza).
- Pipetas automáticas, "Hamilton" (Hamilton Bonaduz AG, Suiza).
- Papel de filtro "GF/A" (Whatman, Inglaterra).
- Filtros estériles, de 0,22  $\mu$  y de 0,45  $\mu$  de diámetro de poro (Millipore, E.E.U.U.).
- Placas cromatográficas de sílica gel (20x20 cm y 0,25 mm de espesor) (Merck, R.F. Alemania).
- Cubeta cromatográfica (Shandon, R.F. Alemania).
- Baño termostatzado "Tronic" (Atom, España).
- Agitador continuo (Atom, España).
- Cámara de secado (Comercial Técnica Hospitalaria S.A., España).
- Espectrofotómetro "Photon TM Immunoasay Analyzer" (Hybritech, E.E.U.U.).

II. METODOS

## 1. ESTERILIZACION DE MATERIALES Y REACTIVOS

El material de vidrio y los líquidos termoestables se esterilizan con calor húmedo, obtenido por autoclave a una presión de 1,5 atmósferas, durante 30 minutos.

Los líquidos termolábiles se hacen pasar por filtros estériles "Millipore" (0,22  $\mu$  y 0,45  $\mu$  de diámetro de poro).

## 2. PREPARACION DE PBS

Se disuelven en 900 ml de agua bidestilada los siguientes solutos:

- 8,00 g de NaCl.
- 0,20 g de KCl.
- 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- 0,20 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Esta disolución se completa con agua bidestilada hasta un volumen de 1000 ml y se ajusta a un pH de 7,2. Finalmente, se esteriliza en autoclave.

## 3. PREPARACION DEL BUFFER TRIPSINA EDTA

En 900 ml de PBS estéril se disuelven:

- 0,50 g de tripsina.
- 0,20 g de EDTA.

Se completa con PBS hasta un volumen final de 1000 ml. Se ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza por filtración a través de filtros "Millipore" (0,22  $\mu$  y 0,45  $\mu$  de diámetro de poro). Se alicuota a 10 ml y se guarda congelado a  $-20^\circ\text{C}$ .



#### 4. PREPARACION DEL LIQUIDO DE CENTELLEO

Se prepara disolviendo 5,0 g de PPO y 0,5 g de POPOP en 1 litro de toluol. A continuación se agita bien y se guarda en un lugar oscuro.

#### 5. PREPARACION DEL SUBRO FETAL DE TERNERA

Se descomplementa a 56°C durante 30 minutos en baño termostatzado. A continuación se distribuye en tubos estériles de 10 ml para congelarlos a -20°C, hasta el momento de su uso.

#### 6. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

A 900 ml de agua bidestilada se le añaden los siguientes solutos:

- Un sobre de DMEM (aproximadamente 10,3 g).
- 100000 U.I. de Penicilina G Sódica.
- 50 mg de Gentamicina.
- 0,25 g de Fungizona.
- 3,70 g de NaHCO<sub>3</sub>.

Esta mezcla, tras su agitación, se lleva a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada y se ajusta el pH a 7,2. Se congela en alícuotas de 90 ml a -20°C.

Para su utilización, se descongela cada alícuota en baño termostatzado a 37°C. Se esteriliza por filtración en filtros "Millipore" (0,22  $\mu$  y 0,45  $\mu$  de diámetro de poro). Se añade la cantidad necesaria de suero fetal de ternera estéril, correspondiente a la concentración del mismo a la que se quiera ajustar (Ej.: 10 ml para una concentración del 10%).

## 7. OBTENCION DE CELULAS FRESCAS NORMALES DE RATON Y HUMANAS

### 7.1. CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON

Se obtienen del fémur y tibia de ratones normales de la cepa BALB/C, los cuales son sacrificados por dislocación cervical.

Mediante una jeringa de insulina se hace pasar disolución de PBS a través del canal medular del hueso, recogiendo en tubo de ensayo la suspensión celular. Tras dejarla en reposo unos minutos, con objeto de que se depositen restos tisulares de gran tamaño, extraemos con pipetas Pasteur la suspensión de células, que se lleva a un tubo de ensayo de fondo en U. Se centrifuga a 500 g durante 10 minutos y se decanta el sobrenadante. Se vuelve a lavar el PBS y se repite la centrifugación, desechando de nuevo el sobrenadante.

El sedimento celular está listo para las operaciones subsiguientes de conteo, viabilidad y ajuste. Todas estas operaciones se realizan en un ambiente estéril.

### 7.2. LINFOCITOS HUMANOS

Se extraen 20 ó 30 ml de sangre de las venas periféricas de individuos adultos normales. Depositándola en un matraz Erlenmeyer que contiene bolas de vidrio, se agita suavemente hasta que éstas dejan de sonar, para conseguir la desfibrinización.

A estos ml de sangre venosa desfibrinizada se le añade el mismo volumen de PBS. A continuación, se procede a separar los linfocitos del resto de células, según el método descrito por BOYUM (1968) modificado: dos partes de la mezcla anterior (una parte de sangre y una parte de PBS) se hacen resbalar lentamente sobre la pared de un tubo de ensayo que contiene una parte de medio de separación de linfocitos. Después de centrifugar a 1000 g durante 20 minutos, aparece una corona blanca en la interfase del medio y del PBS, formada por linfocitos. Los hematíes, más densos, se depositan en el fondo del tubo. Se extrae la corona con pipetas Pasteur y se lava 2 veces con PBS, centrifugando a 500 g durante 10 minutos, para eliminar los restos de medio de separación.

Todo este proceso se realiza en ambiente estéril y, al final, el sedimento celular está listo para la operación de contaje, viabilidad y ajuste.

### 7.3. CONTAJE, VIABILIDAD Y AJUSTE

El sedimento celular obtenido, según los métodos anteriores, se resuspende en 2 ml de medio de cultivo DMEM. Se agita bien y, mediante un capilar, se toma una muestra que se lleva a una cámara de contaje "Neubauer".

Por medio del microscopio de contraste de fases, podemos observar la viabilidad y hacer el recuento celular.

Finalmente, las distintas suspensiones celulares se ajustan a las respectivas concentraciones con que se utilizan en el radioanálisis:

- Células de médula ósea:  $2 \times 10^6$  cel/ml.
- Linfocitos humanos:  $1,25 \times 10^6$  cel/ml.

En ninguna experiencia se utilizaron células de viabilidad inferior al 90%.

## 8. PREPARACION Y CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES ESTABLECIDAS

### 8.1. DESCONGELACION

Como especificábamos anteriormente, estas líneas celulares se conservan congeladas en nitrógeno líquido.

Para proceder a la descongelación, en un ambiente estéril, se añade suavemente PBS en el tubo donde se encuentran las células. Una vez descongeladas, se resuspenden en más PBS y se centrifugan a 500 g durante 10 minutos. Esta operación se repite por segunda vez para eliminar los restos del medio de congelación.

El sedimento celular obtenido se resuspende en medio de cultivo DMEM y se efectúa el contaje, se ve su viabilidad y se ajusta según el método descrito anteriormente.

La concentración para el radioanálisis de todas las líneas celulares establecidas (excepto para los fibroblastos NIH 3T3) será

de  $2,5 \times 10^5$  cel/ml. Para los fibroblastos NIH 3T3 la concentración podrá variar entre  $10^4$  y  $4 \times 10^5$  cel/ml.

En ninguna experiencia se utilizaron células de viabilidad inferior al 90%.

## 8.2. CULTIVO

Durante todo el período de utilización, se mantuvieron en cultivo las líneas celulares establecidas. Dicho cultivo se realiza de dos formas, según el modo de crecimiento de la célula: "suspensión" y "monocapa".

### 8.2.1. SUSPENSION

Partiendo del sedimento celular, una vez contadas las células y observada su viabilidad, se ajustan a una concentración de  $2 \times 10^5$  cel/ml en medio de cultivo y se llevan a un tubo "Falcon".

El tubo "Falcon" se deposita en un incubador a  $37^\circ\text{C}$  con atmósfera humidificada. Cada 2 ó 3 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento celular, se centrifuga el contenido de dicho tubo a 500 g durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspende en PBS y se repite la operación un par de veces para eliminar restos celulares del cultivo. Tras esto, el sedimento celular se resuspende en 2 ml de medio de cultivo y, contado el número de células y observada su viabilidad, se ajusta su concentración para radioanálisis y/o para posterior cultivo.

### 8.2.2. MONOCAPA

Ciertas líneas celulares, como los fibroblastos NIH 3T3, las células HELA y las CHANG, crecen en monocapa pegadas al fondo del tubo "Falcon".

Para su cultivo, se echan aproximadamente 300000 células por tubo "Falcon" y se completa hasta 10 ml con medio de cultivo. A continuación, se guardan en incubador a  $37^\circ\text{C}$ , de la misma forma que en el apartado anterior.

Cada 2 ó 3 días, se procede al cambio de medio. Para ello, se retira el medio antiguo y se añade PBS para lavar las células de posibles restos celulares. A continuación, se añaden 10 ml de medio de cultivo nuevo.

Cuando la monocapa ocupa toda la superficie del fondo del tubo "Falcon", se procede a despegar las células, para recultivar o para radioanálisis. Para ello, se retira el medio, se lava con PBS y se añaden 10 ml de buffer Tripsina-EDTA por tubo "Falcon". Se tienen a 37°C durante 10 minutos y se lleva la suspensión a un tubo de ensayo. Se centrifuga a 500 g durante 10 minutos. El sedimento celular se lava 2 veces con PBS, centrifugando a 500 g durante 10 minutos, para eliminar residuos del buffer Tripsina-EDTA. El sedimento celular se resuspende en 2 ml de medio de cultivo y, contado el número de células y observada su viabilidad, se ajusta su concentración para radioanálisis y/o cultivo.

En todos los procesos descritos anteriormente, ya sea sobre células frescas o sobre líneas celulares establecidas, es fundamental la existencia de un ambiente estéril para evitar contaminaciones posteriores.

## **9. PREPARACION DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS LIPIDICOS**

### **9.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS LIPIDICOS**

#### **9.1.1. LIQUIDO AMNIOTICO**

El líquido amniótico, obtenido en condiciones estériles y dispensado en tubos de ensayo, se centrifuga a 2000 g durante 30 minutos. A continuación, se recoge el sobrenadante y se alicuota en otros tubos de ensayo también estériles. Estos tubos se congelan a -20°C hasta su uso, bien como líquido amniótico crudo, o bien para proceder a la extracción lipídica, para lo cual se mezclan todas las muestras.

Se hicieron dos extracciones lipídicas de líquido amniótico:

- I: Se mezclaron 40 muestras.
- II: Se mezclaron 50 muestras, diferentes a las anteriores.

### 9.1.2. SUERO SANGUINEO

La sangre venosa, obtenida en condiciones estériles, se dispensa en tubos en ensayo. Después se incuba durante 1 hora a 37°C para que se retraiga el coágulo, y se centrifuga a 500 g durante 10 minutos.

A continuación, se recoge el sobrenadante de cada una de las muestras (correspondiente al suero) y se alicuota en otros tubos de ensayo también estériles. Estos tubos se congelan a -20°C hasta realizar la extracción lipídica, para lo cual se hace una mezcla del "pool" de sueros.

Se mezclaron en total 20 sueros procedentes de individuos diferentes.

### 9.1.3. TUMORES "EHRlich" Y "SL2"

Las células tumorales, suspendidas en la solución PBS, son inoculadas intraperitonealmente en la cepa de ratón correspondiente a su origen (Swiss albino para EHRlich y DBA/2 para SL2). Se inoculan  $2 \times 10^6$  células tumorales por ratón.

Una vez que los ratones desarrollan una ascitis tumoral, se sacrifican y, a través de una pequeña incisión en la cavidad peritoneal, se extrae el tumor con pipeta Pasteur.

El tumor, en forma ascítica, se diluye en PBS, sometiéndolo a una centrifugación a 500 g durante 10 minutos, con objeto de separar el fluido ascítico de las células tumorales. Desechado el sobrenadante, las células tumorales son nuevamente lavadas y centrifugadas en PBS.

Después, se ajustan las células en esta solución tampón a una concentración de  $125 \times 10^6$  cel/ml, y se guardan a -20°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se llevan a un baño de agua a 37°C hasta la descongelación, para recogerlas después en un recipiente enfriado en baño de hielo.

La lisis celular se completa por homogeneización con un homogeneizador "Politron" (3 pases alternos de 1 minuto de duración cada uno).

A continuación, se procede a centrifugación durante 30 minutos a 25000 g, en centrifuga refrigerada a 4°C. Se desecha el

precipitado (correspondiente a los núcleos celulares) y se recoge el sobrenadante (correspondiente al citosol y membranas celulares). Dicho sobrenadante se ultracentrifuga durante 60 minutos a 100000 g. Tras esto, por un lado se separa el sobrenadante, correspondiente al citosol celular suspendido en la solución PBS. Por otro lado, el precipitado, que corresponde a las membranas celulares, se suspende también en la misma cantidad de PBS similar al citosol.

Finalmente, las membranas y el citosol de ambas células tumorales están preparados para someterlos a la extracción lipídica.

## 9.2. EXTRACCION LIPIDICA

Una vez preparadas las muestras de líquido amniótico, suero sanguíneo, y citosol y membranas de los tumores EHRlich y SL2, se sometió a todas al mismo proceso de extracción lipídica.

Al volumen total de cada muestra se le añadió 10 volúmenes de alcohol etílico al 80%. Se agitó a continuación durante 1 hora en frío.

Seguidamente, se añadió el mismo volumen de cloroformo que el correspondiente a la suma de los dos anteriores (alcohol etílico + muestra) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.

Posteriormente, se centrifugó a 500 g durante 20 minutos y, con pipeta Pasteur, se recogió la fase orgánica. Esta fase fue secada totalmente en baño de agua a 45°C mediante chorro de nitrógeno gaseoso.

Una parte del residuo sólido obtenido se disolvió en medio de cultivo, por sonicación, para comprobar su actividad sobre la proliferación celular, y el resto en cloroformo, para la realización de la cromatografía en capa fina.

A la fracción obtenida en cada una de las extracciones, tras secar con nitrógeno gaseoso, se le llamó de la siguiente forma:

- AFLE I: Extracto lipídico de líquido amniótico, obtenido a partir de las primeras 40 muestras.
- AFLE II: Extracto lipídico de líquido amniótico, obtenido a partir de las segundas 50 muestras.

- HSLE: Extracto lipídico de suero humano.
- ECLE: Extracto lipídico de citosol del tumor EHRLICH.
- EMLE: Extracto lipídico de membranas del tumor EHRLICH.
- SL2CLE: Extracto lipídico de citosol del tumor SL2.
- SL2MLE: Extracto lipídico de membranas del tumor SL2.

### 9.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO LIPIDICO: METODO GRAVIMETRICO

La fase orgánica de cada una de las extracciones, como dijimos en el apartado anterior, fue secada a 45°C con chorro de nitrógeno gaseoso.

Antes de llegar a su secado total, se llevó a un tubo de cristal pequeño, previamente pesado en una balanza de precisión. Se terminó entonces el secado y se volvió a pesar el tubo. La diferencia de pesada corresponderá, por tanto, a la cantidad de extracto lipídico obtenido.

Disolviendo este extracto en un volumen conocido, de medio de cultivo o de cloroformo, obtenemos la concentración (en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) deseada.

## 10. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Con objeto de separar los distintos componentes de los extractos lipídicos se empleó la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice.

Se realizó una cromatografía para cada extracto y se utilizó como sistema de disolvente cloroformo:metanol:agua (60:38:8).

La placa cromatográfica (20x20 cm) se adquiere ya preparada (material instrumental). Se activa calentándola a 110°C durante 30 minutos, para después llevarla a una cubeta cromatográfica en la que se coloca un papel de filtro empapado de disolvente, cubriendo las paredes interiores de la misma. El fondo de la cubeta se llena de disolvente hasta una altura de 0,5 a 1 cm. Cuando la placa se impregna totalmente de disolvente, se retira, secándola a 37°C durante 15 a 30 minutos.



Posteriormente, y a 1,5 cm del borde por el que se va a comenzar la cromatografía, se aplican las diversas muestras (extractos y estándares de lípidos) con pipetas "Hamilton". Como estándares se utilizan soluciones en etanol o cloroformo de Prostaglandinas (PG E<sub>2</sub> y PG F<sub>2α</sub>), Gangliósidos (Gs), Fosfatidil-inositol (FI), Fosfatidil-colina (FC), Fosfatidil-etanolamina (FE), Esfingomielina (E) y Ácidos Grasos (AG).

Después de aplicar las muestras y que éstas se hayan secado, se introduce de nuevo la placa en la cubeta, preparada según indicamos anteriormente. Se tapa y se espera a que la placa se desarrolle, sin dejar que el disolvente alcance el tope superior de dicha placa. Después se seca en posición horizontal a 37°C y, para evaporar los restos de disolvente, se le aplica una corriente rápida de nitrógeno gaseoso. A continuación, se revela la placa con vapores de yodo.

A cada una de las manchas obtenidas en el revelado, y según la longitud recorrida por la muestra en la placa, se le dió un valor de Rf100, el cual viene dado por el siguiente cociente:

$$Rf100 = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}} \times 100$$

Paralelamente a esta cromatografía preparativa, se hizo otra con el fin de analizar cada extracto lipídico, siguiendo el mismo procedimiento anterior.

El trayecto recorrido por cada extracto lipídico se dividió en zonas paralelas de 1 cm de altura. En total, obtuvimos 20 cm, ya que la zona situada por debajo de la línea donde se colocaron las muestras de extractos y de estándares se tomó como control negativo. Cada uno de los 20 cm fue raspado, pasado a un tubo de cristal y sometido a una nueva técnica de extracción lipídica, de la siguiente forma.

Se añade a cada uno de los tubos de cristal 6 ml de cloroformo:metanol (1:1) y se incuba durante 30 minutos agitando. A continuación, se añade 2,7 ml de agua bidestilada por tubo, y se incuba otros 30 minutos agitando.

Después, se centrifugan los 20 tubos durante 15 minutos a 500 g, se elimina la fase acuosa y se pasa la clorofórmica a otros 20 tubos.

A cada uno de estos nuevos tubos se le añade 3 ml de metanol y se incuba durante 15 minutos agitando. A continuación, se añade 2,7 ml de agua bidestilada por tubo, y se incuba otros 15 minutos agitando.

Después, se centrifugan los 20 tubos durante 15 minutos a 500 g, se elimina la fase acuosa, y la fase clorofórmica se seca con chorro de nitrógeno gaseoso en baño de agua a 45°C.

El resto sólido obtenido en cada tubo se disuelve en medio de cultivo, por sonicación, para determinar su actividad sobre la proliferación celular.

## 11. RADIOANÁLISIS

Las distintas suspensiones celulares utilizadas para radioanálisis fueron ajustadas a la concentración correspondiente (apartados 7.3 y 8.1 de Métodos) en medio de cultivo DMEM con suero fetal de ternera.

En los radioanálisis de proliferación de los fibroblastos 3T3, se distribuyeron las células, a la concentración correspondiente, con pipeta Hamilton, en cada pocillo de la placa de microcultivo, siendo el volumen final de 200  $\mu$ l/pocillo. Se hicieron triplicados para cada concentración celular.

Los microcultivos se llevaron a un incubador a 37°C con atmósfera humidificada durante 24, 48 ó 72 horas, tras las cuales, las células son recogidas en papel Whatman mediante un recolector semiautomático de células. 24 horas antes de recoger los microcultivos se añade 1  $\mu$ l (1  $\mu$ Ci) de  $^3$ H-Timidina por pocillo.

En los radioanálisis de inhibición de la proliferación celular, con pipeta Hamilton, se distribuyeron el líquido amniótico crudo o los distintos extractos lipídicos (AFLE I y II, ECLE, ENLE, SL2CLE, SL2MLE y HSLE) en cada pocillo de la placa de microcultivo, según se quisiera probar la actividad del líquido amniótico crudo o

bien la de los distintos extractos lipídicos. Como control se dispensa el mismo volumen de la solución PBS (en el caso del líquido amniótico crudo) o de medio de cultivo (en el caso de los extractos lipídicos).

Se hicieron triplicados para cada muestra de líquido amniótico o concentración de extractos lipídicos, así como para los controles.

A continuación, se añadieron en cada pocillo las suspensiones celulares, a las concentraciones correspondientes, siendo el volumen final de 200  $\mu$ l/pocillo. Se termina el proceso con la adición de 1  $\mu$ l (1  $\mu$ Ci) de  $^3$ H-Timidina.

En el caso de los linfocitos humanos, la  $^3$ H-Timidina se añadió a las 48 horas de haberlos incubado y estimulado con 10  $\mu$ l/pocillo de PHA (25  $\mu$ g/ml).

Los cultivos se llevaron a un incubador a 37°C con atmósfera húmeda durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, son recogidas en papel Whatman mediante un recolector semiautomático de células.

En el caso de células que crecen en monocapa (CE'NG, HELA, fibroblastos 3T3), antes de ser recolectadas, requieren un tratamiento previo para despegarlas. Para ello, mediante una pipeta Pasteur, se le retira el sobrenadante, se añaden 200  $\mu$ l de PBS para lavar, y se retiran. A continuación, se añaden 200  $\mu$ l por pocillo de Tripsina-EDTA. Se lleva la placa a una estufa de 37°C durante 10 minutos, siendo recogidas posteriormente como el resto de las células.

Tras el secado del filtro Whatman, se extraen los círculos que quedan marcados en él, y se disponen en tubos de plástico especiales para contaje. Finalmente, añadimos 3,5 ml de líquido de centelleo, y su radioactividad es medida en un contador de radiaciones  $\beta$ .

Dicha radioactividad queda expresada en DPM (desintegraciones por minuto), y como todas las muestras se hicieron por triplicado, se calcularon los valores de la media ( $\bar{X}$ ) y de la desviación estándar (SD) para cada triplete.

## 12. EXPRESION DE LOS RESULTADOS DE PROLIFERACION CELULAR DE LOS FIBROBLASTOS NIH 3T3

La proliferación de los fibroblastos NIH 3T3 la hemos expresado de tres formas diferentes:

- a) Valores de proliferación absoluta: incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina (DPM), para una determinada concentración celular y para un determinado tiempo de cultivo. Como cada concentración celular se repitió por triplicado, se calcularon la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (SD) para cada triplete.

- b) Valores de proliferación relativa: incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina por cada 1000 células iniciales en cultivo (DPM/1000 células), igualmente para una determinada concentración celular y para un determinado tiempo de cultivo. Asimismo, se calcularon, para cada triplete de pocillos, la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (SD).

- c) Valores de la pendiente de la recta que une los puntos correspondientes a las DPM obtenidas a 24 y 48 horas, y a 48 y 72 horas de cultivo, para cada concentración celular. Para calcular el valor de la pendiente hemos utilizado un programa de regresión lineal integrado en el ordenador de un espectrofotómetro (photon TM immunoassay analyzer).

## 13. EXPRESION DE LOS RESULTADOS DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR

La actividad sobre la proliferación celular, tanto del líquido amniótico crudo como de los distintos extractos lipídicos utilizados (AFLE I y II, ECLE, EMLE, SL2CLE, SL2MLE y HSLE), se ha expresado por el % de inhibición producida por los mismos sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina en las células estudiadas.

$$\% \text{ Inhibición (I)}: 100 \times \left(1 - \frac{x_1}{x_0}\right)$$

$x_0$ : Media de DPM de los pocillos usados como control.

$x_1$ : Media de DPM de los pocillos usados como problema, que contienen líquido amniótico o extracto lipídico.

Así mismo, se calculó la desviación estándar (SD) de la inhibición para cada triplete de pocillos respecto al control.

Por otra parte, la actividad de los distintos extractos lipídicos se expresó también por otros dos parámetros:  $I_{50}$  y  $C_{50}$ .

La  $I_{50}$  es la concentración de extracto ( $\mu\text{g/ml}$ ) que produce un 50% de inhibición de la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina, para cada tipo de células.

Este parámetro se obtuvo a partir de un programa de interpolación poligonal, integrado en el ordenador de un espectrofotómetro (photon TM immunoassay analyzer).

En los casos en los que el valor de  $I_{50}$  queda a la derecha o a la izquierda del último punto de la curva de inhibición de la proliferación celular, dicho valor no se puede calcular por el programa de interpolación poligonal. En estos casos, lo hemos calculado a partir de un programa de regresión lineal, integrado en el ordenador del espectrofotómetro (photon TM immunoassay analyzer).

A partir del parámetro anterior, se definió la  $C_{50}$ , que es el número de células, para las que 1  $\mu\text{g}$  de extracto produce un 50% de inhibición de la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina, igualmente para cada tipo de células:

$$C_{50}: \frac{\text{Número de células en cultivo (cel/ml)}}{I_{50} (\mu\text{g/ml})}$$

Al igual que ocurría con el % de inhibición de la proliferación celular (I), tanto para la  $I_{50}$  como para la  $C_{50}$ , se calculó la media (X) y la desviación estándar (SD), correspondientes a cada tipo de células.

## 14. ENSAYO DE REVERSIBILIDAD

Se han hecho tres tipos de ensayos de reversibilidad, uno para el líquido amniótico crudo con el tumor de ratón P815X2, y otros dos para el extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE), uno de ellos con el tumor P815X2 y el otro con linfocitos humanos.

### 14.1. LIQUIDO AMNIOTICO CRUDO Y P815X2

En un tubo Falcon se pone a cultivar una cantidad medida de células en presencia de un volumen determinado de líquido amniótico.

Paralelamente, en otro tubo Falcon se pone a cultivar igual cantidad de células que en el caso anterior, pero el líquido amniótico es sustituido por igual volumen de medio de cultivo, de tal forma que el volumen final es el mismo en ambos tubos Falcon. A las 24 horas se recogen las células, se cuentan para ver el incremento en el número de ellas y se observa su viabilidad, para confirmar si el efecto del líquido amniótico es citotóxico o citostático.

Los dos sedimentos celulares se lavan varias veces con PBS, uno para quitar los restos de líquido amniótico y el otro para seguir el paralelismo experimental.

A continuación, se realiza un radioanálisis comparativo entre los dos tipos de células, poniendo en cada pocillo la cantidad necesaria de células y medio de cultivo hasta un volumen final de 200  $\mu$ l. Se utilizaron 5 pocillos para cada tipo de células y, tras obtener las DPM por el contador  $\beta$ , se calculó la media ( $\bar{X}$ ) y desviación estándar (SD) para los 5 pocillos de ambos tipos de células.

Si las DPM de las células cultivadas inicialmente, en presencia de líquido amniótico, son menores que las obtenidas para las células cultivadas en ausencia del mismo, el efecto del líquido amniótico no será reversible. Si las DPM son mayores, o no hay diferencia entre las mismas, el efecto será reversible.

## 14.2. EXTRACTO LIPIDICO DE LIQUIDO AMNIOTICO (AFLE)

El extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) se probó frente a dos tipos de células para comprobar su reversibilidad: P815X2 y linfocitos humanos.

Para este ensayo de reversibilidad se utilizó el extracto lipídico obtenido a partir de las primeras 40 muestras de líquido amniótico, es decir el AFLE I.

### 14.2.1. AFLE Y P815X2

Se siguieron los mismos pasos descritos en el apartado anterior, excepto que se utilizó extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE), a una concentración determinada (aquella que se creía capaz de producir una inhibición de la proliferación celular de aproximadamente un 50%). En el otro tubo Falcon se añadió un volumen de medio de cultivo similar al que se añadió con el extracto lipídico.

Tras lavar las células, para eliminar restos de AFLE, se realizó un análisis de captación de  $^3\text{H}$ -Timidina, similar al del apartado anterior, para comprobar la reversibilidad del efecto inhibidor del AFLE.

### 14.2.2. AFLE Y LINFOCITOS HUMANOS

Se siguieron los mismos pasos que en los dos puntos anteriores, excepto algunos cambios.

La cantidad de células en cultivo fue mayor, ya que la supervivencia de los linfocitos en cultivo es menor que la de las células tumorales. Asimismo, se utilizó fitohemaglutinina (PHA) para estimular los linfocitos, añadiendo una cantidad similar en ambos tubos Falcon. Por último, el tiempo de cultivo (48 horas) fue mayor que para las células tumorales (24 horas).

La reversibilidad se comprobó también por un radioanálisis de captación de  $^3\text{H}$ -Timidina.

R E S U L T A D O S

---

---



## 1. LIQUIDO AMNIOTICO CRUDO

### 1.1. EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION CELULAR PRODUCIDO POR EL LIQUIDO AMNIOTICO CRUDO

En las tablas y gráficas 1 y 2 podemos observar el efecto inhibidor de 15 muestras de líquido amniótico crudo, elegidas al azar, sobre la proliferación de células del mastocitoma de ratón P815X2 (tabla y gráfica 1) y de linfocitos humanos (tabla y gráfica 2).

La proliferación celular se midió por la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina.

Todas las muestras de líquido amniótico produjeron inhibición con ambos tipos de células, siendo esta inhibición en la mayoría de los casos superior a un 80%.

**Tabla 1 y Gráfica 1**

Inhibición producida por diferentes muestras de líquido amniótico crudo sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de las células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 1

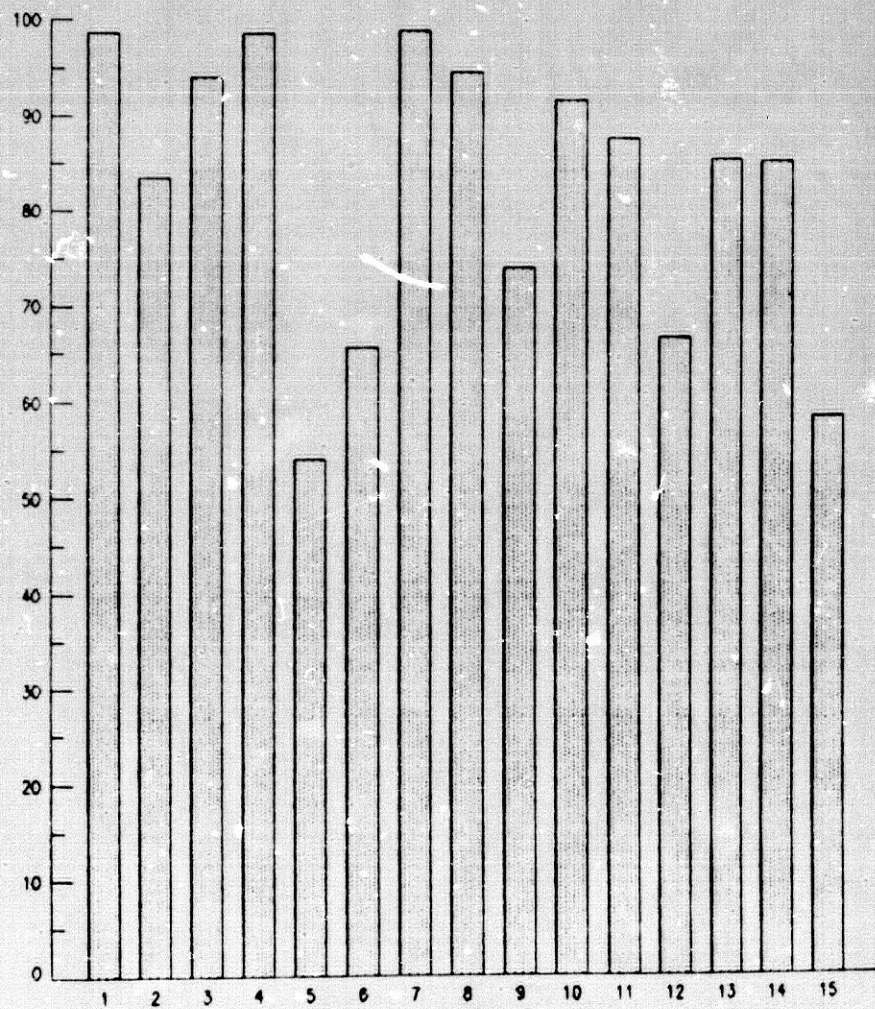
Células: P815X2

LIQUIDO ANTIOTICO (250 µl/ml)	CAPTACION DE <sup>3</sup> H-TIMIDINA (DPM) $\bar{X} \pm SD$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm SD$
1	3325 ± 385	98,7 ± 0,2
2	42541 ± 4502	83,4 ± 1,8
3	15149 ± 3601	94,1 ± 1,4
4	3574 ± 1154	98,6 ± 0,5
5	117515 ± 3506	54,1 ± 1,4
6	87848 ± 10415	65,7 ± 4,1
7	2568 ± 745	99,0 ± 0,3
8	13447 ± 2041	94,7 ± 0,8
9	66166 ± 2406	74,1 ± 0,9
10	21335 ± 3528	91,5 ± 1,4
11	31080 ± 7189	87,8 ± 2,8
12	84612 ± 8180	66,9 ± 3,2
13	36509 ± 8977	85,7 ± 3,5
14	37216 ± 5316	85,5 ± 2,1
15	105305 ± 4912	58,8 ± 1,9
CONTROL (PBS)	255833 ± 33033	

# GRAFICA 1

CELULAS: P815X2

INHIBICION (%)



LIQUIDO AMNIOTICO (250 mcl/mi)

**Tabla 2 y Gráfica 2**

Inhibición producida por diferentes muestras de líquido amniótico crudo sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de linfocitos humanos.

TABLA 2

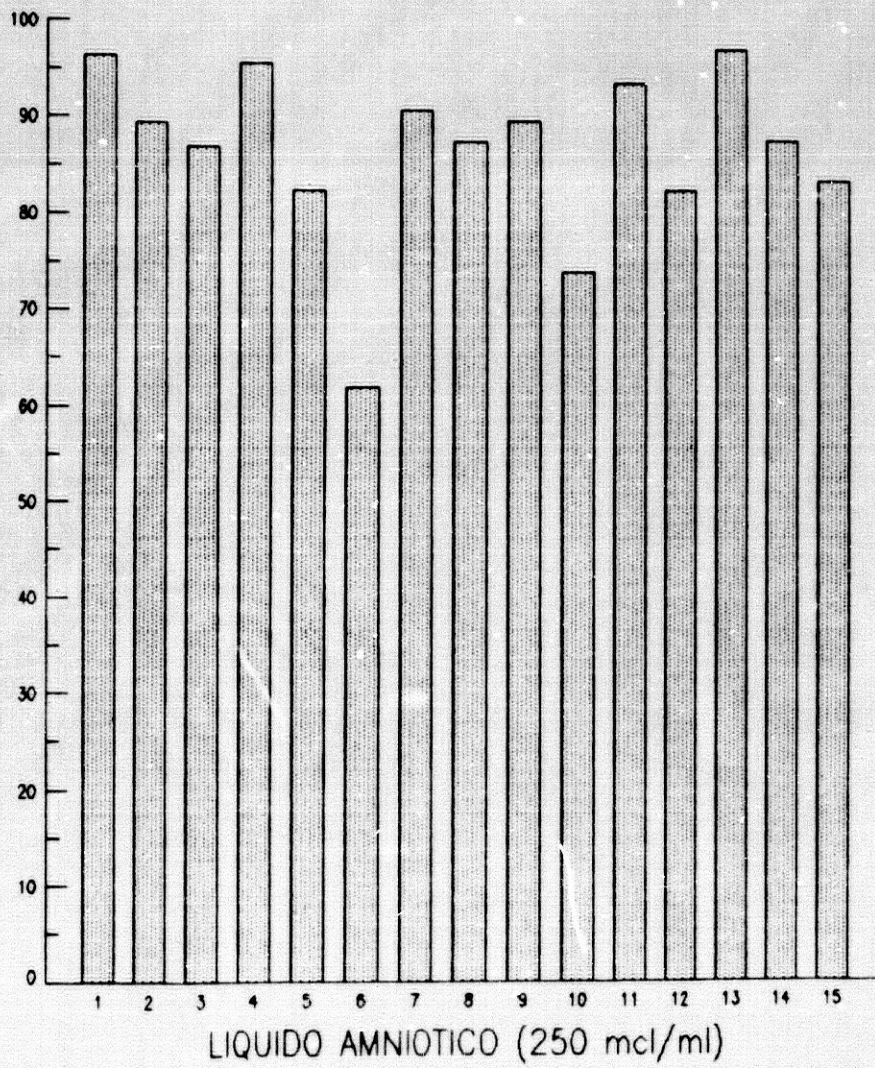
Células: Linfocitos humanos

LIQUIDO AMNIOTICO (250 $\mu$ l/ml)	CAPTACION DE $^3$ H-TIMIDINA (DPM)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
1	1375 $\pm$ 201	96,2 $\pm$ 0,6
2	3874 $\pm$ 572	89,3 $\pm$ 1,6
3	4791 $\pm$ 757	86,8 $\pm$ 2,1
4	1610 $\pm$ 458	95,6 $\pm$ 1,3
5	6401 $\pm$ 1462	82,3 $\pm$ 4,0
6	13852 $\pm$ 1163	61,8 $\pm$ 3,2
7	3359 $\pm$ 614	90,7 $\pm$ 1,7
8	4569 $\pm$ 782	87,4 $\pm$ 2,2
9	3759 $\pm$ 458	89,6 $\pm$ 1,3
10	9457 $\pm$ 435	73,9 $\pm$ 1,2
11	2310 $\pm$ 90	93,6 $\pm$ 0,2
12	6364 $\pm$ 970	82,4 $\pm$ 2,7
13	1040 $\pm$ 213	97,1 $\pm$ 0,6
14	4491 $\pm$ 549	87,6 $\pm$ 1,5
15	5998 $\pm$ 713	83,4 $\pm$ 2,0
CONTROL (PBS)	36215 $\pm$ 9385	

## GRAFICA 2

CELULAS: LINFOCITOS HUMANOS

INHIBICION (%)



## 1.2. REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBIDOR DEL LIQUIDO AMNIOTICO CRUDO

En la tabla 3 y gráficas 3 A y 3 B, podemos observar la reversibilidad de este efecto inhibitor sobre la proliferación de células del mastocitoma de ratón P815X2.

Tras 24 horas de cultivo, las células control experimentan un crecimiento superior al doble del número inicial, mientras que las cultivadas con líquido amniótico prácticamente no experimentan crecimiento alguno, debido al efecto inhibitor del mismo, que es superior a un 50%.

La mortalidad celular, tras esas 24 horas de cultivo, es muy similar en el grupo problema y en el grupo control, no existiendo, por tanto, citotoxicidad en el efecto del líquido amniótico.

Tras lavar intensamente las células problema, para eliminar restos de líquido amniótico, y las células control, para seguir un paralelismo experimental, se determina en un radioanálisis la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina (indicativa de la síntesis de DNA y, por tanto, de la proliferación celular) por ambos tipos de células. En dicho radioanálisis, se comprueba que la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina es aproximadamente la misma para ambos tipos celulares.

Si permaneciese el efecto inhibitor de la proliferación celular por parte del líquido amniótico, las células del grupo problema captarían menos  $^3\text{H}$ -Timidina que las del grupo control. Al no ser así, podemos afirmar que este efecto inhibitor es reversible.



### Tabla 3 y Gráficas 3 A y 3 B

Estudio de la reversibilidad del efecto inhibitor del líquido amniótico crudo sobre la proliferación de células del mastocitoma de ratón P815X2.

#### Tabla 3

En esta tabla se expresan el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 24 horas de cultivo, tanto para las células cultivadas con líquido amniótico como para las cultivadas en ausencia del mismo. Igualmente, se expresa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas, por parte de ambos tipos celulares, tras lavar las células problema para eliminar los restos de líquido amniótico.

#### Gráfica 3 A

En esta gráfica quedan reflejados el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 24 horas de cultivo, tanto para las células cultivadas con líquido amniótico como para las cultivadas en ausencia del mismo.

#### Gráfica 3 B

En esta gráfica se representa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas por parte de células cultivadas en ausencia de líquido amniótico y por parte de células cultivadas en presencia de líquido amniótico, tras eliminar éste por lavado.

TABLA 3

Células: P815X2

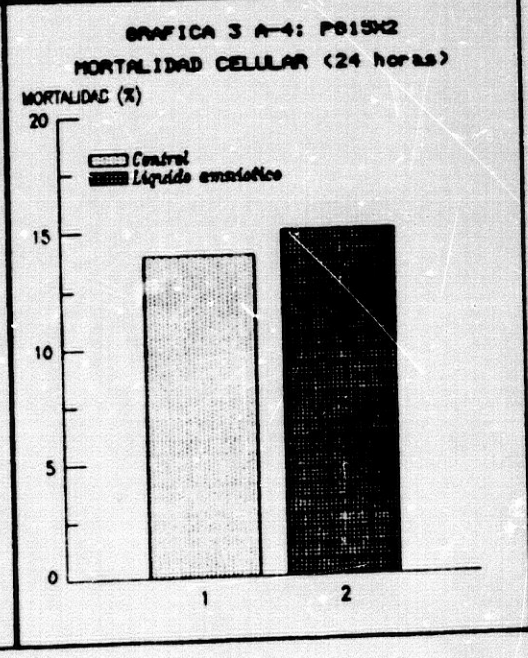
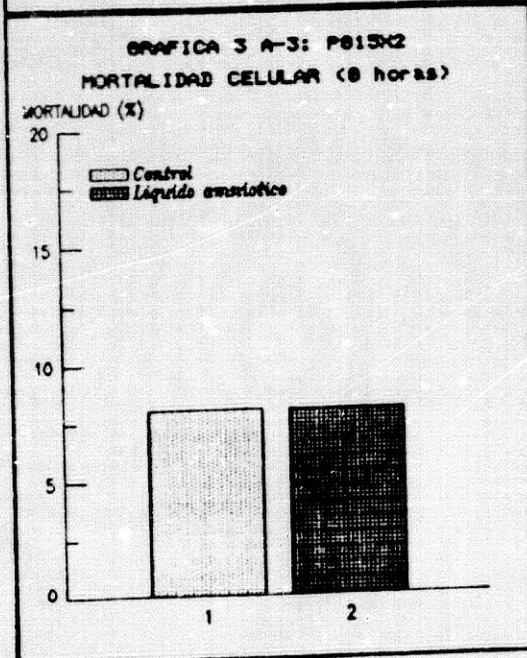
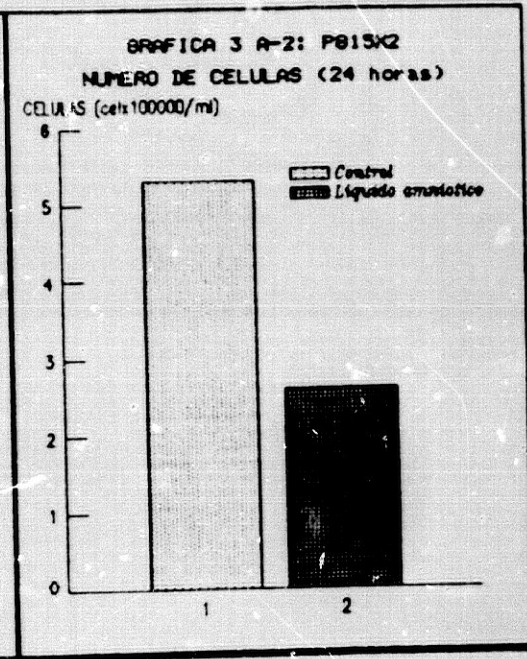
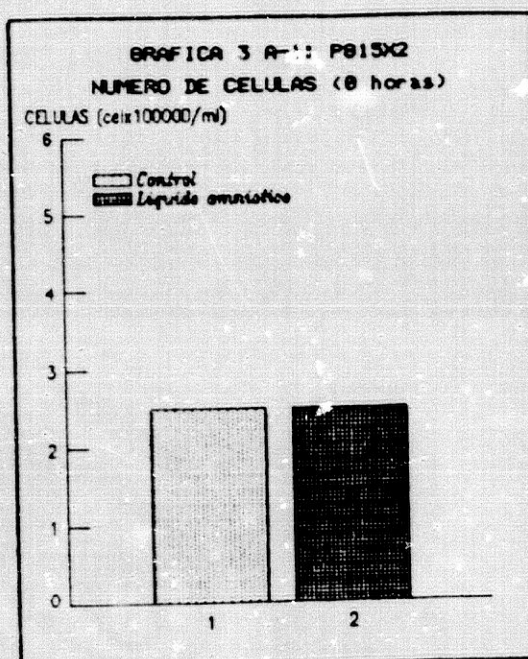
	<u>0 HORAS</u>	
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (PBS)	250000	8
LIQUIDO AMNIOTICO (125 µl/ml)	250000	8

	<u>24 HORAS</u>	
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (PBS)	530000	14
LIQUIDO AMNIOTICO (125 µl/ml)	260000	15

=====

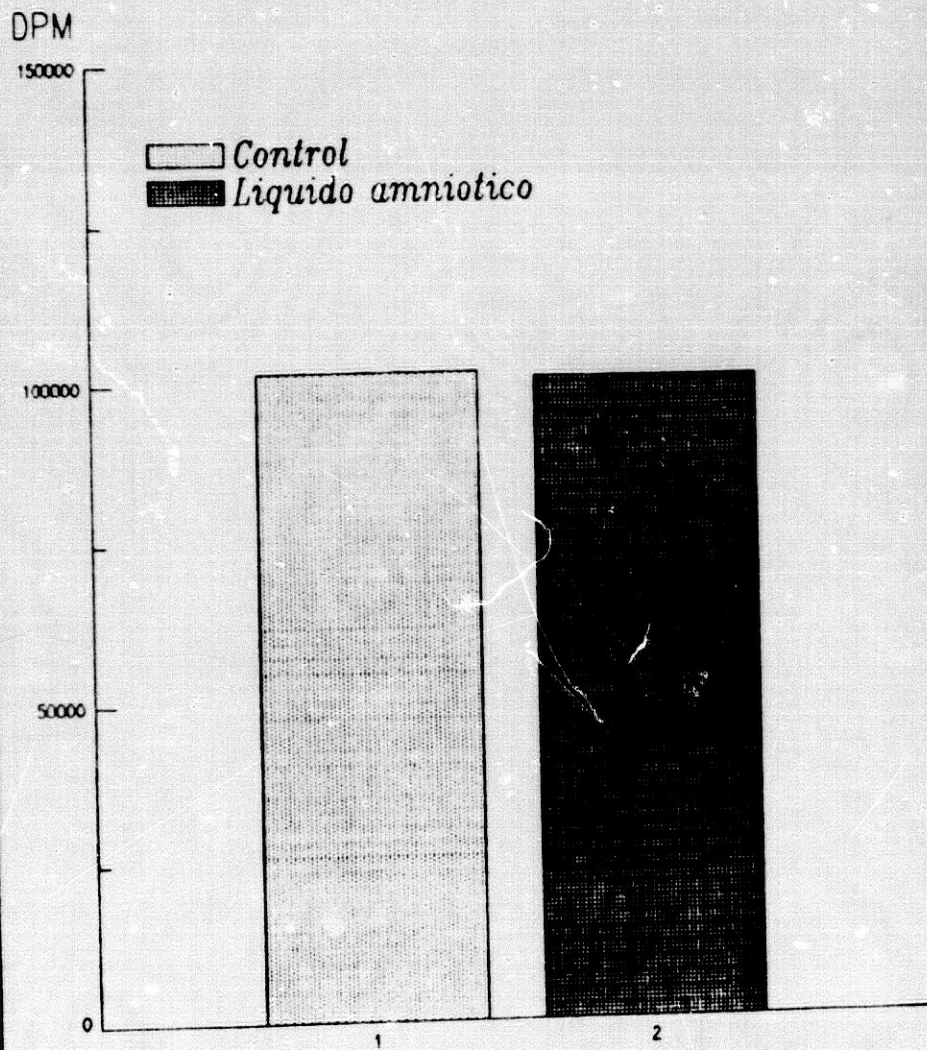
CAPTACION DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA TRAS  
24 HORAS DE CULTIVO (DPM)

	<u><math>\bar{X} \pm SD</math></u>
CONTROL (PBS)	101703 ± 6426
LIQUIDO AMNIOTICO (125 µl/ml)	100952 ± 4163



### GRAFICA 3 B: P815X2

CAPTACION DE 3H-TIMIDINA (24 horas)



## 2. EXTRACTO LIPIDICO DE LIQUIDO AMNIOTICO (AFLE)

### 2.1. EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION CELULAR PRODUCIDO POR EL EXTRACTO LIPIDICO DE LIQUIDO AMNIOTICO (AFLE)

Para la obtención de estos resultados se ha utilizado el extracto lipídico obtenido a partir de las primeras 40 muestras de líquido amniótico, es decir, el AFLE I.

Asimismo, en todos los radioanálisis realizados se utilizó medio de cultivo con una concentración de suero fetal de ternera de un 10%.

En la tabla y gráfica 4 se expresan los valores de  $I_{50}$  y de  $C_{50}$  correspondientes al efecto inhibidor del AFLE sobre la proliferación de distintos tipos de células (de ratón y humanas, normales y tumorales).

En esta gráfica, resalta el hecho de que la  $C_{50}$  es mucho mayor para las células normales que para las tumorales, es decir, que una misma cantidad de AFLE inhibe a mayor número de células normales que de células tumorales. Este efecto se ve claramente si comparamos la  $C_{50}$  de las células de médula ósea y de los linfocitos humanos con la correspondiente al resto de células.

En el caso de los linfocitos humanos, es importante tener en cuenta que permanecen en contacto con el AFLE durante un tiempo superior que el resto de células (72 horas respecto a 24 horas), por lo que es lógico esperar un efecto inhibidor mayor sobre las mismas.

Por ello, decidimos comprobar el efecto del AFLE sobre una célula tumoral (el mastocitoma P815X2) durante dos tiempos de incubación diferentes, 24 y 72 horas (tablas y gráficas 5 y 6).

Si comparamos estas gráficas, podemos observar que el efecto inhibidor del AFLE sobre las células tumorales P815X2 es superior tras 72 horas que tras 24 horas de cultivo.

No obstante, si comparamos los valores de  $C_{50}$ , correspondientes a las dos gráficas anteriores, con el valor de  $C_{50}$  correspondiente a linfocitos humanos cultivados durante 72 horas

(tabla y gráfica 7), podemos observar que, aunque el efecto inhibitor del AFLE sobre las células tumorales P815X2 es mayor tras 72 horas que tras 24 horas de cultivo, dicho efecto inhibitor sigue siendo mucho menor que el efecto del AFLE sobre linfocitos humanos, cultivados también durante 72 horas.

Por tanto, esto parece confirmar que el efecto inhibitor del AFLE sobre células normales (linfocitos humanos y médula ósea de ratón) es superior al efecto sobre células tumorales (P815X2, A1, MCG3, HELA y K-562).

Existe una excepción en el caso de las células CHANG. Estas son células hepáticas humanas, no tumorales, y el efecto inhibitor del AFLE sobre las mismas no es mayor que sobre las células tumorales. Si observamos de nuevo la gráfica 4, podemos comprobar que la  $C_{50}$  correspondiente a las células CHANG es mucho menor que la correspondiente a los linfocitos y a las células de médula ósea, e incluso, es menor que la correspondiente a la mayoría de las células tumorales.

#### Tabla 4

Dosis Iso y Cso del efecto inhibidor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de distintos tipos celulares.

#### Gráfica 4

Dosis Cso del efecto inhibidor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de distintos tipos celulares.

Los números de referencia corresponden a los siguientes tipos celulares:

- 1.- Médula ósea.
- 2.- Linfocitos.
- 3.- Chang.
- 4.- P815X2.
- 5.- A1.
- 6.- MCG3.
- 7.- Hela.
- 8.- K-562.

TABLA 4

AFLE

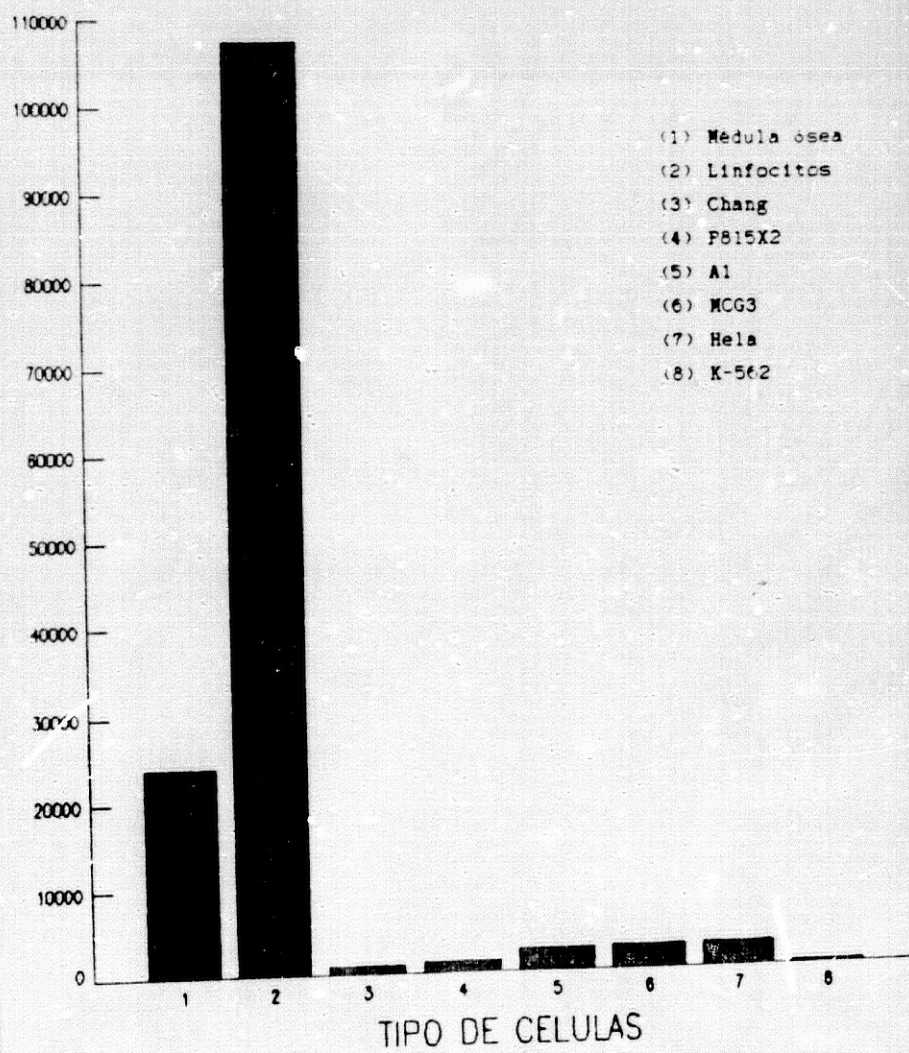
TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$	C <sub>50</sub> (cel/ $\mu\text{g}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$
<i>Células normales de ratón:</i>		
- MEDULA OSEA	85,2 $\pm$ 11,5	23778 $\pm$ 3248
<i>Células normales humanas:</i>		
- LINFOCITOS	11,6 $\pm$ 0,6	107399 $\pm$ 5159
- CHANG	297,4 $\pm$ 5,4	841 $\pm$ 15
<i>Células tumorales de ratón:</i>		
- P815X2	216,9 $\pm$ 7,7	1154 $\pm$ 41
- A1	101,2 $\pm$ 5,8	2476 $\pm$ 144
- MCG3	98,3 $\pm$ 14,7	2581 $\pm$ 387
<i>Células tumorales humanas:</i>		
- HELA	94,4 $\pm$ 20,6	2737 $\pm$ 609
- K-562	994,2 $\pm$ 163,3	256 $\pm$ 44



# GRAFICA 4

AFLE

C-50 (cel/mcg)



**Tabla 5 y Gráfica 5**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de las células del mastocitoma de ratón P815X2, cultivadas durante 24 horas.

TABLA 5

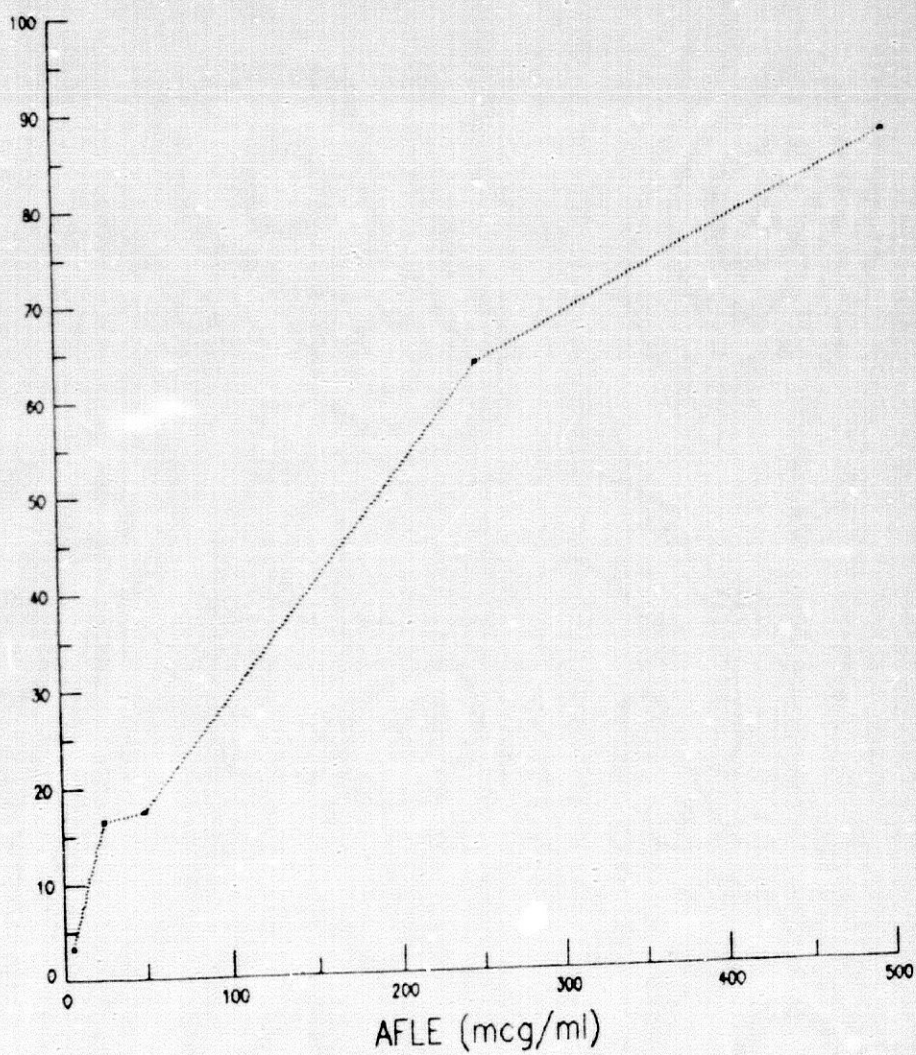
Células: P815X2  
 Tiempo de cultivo: 24 horas

AFLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
5	165333 $\pm$ 12	3,3 $\pm$ 0,0
25	142394 $\pm$ 7838	16,5 $\pm$ 4,6
50	141054 $\pm$ 3822	17,5 $\pm$ 2,2
250	62018 $\pm$ 3728	63,7 $\pm$ 2,2
500	21736 $\pm$ 1018	87,3 $\pm$ 0,6
CONTROL (MEDIO)	171037 $\pm$ 12070	

# GRAFICA 5

CELULAS: P815X2 (24 horas)

INHIBICION (%)



**Tabla 6 y Gráfica 6**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de las células del mastocitoma de ratón P815X2, cultivadas durante 72 horas.

TABLA 6

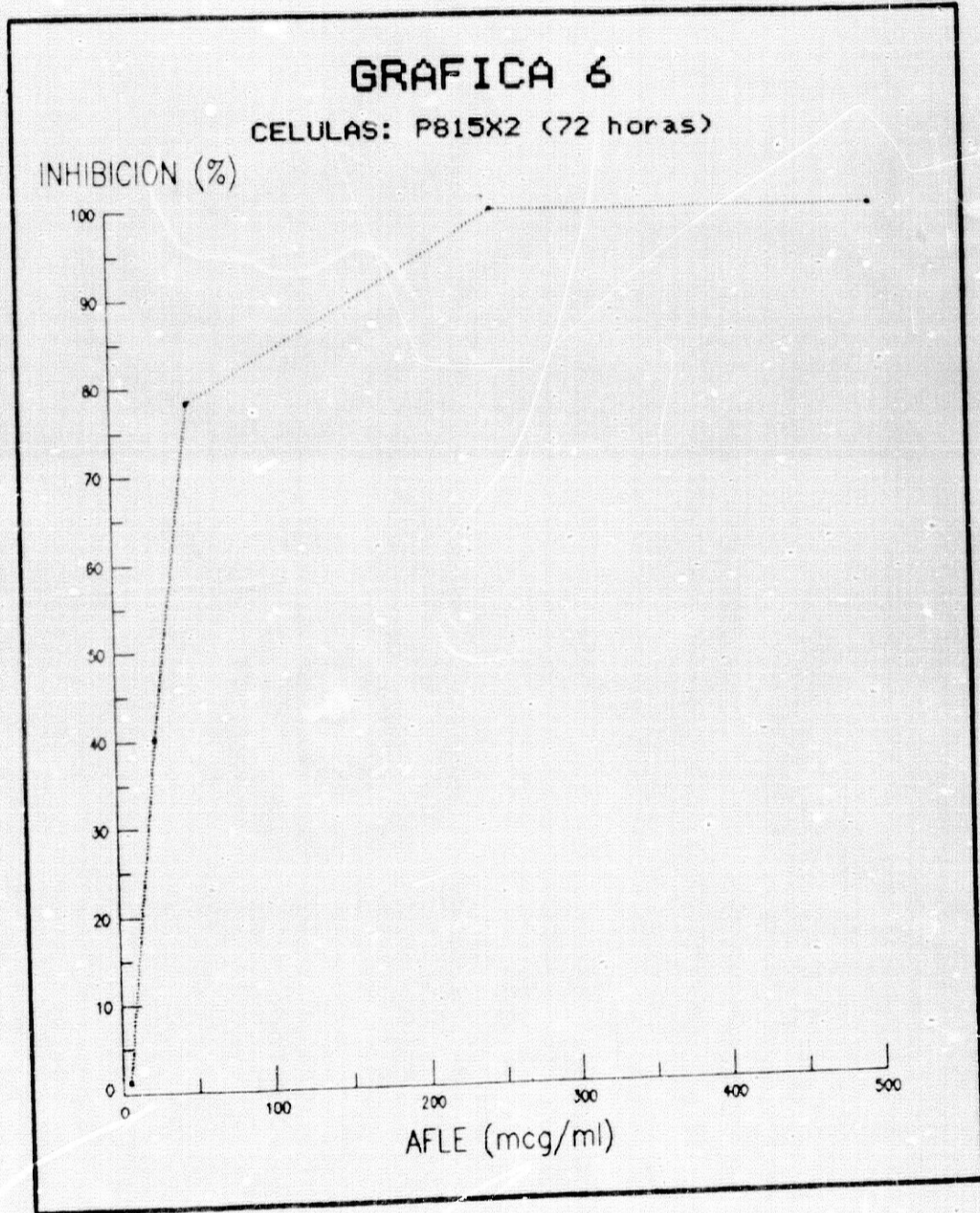
Células: P815X2  
 Tiempo de cultivo: 72 horas

AFLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPM)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
5	143593 $\pm$ 18253	1,2 $\pm$ 12,5
25	86881 $\pm$ 21876	40,2 $\pm$ 15,1
50	31468 $\pm$ 3367	78,3 $\pm$ 2,3
250	290 $\pm$ 91	99,8 $\pm$ 0,1
500	183 $\pm$ 103	99,9 $\pm$ 0,1
CONTROL (MEDIO)	145227 $\pm$ 17425	

# GRAFICA 6

CELULAS: P815X2 (72 horas)

INHIBICION (%)



#### Tabla 7

Dosis  $I_{50}$  y  $C_{50}$  del efecto inhibidor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3H$ -Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2, cultivadas durante 24 horas y durante 72 horas, y por parte de linfocitos humanos, cultivados durante 72 horas.

#### Gráfica 7

Dosis  $C_{50}$  del efecto inhibidor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3H$ -Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2, cultivadas durante 24 horas y durante 72 horas, y por parte de linfocitos humanos, cultivados durante 72 horas.



TABLA 7

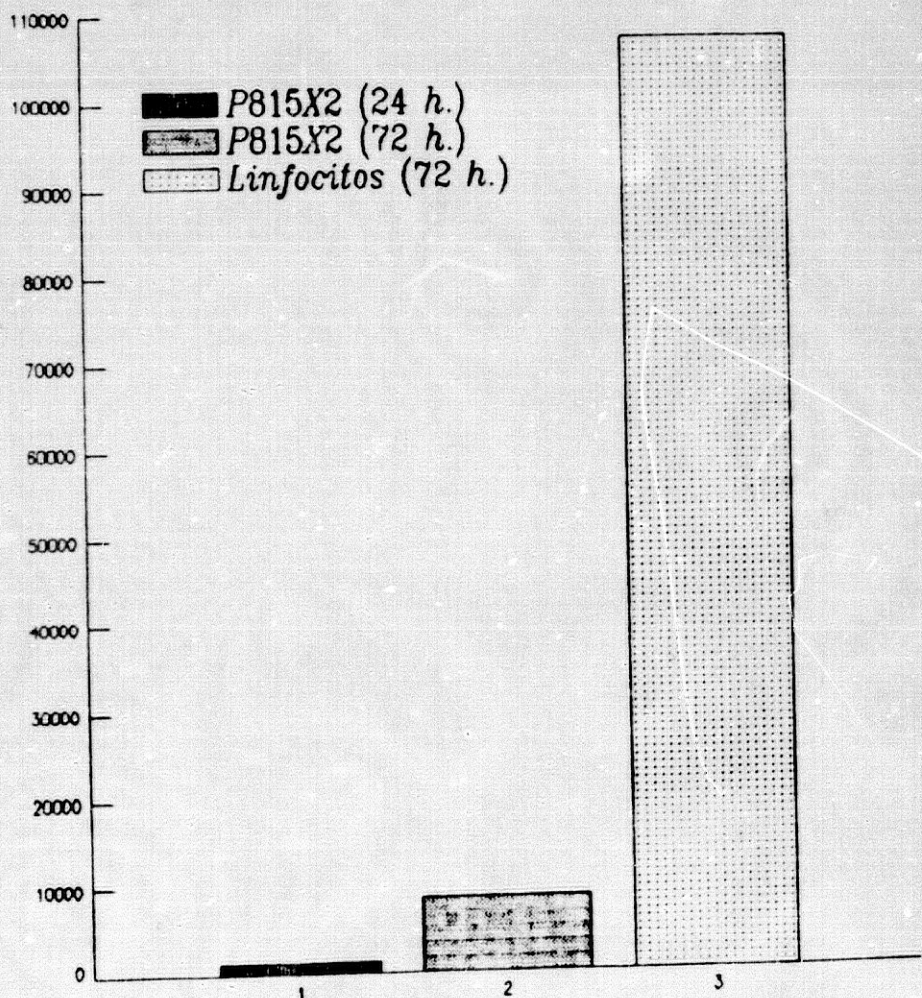
AFLE

TIEMPO DE CULTIVO Y TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> (μg/ml) $\bar{X} \pm SD$	C <sub>50</sub> (cel/μg) $\bar{X} \pm SD$
<i>24 horas de cultivo:</i>		
- P815X2	216,9 ± 7,7	1154 ± 41
<i>72 horas de cultivo:</i>		
- P815X2	30,6 ± 7,2	8491 ± 2040
- LINFOCITOS	11,6 ± 0,6	107399 ± 5159

# GRAFICA 7

AFLE

C-50 (cel/mcg)



TIPO DE CELULAS Y TIEMPO DE CULTIVO

## 2.2. REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBIDOR DEL EXTRACTO LIPIDICO DE LIQUIDO AMNIOTICO (AFLE)

Para esta prueba de reversibilidad, se utilizó también el extracto lipídico obtenido a partir de las primeras 40 muestras de líquido amniótico, es decir, el AFLE I.

En las tablas y gráficas 8 y 9, podemos observar la reversibilidad de este efecto sobre la proliferación de células del mastocitoma de ratón P815X2 y de linfocitos humanos.

En el caso de las células del tumor P815X2 (tabla 8 y gráfica 8 A), se evidencia que tras 24 horas de cultivo, las células del grupo control experimentan un crecimiento cercano al doble del número inicial, mientras que las cultivadas con AFLE crecen muy poco, siendo el efecto inhibidor del AFLE algo inferior al 50%.

La mortalidad celular tras 24 horas de cultivo es muy similar para los dos grupos, lo cual indica que el efecto del AFLE no es citotóxico.

Tras lavar intensamente las células para eliminar restos de AFLE, se hizo un radioanálisis para determinar la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina (indicativa de la proliferación celular) y se comprobó que la captación por las células cultivadas en ausencia del AFLE es menor que la captación por las células cultivadas con el mismo (tabla 8 y gráfica 8 B). Si permaneciese el efecto inhibidor de la proliferación celular por parte del AFLE, las células del grupo problema captarían menos  $^3\text{H}$ -Timidina que las del grupo control, pero al ocurrir lo contrario, podemos afirmar que este efecto inhibidor es reversible.

En el caso de los linfocitos humanos (tabla 9 y gráfica 9 A), éstos sufren una gran mortalidad en las primeras horas de cultivo, para posteriormente experimentar un crecimiento, estimulados por la fitohemaglutinina (PHA). Por ello, tras 48 horas de cultivo, podemos observar que el número de linfocitos es inferior al inicial, pero este número es mucho mayor en los linfocitos del grupo control que en los cultivados con AFLE, debido al efecto inhibidor de éste, que es algo inferior al 50%.

La mortalidad celular es muy similar para los dos grupos de células (control y problema), tras las 48 horas de cultivo, por lo que el efecto del AFLE no es citotóxico.

Tras lavar varias veces las células para eliminar los restos de AFLE, se hizo un radioanálisis para determinar la captación de <sup>3</sup>H-Timidina, comprobando, de nuevo, que la captación era menor para el grupo control que para el grupo problema (tabla 9 y gráfica 9 B), lo cual confirma la reversibilidad del efecto inhibitor del AFLE.

Por otra parte, al observar la actuación del AFLE sobre distintos tipos de células, comprobamos que grandes concentraciones del mismo (de hasta 500 µg/ml), que con otro tipo de células producen una inhibición superior al 90%, en el caso de la eritroleucemia humana K-562 (tabla y gráfica 10) producen una inhibición mucho menor (aproximadamente de un 25%), aunque con cantidades mayores de AFLE se alcancen niveles superiores de inhibición.

Esto habla en favor del efecto citostático del AFLE, ya que estas células (K-562) no se inhiben a concentraciones a las que otras células lo hacen, lo cual supone que la actuación del AFLE no es citotóxica.

### Tabla 8 y Gráficas 8 A y 8 B

Estudio de la reversibilidad del efecto inhibitor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la proliferación de células del mastocitoma de ratón P815X2.

#### Tabla 8

En esta tabla se expresan el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 24 horas de cultivo, tanto para las células cultivadas con AFLE como para las cultivadas en ausencia del mismo. Igualmente, se expresa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas, por parte de ambos tipos celulares, tras lavar las células problema para eliminar los restos de AFLE.

#### Gráfica 8 A

En esta gráfica quedan reflejados el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 24 horas de cultivo, tanto para las células cultivadas con AFLE como para las cultivadas en ausencia del mismo.

#### Gráfica 8 B

En esta gráfica se representa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas por parte de células cultivadas en ausencia de AFLE y por parte de células cultivadas en presencia de AFLE, tras eliminar éste por lavado.

TABLA 8

Células: P815X2

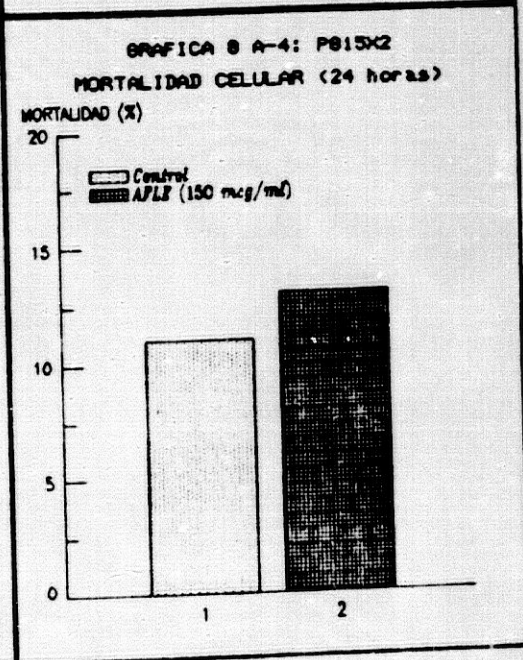
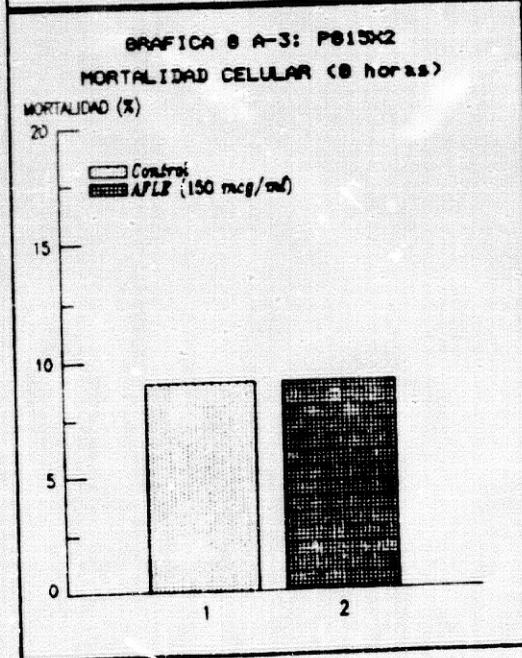
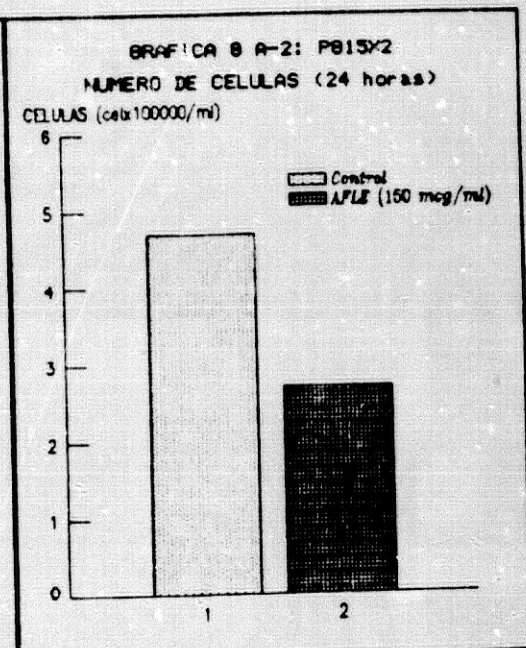
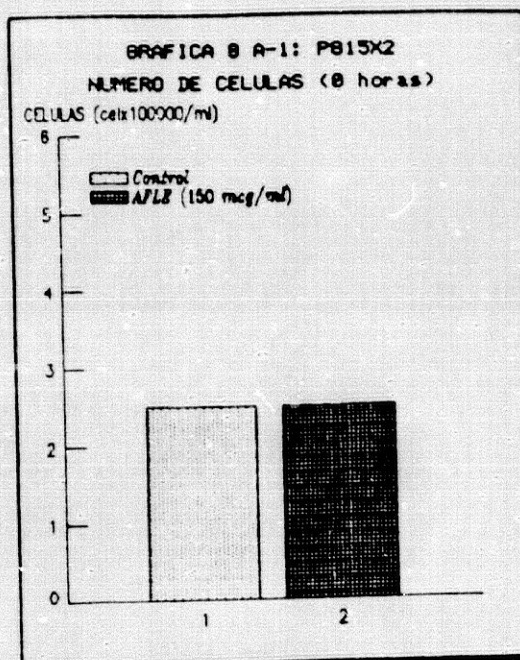
	<u>0 HORAS</u>	
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (MEDIO)	250000	9
AFLE (150 µg/ml)	250000	9

	<u>24 HORAS</u>	
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (MEDIO)	470000	11
AFLE (150 µg/ml)	270000	13

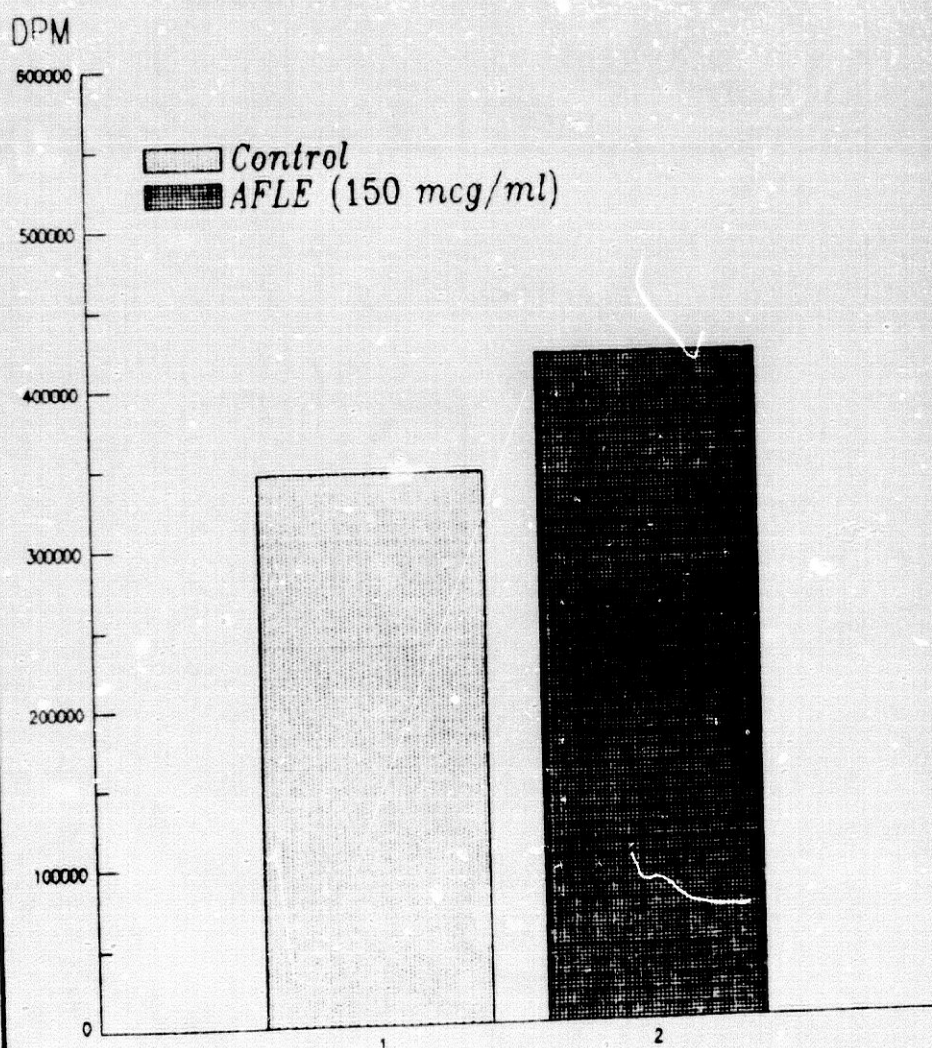
=====

CAPTACION DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA TRAS  
24 HORAS DE CULTIVO (DPM)

	$\bar{x} \pm SD$
CONTROL (MEDIO)	346675 ± 27894
AFLE (150 µg/ml)	420108 ± 32236



**GRAFICA 8 B: P815X2**  
CAPTACION DE 3H-TIMIDINA (24 horas)





## Tabla 9 y Gráficas 9 A y 9 B

Estudio de la reversibilidad del efecto inhibitor del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la proliferación de linfocitos humanos.

### Tabla 9

En esta tabla se expresan el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 48 horas de cultivo, tanto para los linfocitos cultivados con AFLE como para los cultivados en ausencia del mismo. Igualmente, se expresa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas, por parte de ambos tipos celulares, tras lavar las células problema para eliminar los restos de AFLE.

### Gráfica 9 A

En esta gráfica quedan reflejados el número de células y la mortalidad celular a las 0 horas y a las 48 horas de cultivo, tanto para los linfocitos cultivados con AFLE como para los cultivados en ausencia del mismo.

### Gráfica 9 B

En esta gráfica se representa la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 24 horas por parte de linfocitos cultivados en ausencia de AFLE y por parte de linfocitos cultivados en presencia de AFLE, tras eliminar éste por lavado.

TABLA 9

Células: Linfocitos humanos

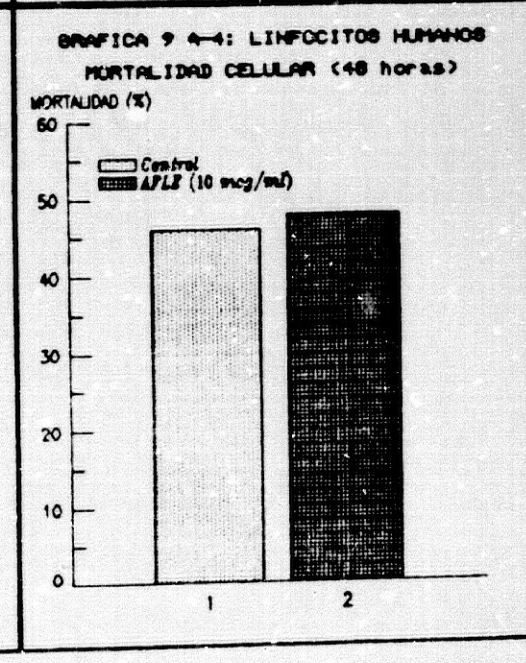
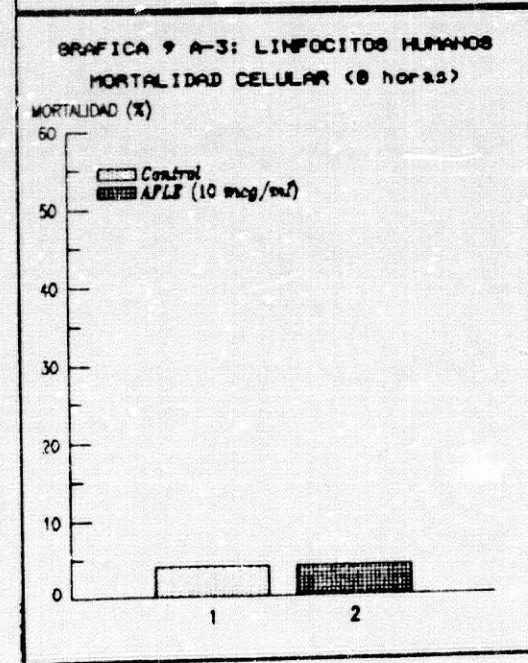
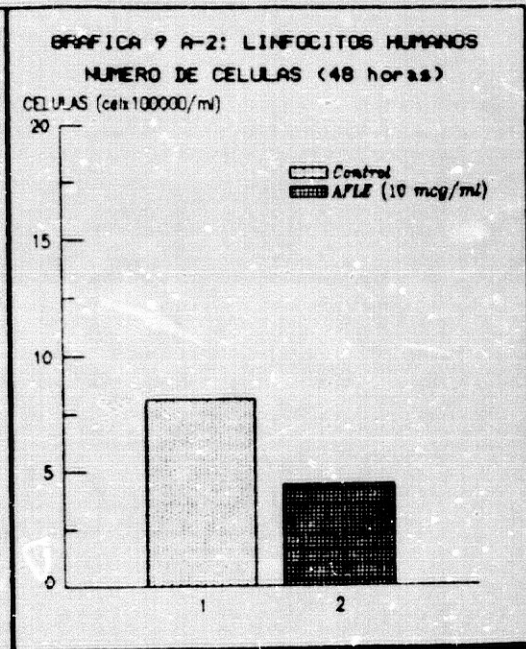
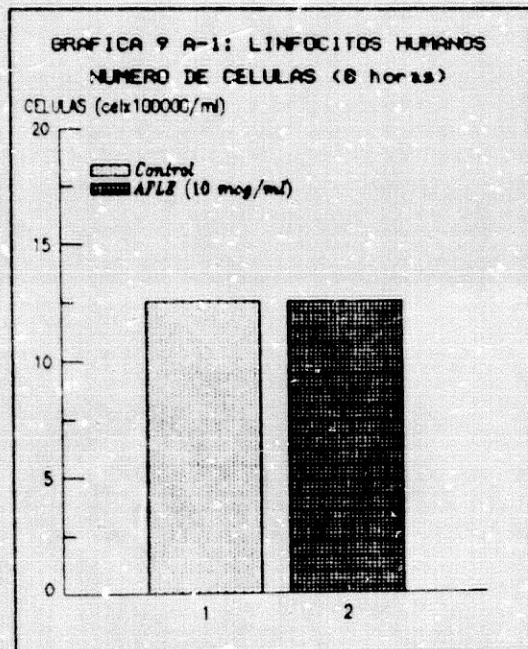
<u>0 HORAS</u>		
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (MEDIO)	1250000	4
AFLE (10 µg/ml)	1250000	4

<u>48 HORAS</u>		
	<u>Nº CELULAS (cel/ml)</u>	<u>MORTALIDAD (%)</u>
CONTROL (MEDIO)	812500	46
AFLE (10 µg/ml)	441600	48

=====

CAPTACION DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA TRAS  
24 HORAS DE CULTIVO (DPM)

	<u><math>\bar{X} \pm SD</math></u>
CONTROL (MEDIO)	44644 ± 4426
AFLE (10 µg/ml)	64531 ± 3713



# GRAFICA 9 B: LINFOCITOS HUMANOS

CAPTACION DE 3H-TIMIDINA (24 horas)

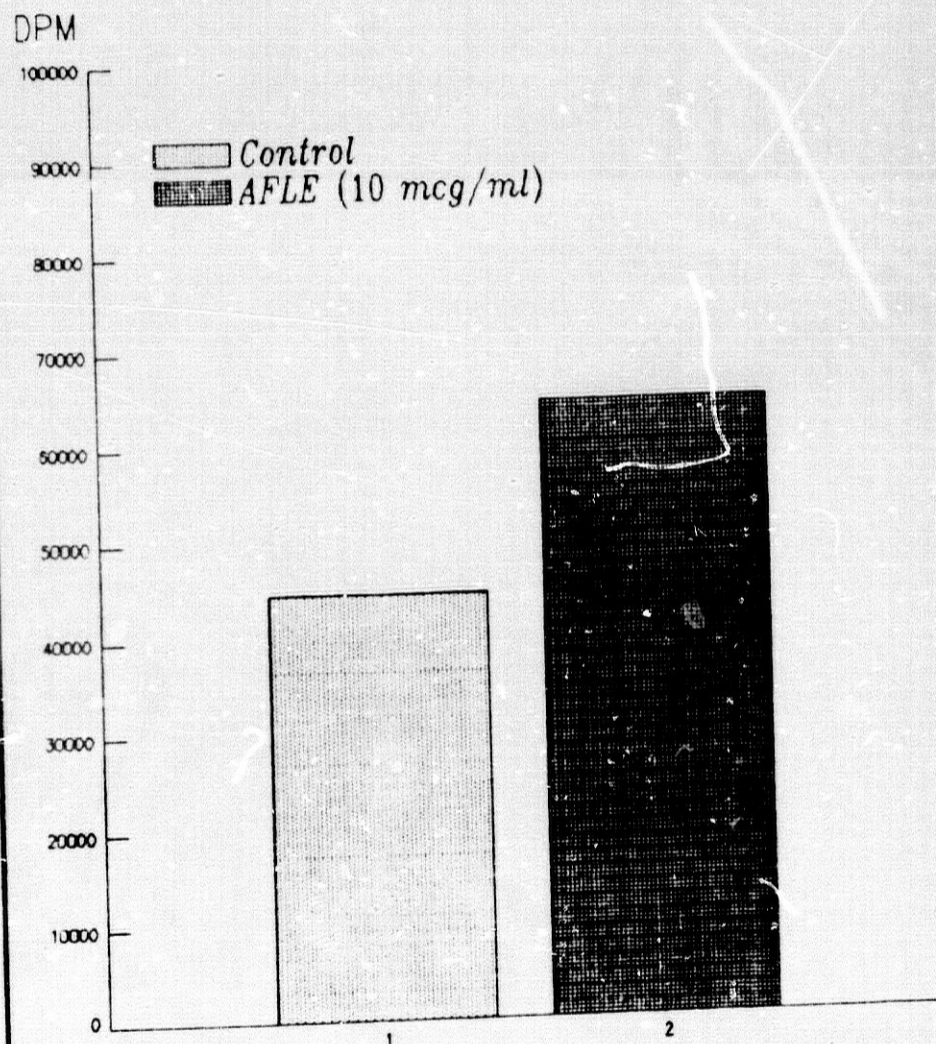


Tabla 10 y Gráfica 10

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de las células de la eritroleucemia humana K-562.

TABLA 10

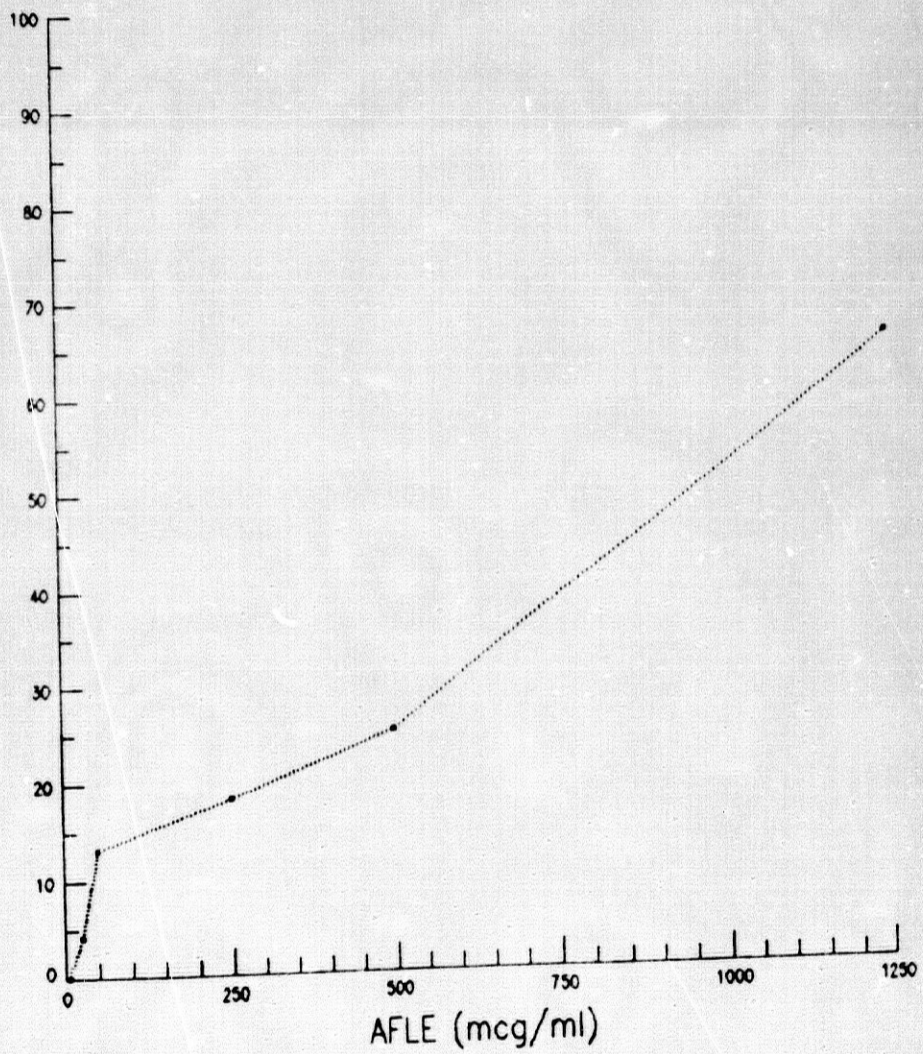
Células: K-562

AFLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPH)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
5	14332 $\pm$ 1026	0,0 $\pm$ 7,5
25	13120 $\pm$ 437	4,1 $\pm$ 3,2
50	11877 $\pm$ 421	13,2 $\pm$ 3,1
250	11172 $\pm$ 1417	18,3 $\pm$ 10,3
500	10245 $\pm$ 1632	25,1 $\pm$ 11,9
1250	4640 $\pm$ 775	66,1 $\pm$ 5,7
CONTROL (MEDIO)	13677 $\pm$ 1511	

# GRAFICA 10

CELULAS: K-362

INHIBICION (%)



### 2.3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO LIPIDICO DE LIQUIDO AMNIOTICO (AFLE)

La cromatografía en capa fina se realizó con el extracto lipídico obtenido a partir de las primeras 40 muestras de líquido amniótico (AFLE I).

Se utilizó un sistema de disolvente polar, cloroformo:metanol:agua (60:38:8).

En los radioanálisis en que se probó la actividad inhibidora de la proliferación celular por parte de las distintas fracciones del AFLE, se utilizó medio de cultivo con una concentración de suero fetal de ternera del 10%.

En la tabla y gráfica 11 quedan reflejados los resultados obtenidos al revelar la cromatografía de separación del extracto lipídico del líquido amniótico (AFLE) y de los distintos estándares utilizados.

Se enumeraron las distintas manchas obtenidas para el AFLE y se calculó su valor de  $R_f100$ , comparándolo con el correspondiente a los distintos estándares.

En las tablas y gráficas 12 y 13, se representa el efecto inhibitor de las diferentes fracciones de extracto lipídico (obtenidas mediante la cromatografía separativa en capa fina) sobre la captación de  $^3H$ -Timidina por parte de las células de médula ósea de ratón (tabla y gráfica 12) y de células tumorales P815X2 (tabla y gráfica 13).

En estas gráficas se observa la aparición de dos picos importantes de actividad inhibidora, con valor de  $R_f100$  entre 45,9 y 62,2 y entre 83,8 y 100, respectivamente, tanto para las células de médula ósea como para las tumorales P815X2.

Igualmente, se expresan las diferentes bandas que aparecen al revelar la cromatografía preparativa conteniendo el extracto lipídico y los distintos estándares.



**Tabla 11 y Gráfica 11**

Valor de  $R_{f100}$  de las distintas manchas observadas en la cromatografía en capa fina, tanto para el extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE), como para los estándares utilizados.

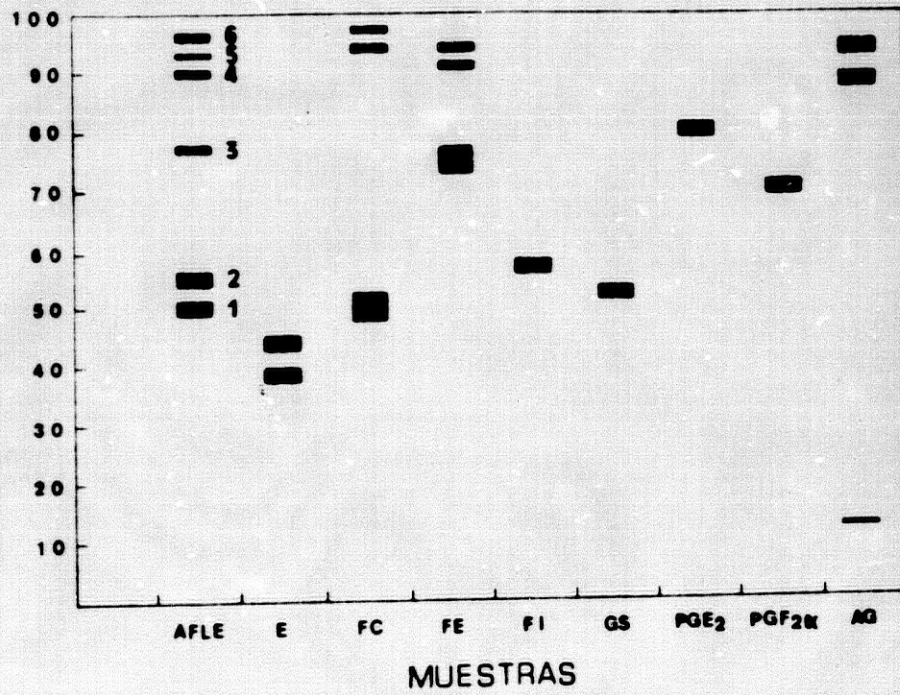
TABLA 11

MUESTRAS	Rf100
<i>AFLE:</i>	
1	(50,5-52,4)
2	(53,2-54,9)
3	(77,0-78,0)
4	(89,7-90,8)
5	(91,3-92,0)
6	(93,5-94,5)
<i>Estándares:</i>	
- ESFINGOMIELINA (E)	(39,5-41,4) (43,2-44,9)
- FOSFATIDIL-COLINA (FC)	(47,3-52,7) (92,5-93,4) (94,1-95,1)
- FOSFATIDIL-ETANOLAMINA (FE)	(73,0-77,5) (91,4-92,4) (92,9-94,0)
- FOSFATIDIL-INOSITOL (FI)	(57,3-59,5)
- GANGLIOSIDOS (GS)	(55,1-56,7)
- PROSTAGLANDINA E <sub>2</sub> (PG E <sub>2</sub> )	(79,5-81,6)
- PROSTAGLANDINA F <sub>2α</sub> (PG F <sub>2α</sub> )	(69,8-71,6)
- ACIDOS GRASOS (AG)	(12,9-13,5) (89,2-90,8) (93,0-94,5)

# GRAFICA 11

CROMATOGRAFIA (AFLE)

Rf 100



### Tabla 12 y Gráfica 12

Efecto inhibitor de las distintas fracciones (con distinto valor de  $R_f$ 100) del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE), separadas por cromatografía en capa fina, sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón.

Se representan también las bandas obtenidas para el extracto lipídico y para los estándares utilizados, al revelar la cromatografía.

TABLA 12

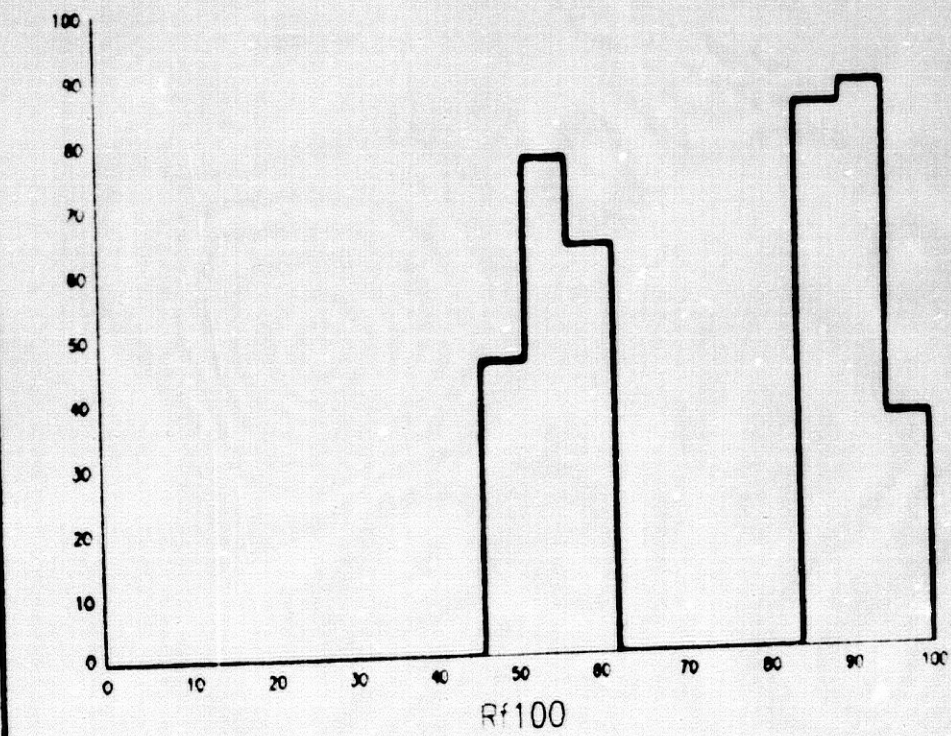
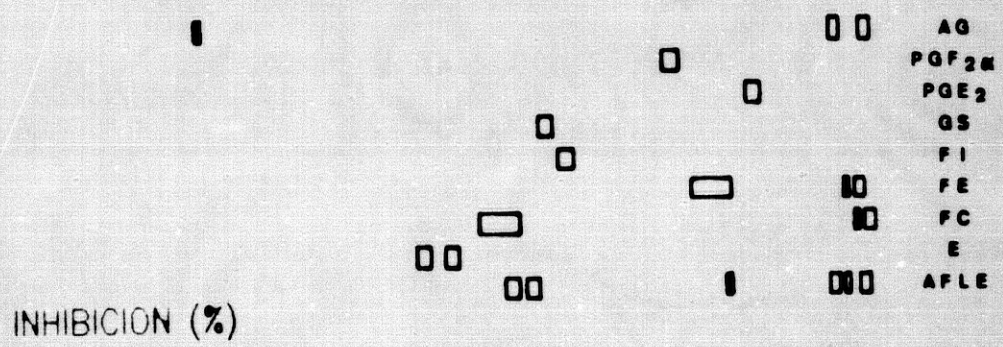
AFLE

Células: Médula ósea de ratón

R:100	CAPTACION DE <sup>3</sup> H-TIMIDINA (DPM)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
( 0,0- 2,7)	79154 ± 7211	0,0 ± 10,1
( 2,7- 8,1)	79144 ± 2666	0,0 ± 3,7
( 8,1- 13,5)	71469 ± 3763	0,0 ± 5,3
(13,5- 18,9)	78994 ± 2517	0,0 ± 3,5
(18,9- 24,3)	73202 ± 6497	0,0 ± 9,1
(24,3- 29,7)	77292 ± 4226	0,0 ± 5,9
(29,7- 35,1)	74312 ± 2413	0,0 ± 3,4
(35,1- 40,5)	75018 ± 7675	0,0 ± 10,8
(40,5- 45,9)	71968 ± 5489	0,0 ± 7,7
(45,9- 51,4)	38776 ± 3493	45,7 ± 4,9
(51,4- 56,8)	16361 ± 407	77,1 ± 0,6
(56,8- 62,2)	25966 ± 6139	63,6 ± 8,6
(62,2- 67,6)	76131 ± 2798	0,0 ± 3,9
(67,6- 73,0)	71442 ± 182	0,0 ± 0,3
(73,0- 78,4)	75638 ± 5651	0,0 ± 7,9
(78,4- 83,8)	75241 ± 3143	0,0 ± 4,4
(83,8- 89,2)	10679 ± 1125	85,0 ± 1,6
(89,2- 94,6)	8327 ± 83	88,3 ± 0,1
(94,6-100,0)	45488 ± 3060	36,3 ± 4,3
CONTROL (MEDIO)	71376 ± 4695	

# GRAFICA 12

AFLE (CELULAS: MEDULA OSEA DE RATON)



**Tabla 13 y Gráfica 13**

Efecto inhibitor de las distintas fracciones (con distinto valor de  $R_f$ ) del extracto lipídico de líquido amniótico (AFLE), separadas por cromatografía en capa fina, sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

Se representan también las bandas obtenidas para el extracto lipídico y para los estándares utilizados, al revelar la cromatografía.

TABLA 13

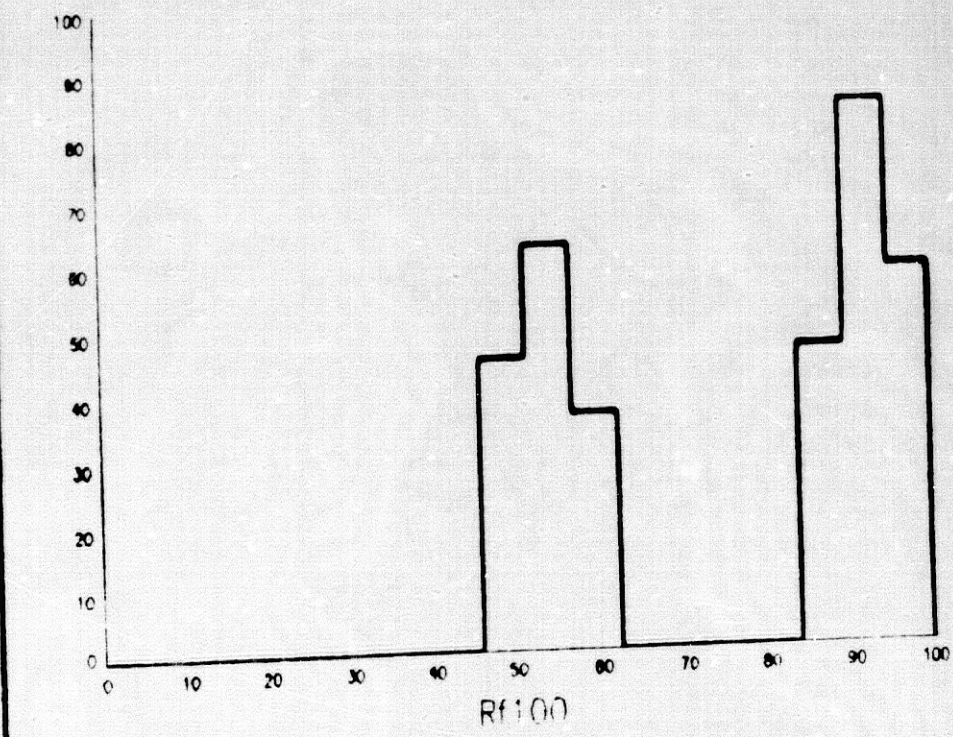
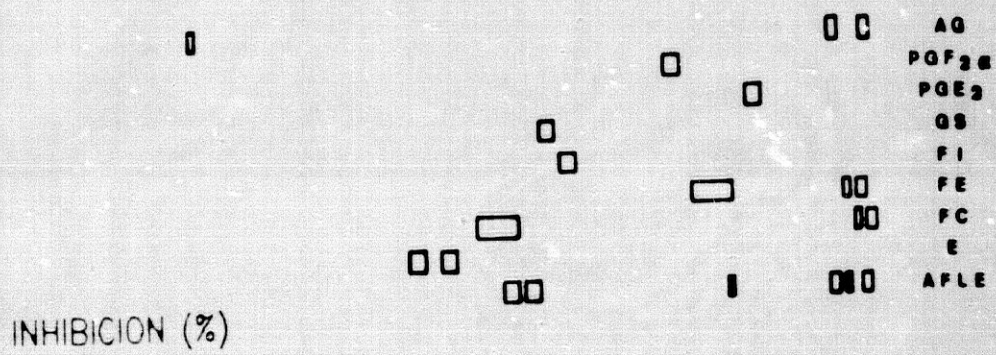
AFLE  
Células: P815X2

Rf100	CAPTACION DE <sup>3</sup> H-TIMIDINA (DPM) $\bar{X} \pm SD$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm SD$
( 0,0- 2,7)	485577 $\pm$ 10995	0,0 $\pm$ 2,4
( 2,7- 8,1)	461292 $\pm$ 9729	0,0 $\pm$ 2,1
( 8,1- 13,5)	482871 $\pm$ 15339	0,0 $\pm$ 3,4
(13,5- 18,9)	493678 $\pm$ 15890	0,0 $\pm$ 3,5
(18,9- 24,3)	495970 $\pm$ 53605	0,0 $\pm$ 11,8
(24,3- 29,7)	517063 $\pm$ 16924	0,0 $\pm$ 3,7
(29,7- 35,1)	461537 $\pm$ 25795	0,0 $\pm$ 5,7
(35,1- 40,5)	485279 $\pm$ 45523	0,0 $\pm$ 10,1
(40,5- 45,9)	524881 $\pm$ 7198	0,0 $\pm$ 1,6
(45,9- 51,4)	246330 $\pm$ 42822	45,6 $\pm$ 9,5
(51,4- 56,8)	167541 $\pm$ 46796	63,0 $\pm$ 10,3
(56,8- 62,2)	285710 $\pm$ 41359	36,9 $\pm$ 9,1
(62,2- 67,6)	523852 $\pm$ 28691	0,0 $\pm$ 6,3
(67,6- 73,0)	509876 $\pm$ 3099	0,0 $\pm$ 0,7
(73,0- 78,4)	483719 $\pm$ 7804	0,0 $\pm$ 1,7
(78,4- 83,8)	459240 $\pm$ 9533	0,0 $\pm$ 2,1
(83,8- 89,2)	241929 $\pm$ 77507	46,6 $\pm$ 17,1
(89,2- 94,6)	70075 $\pm$ 32273	84,5 $\pm$ 7,1
(94,6-100,0)	186610 $\pm$ 59340	58,8 $\pm$ 13,1
CONTROL (MEDIO)	452790 $\pm$ 89408	



# GRAFICA 13

AFLE (CELULAS: P815X2)



### 3. EXTRACTOS LIPIDICOS DE CITOSOL Y MEMBRANAS DE LOS TUMORES EHRLICH Y SL2 (ECLE, EMLE, SL2CLE Y SL2MLE) Y DE SUERO HUMANO (HSLE)

#### 3.1. EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION CELULAR PRODUCIDO POR LOS EXTRACTOS LIPIDICOS DE CITOSOL Y MEMBRANAS DE LOS TUMORES EHRLICH Y SL2 (ECLE, EMLE, SL2CLE Y SL2MLE) Y DE SUERO HUMANO (HSLE)

En estos radioanálisis de inhibición de la proliferación celular, se utilizó medio de cultivo con una concentración de suero fetal de tenera de un 5%.

En las tablas 14 a 17 y sus respectivas gráficas, podemos observar la inhibición de la proliferación de las células de médula ósea de ratón debido a la actuación de diferentes tipos de extractos: ECLE, EMLE, SL2CLE y SL2MLE.

En las tablas 18 a 21 y sus respectivas gráficas, podemos observar la inhibición de la proliferación de las células tumorales P815X2, debido a la actuación de los extractos lipídicos anteriores.

Asimismo, en las tablas y gráficas 22 a 25, se expresan los valores de  $I_{50}$  y  $C_{50}$  correspondientes a la actuación de dichos extractos sobre la proliferación de células de médula ósea de ratón y sobre las células tumorales P815X2.

En estos resultados, se observa que todos los extractos utilizados inhibieron la proliferación, tanto de células de médula ósea de ratón como de células tumorales P815X2.

Asimismo, podemos comprobar que, al igual que ocurría con el AFLE, el efecto inhibidor de estos extractos (expresado en términos de  $C_{50}$ ), parece ser superior sobre la proliferación de células normales (médula ósea) que sobre células tumorales (P815X2).

Por otra parte, en las tablas y gráficas 26 y 27 se observa el efecto inhibidor del extracto lipídico de suero humano (HSLE) sobre

la proliferación de células de médula ósea y de las células tumorales P815X2.

Igualmente, en la tabla y gráfica 28 se expresan los valores de  $I_{50}$  y  $C_{50}$  correspondientes a la actuación del HSLE sobre dichas células.

Podemos comprobar que este extracto tiene un efecto inhibitor prácticamente nulo, tanto para células normales como para células tumorales.

**Tabla 14 y Gráfica 14**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de citosol de EHRLICH (ECLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón.

TABLA 14

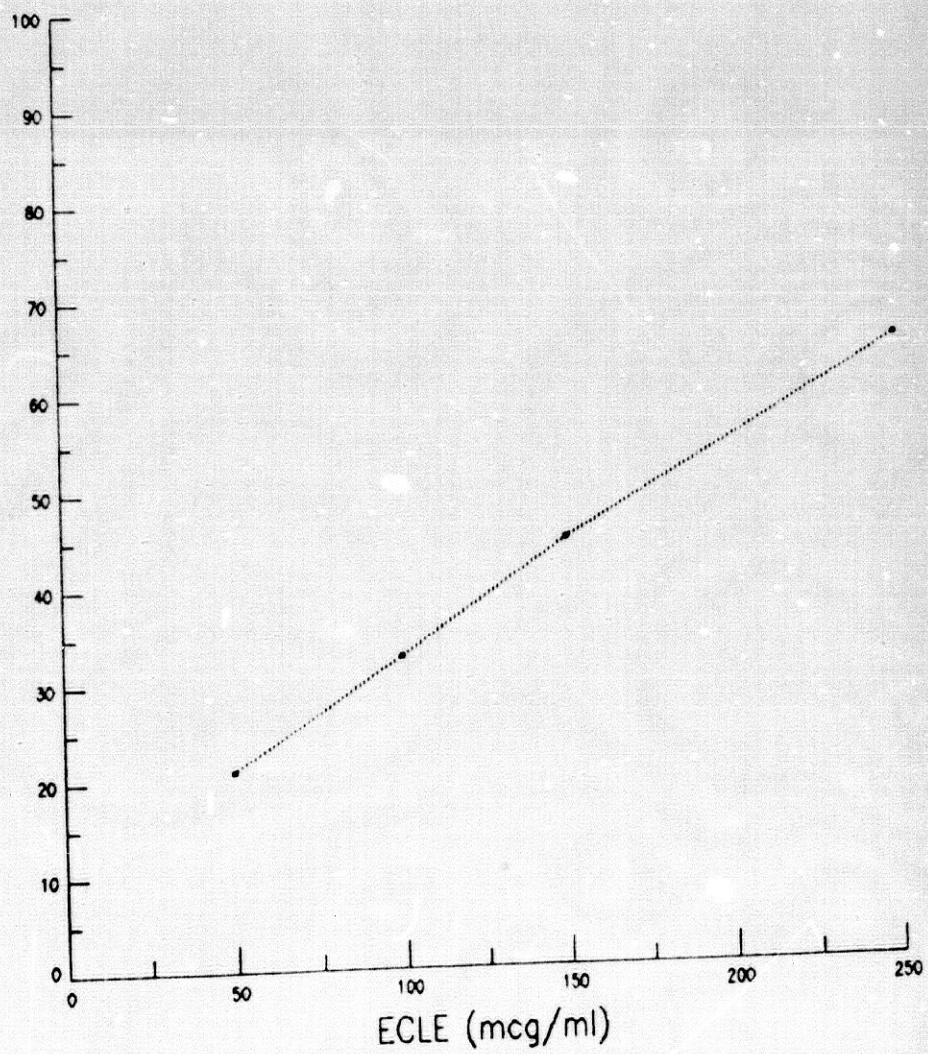
Células: Médula ósea de ratón

ECLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPM)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
50	45718 $\pm$ 3646	21,0 $\pm$ 6,3
100	38961 $\pm$ 2557	32,7 $\pm$ 4,4
150	32025 $\pm$ 3324	44,7 $\pm$ 5,7
250	20072 $\pm$ 1702	65,3 $\pm$ 2,9
CONTROL (MEDIO)	57871 $\pm$ 8909	

# GRAFICA 14

CELULAS: MEDULA OSEA DE RATON

INHIBICION (%)



**Tabla 15 y Gráfica 15**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de membranas de EHRLICH (EMLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón.

TABLA 15

Células: Médula ósea de ratón

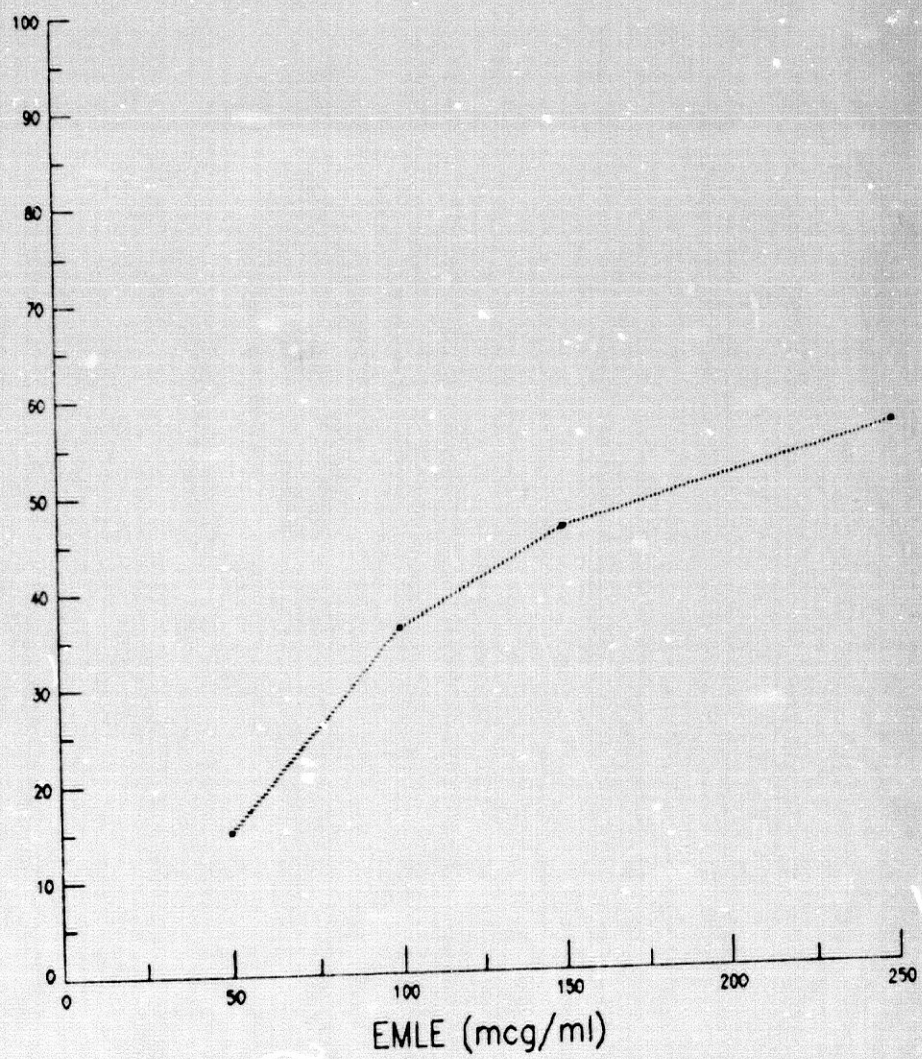
EMLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
50	50177 $\pm$ 3188	15,0 $\pm$ 5,4
100	37793 $\pm$ 3787	36,0 $\pm$ 6,4
150	31645 $\pm$ 834	46,4 $\pm$ 1,4
250	25460 $\pm$ 2931	56,9 $\pm$ 4,9
CONTROL (MEDIO)	59032 $\pm$ 8865	



# GRAFICA 15

CELULAS: MEDULA OSEA DE RATON

INHIBICION (%)



**Tabla 16 y Gráfica 16**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de citosol de SL2 (SL2CLE) sobre la captación de <sup>3</sup>H-Timidina por parte de células de médula ósea de ratón.

TABLA 16

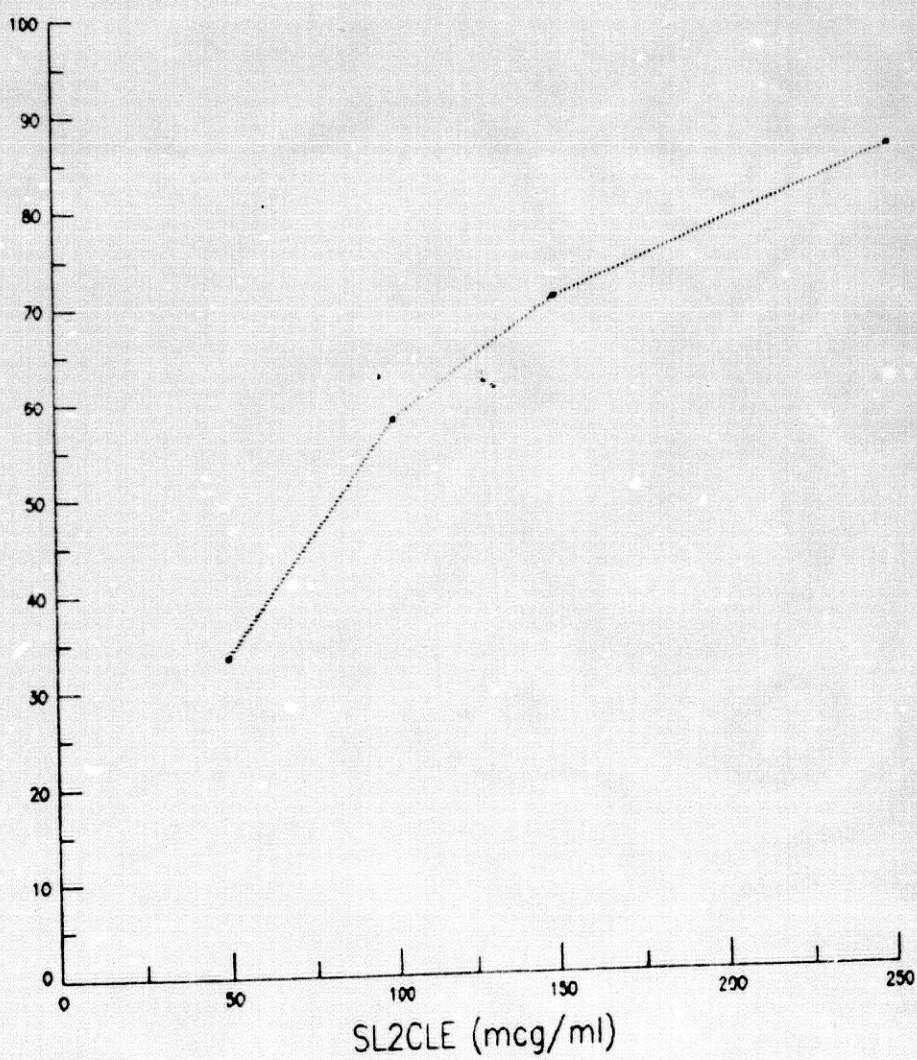
Células: Médula ósea de ratón

SL2CLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPH)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
50	37931 $\pm$ 3930	33,4 $\pm$ 6,9
100	23871 $\pm$ 2263	58,1 $\pm$ 4,0
150	16608 $\pm$ 2027	70,8 $\pm$ 3,6
250	7754 $\pm$ 1135	86,4 $\pm$ 2,0
CONTROL (MEDIO)	56954 $\pm$ 11400	

# GRAFICA 16

CELULAS: MEDULA OSEA DE RATON

INHIBICION (%)



**Tabla 17 y Gráfica 17**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de membranas de SL2 (SL2MLE) sobre la captación de <sup>3</sup>H-Timidina por parte de células de médula ósea de ratón.

TABLA 17

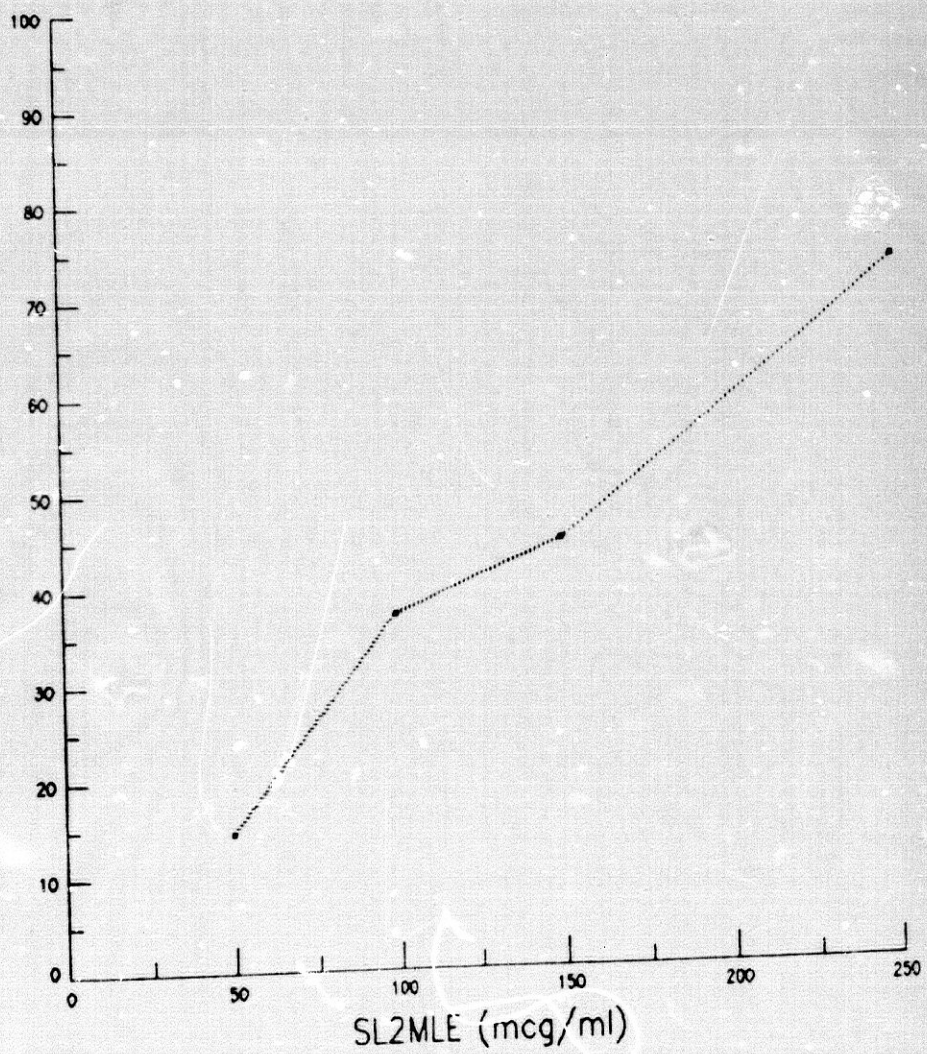
Células: Médula ósea de ratón

SL2MLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
50	44789 $\pm$ 2672	14,5 $\pm$ 5,1
100	32923 $\pm$ 2914	37,2 $\pm$ 5,6
150	28979 $\pm$ 1942	44,7 $\pm$ 3,7
250	13772 $\pm$ 576	73,7 $\pm$ 1,1
CONTROL (MEDIO)	52385 $\pm$ 12236	

# GRAFICA 17

CELULAS: MEDULA OSEA DE RATON

INHIBICION (%)



**Tabla 18 y Gráfica 18**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de citosol de EHRlich (ECLE) sobre la captación de <sup>3</sup>H-Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.



TABLA 18

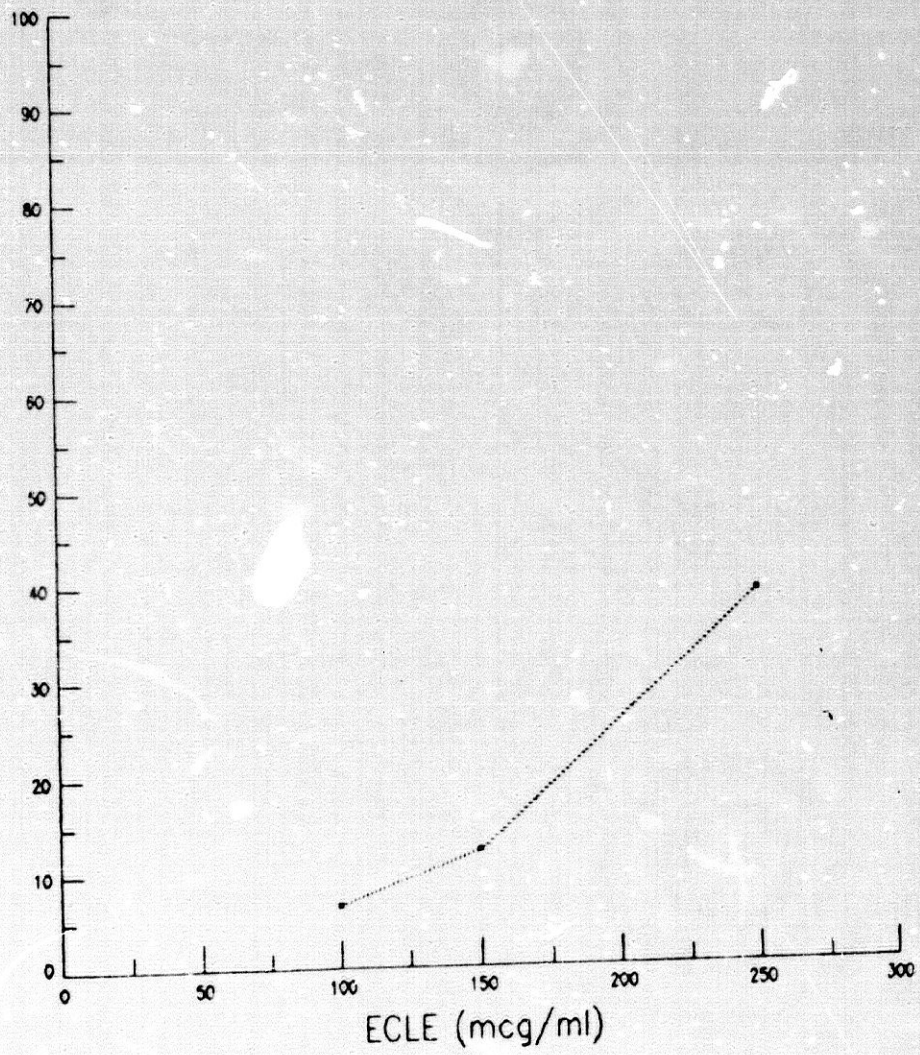
Células: P815X2

ECLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPM)	INHIBICION (%)
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	$\bar{X} \pm \text{SD}$
100	351384 $\pm$ 2621	6,5 $\pm$ 0,7
150	330209 $\pm$ 6231	12,1 $\pm$ 1,6
250	229279 $\pm$ 35152	39,0 $\pm$ 9,4
CONTROL (MEDIO)	375753 $\pm$ 43091	

# GRAFICA 18

CELULAS: P815X2

INHIBICION (%)



**Tabla 19 y Gráfica 19**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de membranas de EHRLICH (EMLE) sobre la captación de <sup>3</sup>H-Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 19

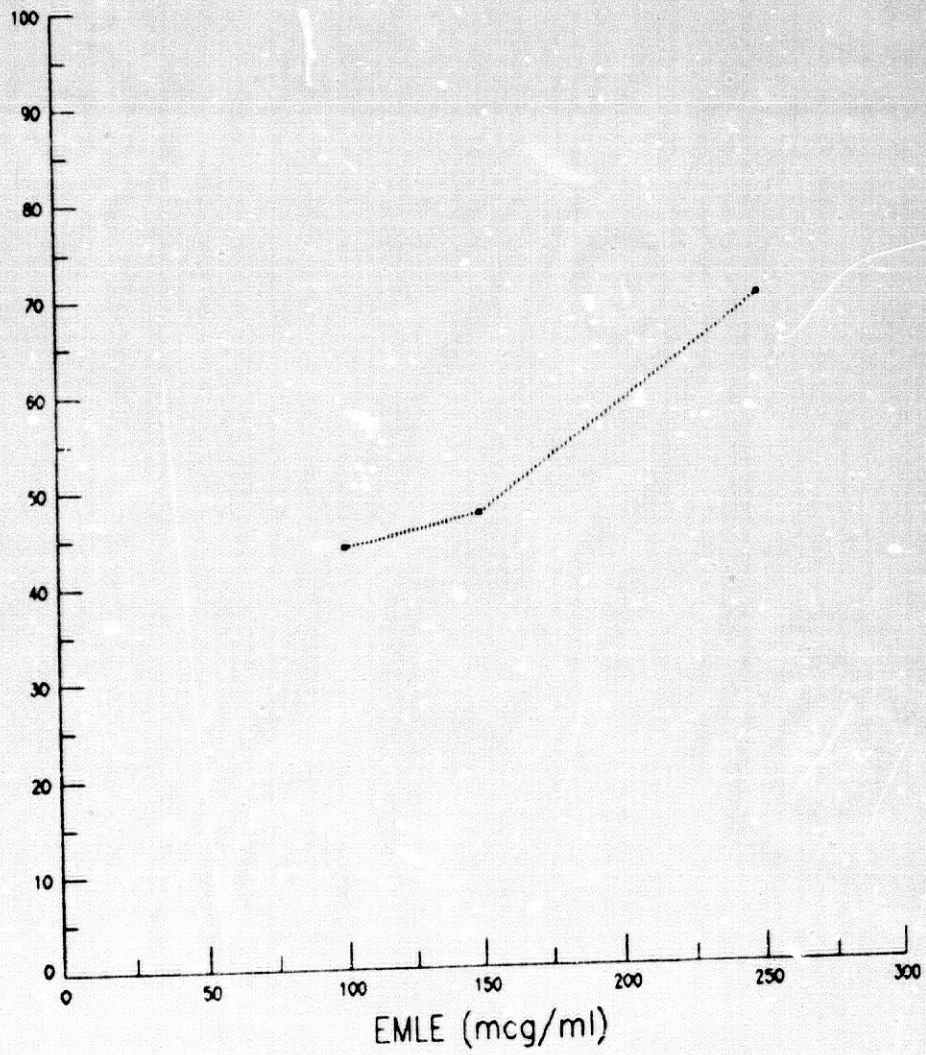
Células: P815A2

ENLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
100	198702 $\pm$ 30942	44,0 $\pm$ 8,7
150	186705 $\pm$ 18525	47,4 $\pm$ 5,2
250	105677 $\pm$ 1288	70,2 $\pm$ 0,4
CONTROL (MEDIO)	355017 $\pm$ 12339	

# GRAFICA 19

CELULAS: P815X2

INHIBICION (%)



**Tabla 20 y Gráfica 20**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de citosol de SL2 (SL2CLE) sobre la captación de  $^3\text{H}$ -Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 20

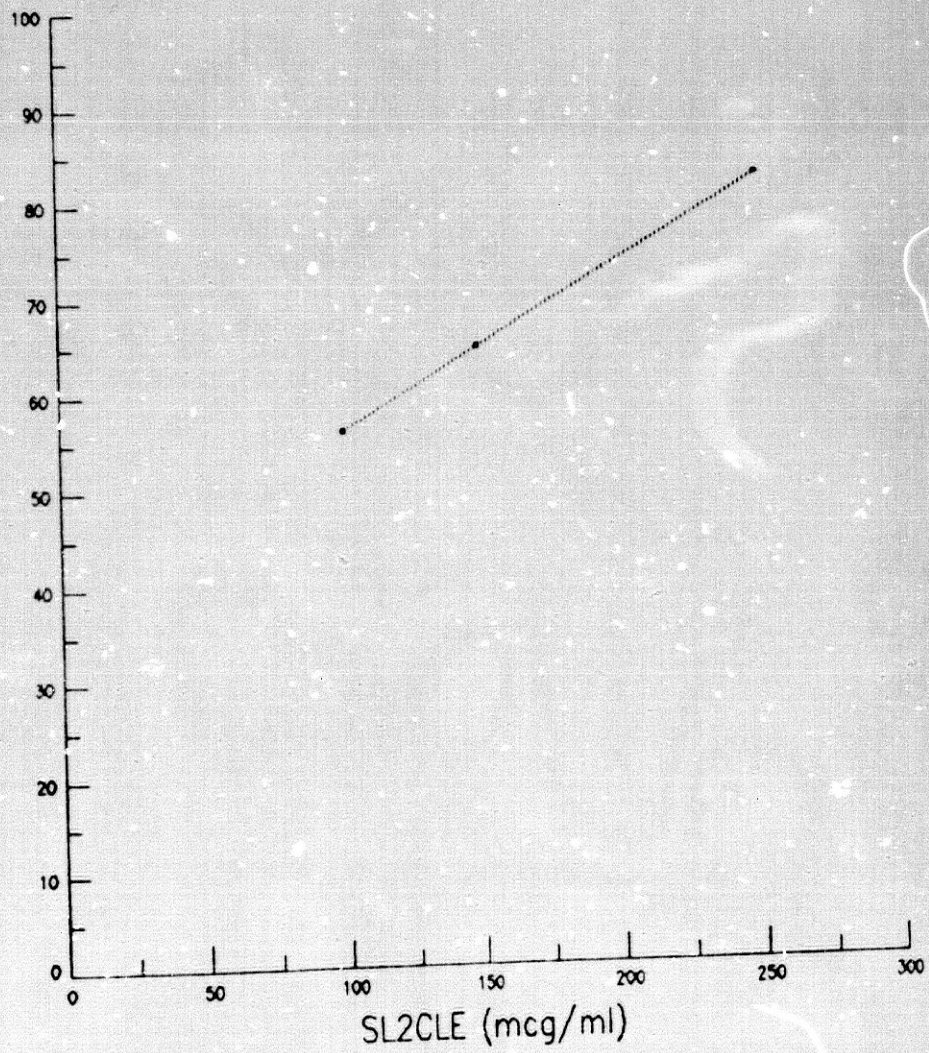
Células: P815X2

SL2CLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
100	155177 $\pm$ 12499	56,2 $\pm$ 3,5
150	125089 $\pm$ 7389	64,7 $\pm$ 2,1
250	61426 $\pm$ 10233	82,6 $\pm$ 2,9
CONTROL (MEDIO)	354081 $\pm$ 62449	

# GRAFICA 20

CELULAS: P815X2

INHIBICION (%)





**Tabla 21 y Gráfica 21**

Inhibición producida por distintas concentraciones del extracto lipídico de membranas de SL2 (SL2MLE) sobre la captación de <sup>3</sup>H-Timidina por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 21

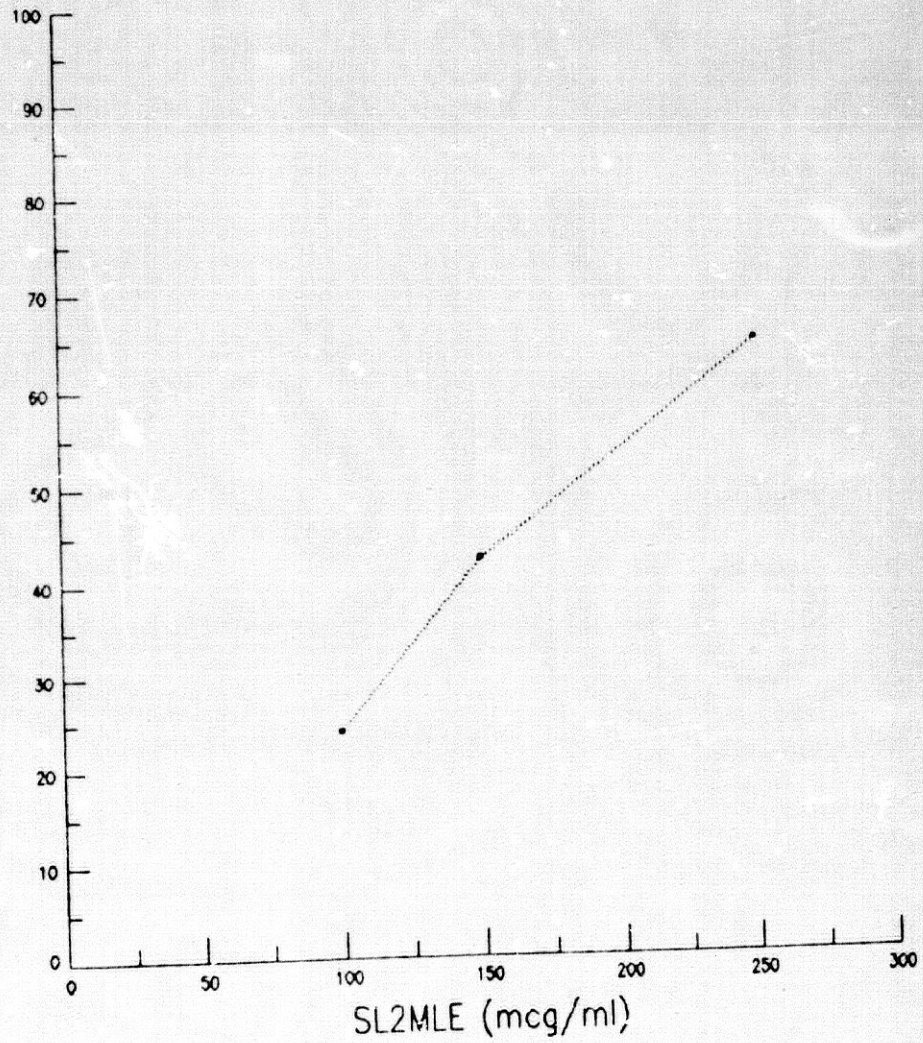
Células: P815X2

SL2MLE ( $\mu\text{g/ml}$ )	CAPTACION DE $^3\text{H}$ -TIMIDINA (DPN) $\bar{X} \pm \text{SD}$	INHIBICION (%) $\bar{X} \pm \text{SD}$
100	250728 $\pm$ 13480	24,0 $\pm$ 4,1
150	189489 $\pm$ 21644	42,5 $\pm$ 6,5
250	114820 $\pm$ 21804	65,2 $\pm$ 6,6
CONTROL (MEDIO)	329794 $\pm$ 31545	

# GRAFICA 21

CELULAS: P815X2

INHIBICION (%)



**Tabla 22**

Dosis  $I_{50}$  y  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de citosol de EHRLICH (ECLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

**Gráfica 22**

Dosis  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de citosol de EHRLICH (ECLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 22

ECLE

TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$	C <sub>50</sub> ( $\text{cel}/\mu\text{g}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$
- MEDULA OSEA	173,7 $\pm$ 24,8	11674 $\pm$ 1687
- P815X2	369,0 $\pm$ 72,9	696 $\pm$ 138

# GRAFICA 22

ECLE

C-50 (cel/mcg)

15000

Medula osea  
P815X2

10000

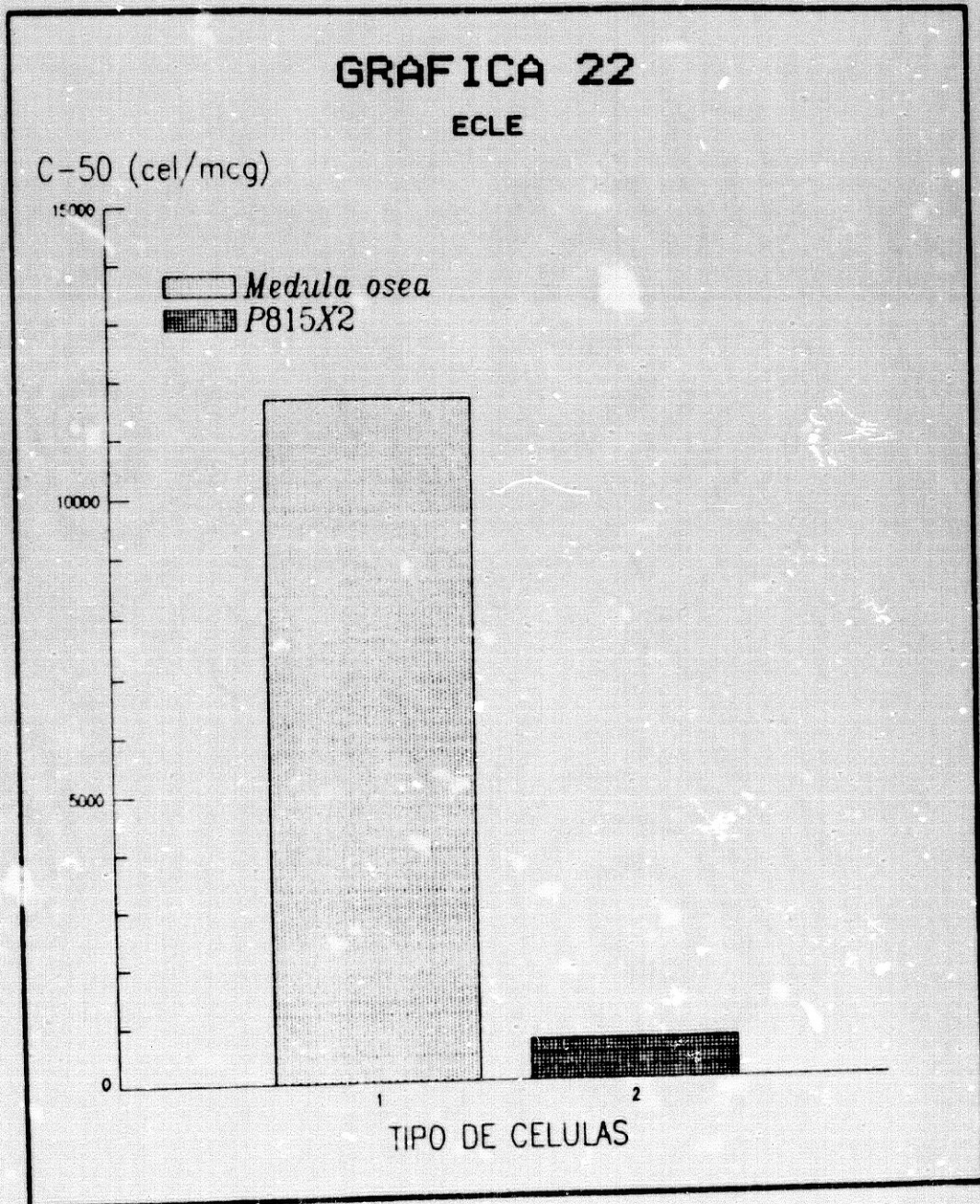
5000

0

1

2

TIPO DE CELULAS



**Tabla 23**

Dosis  $I_{50}$  y  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de membranas de EHRLICH (EMLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

**Gráfica 23**

Dosis  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de membranas de EHRLICH (EMLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

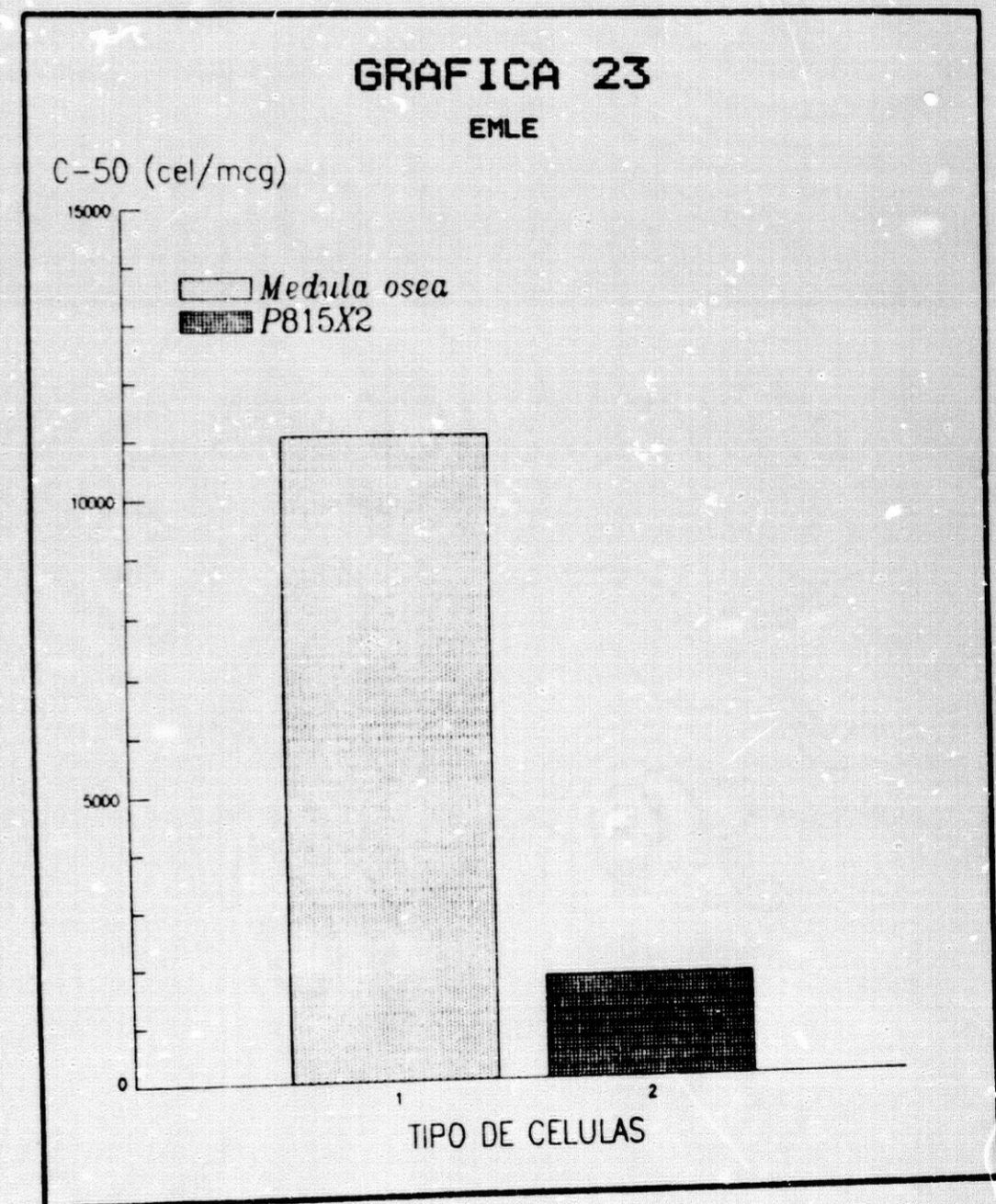
TABLA 23

EMLE

TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$	C <sub>50</sub> ( $\text{cel}/\mu\text{g}$ ) $\bar{Y} \pm \text{SD}$
- MEDULA OSEA	181,8 $\pm$ 17,5	11069 $\pm$ 1025
- P815X2	153,7 $\pm$ 49,2	1772 $\pm$ 687

GRAFICA 23

EMLE





**Tabla 24**

Dosis  $I_{50}$  y  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de citosol de SL2 (SL2CLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

**Gráfica 24**

Dosis  $C_{50}$  del efecto inhibitor del extracto lipídico de citosol de SL2 (SL2CLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 24

SL2CLE

TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> (μg/ml)	C <sub>50</sub> (cel/μg)
	$\bar{Y} \pm SD$	$\bar{Y} \pm SD$
- MEDULA OSEA	86,2 ± 9,1	23387 ± 2518
- P815X2	94,3 ± 2,8	2652 ± 80

# GRAFICA 24

SL2CLE

C-50 (cel/mcg)

25000

20000

15000

10000

5000

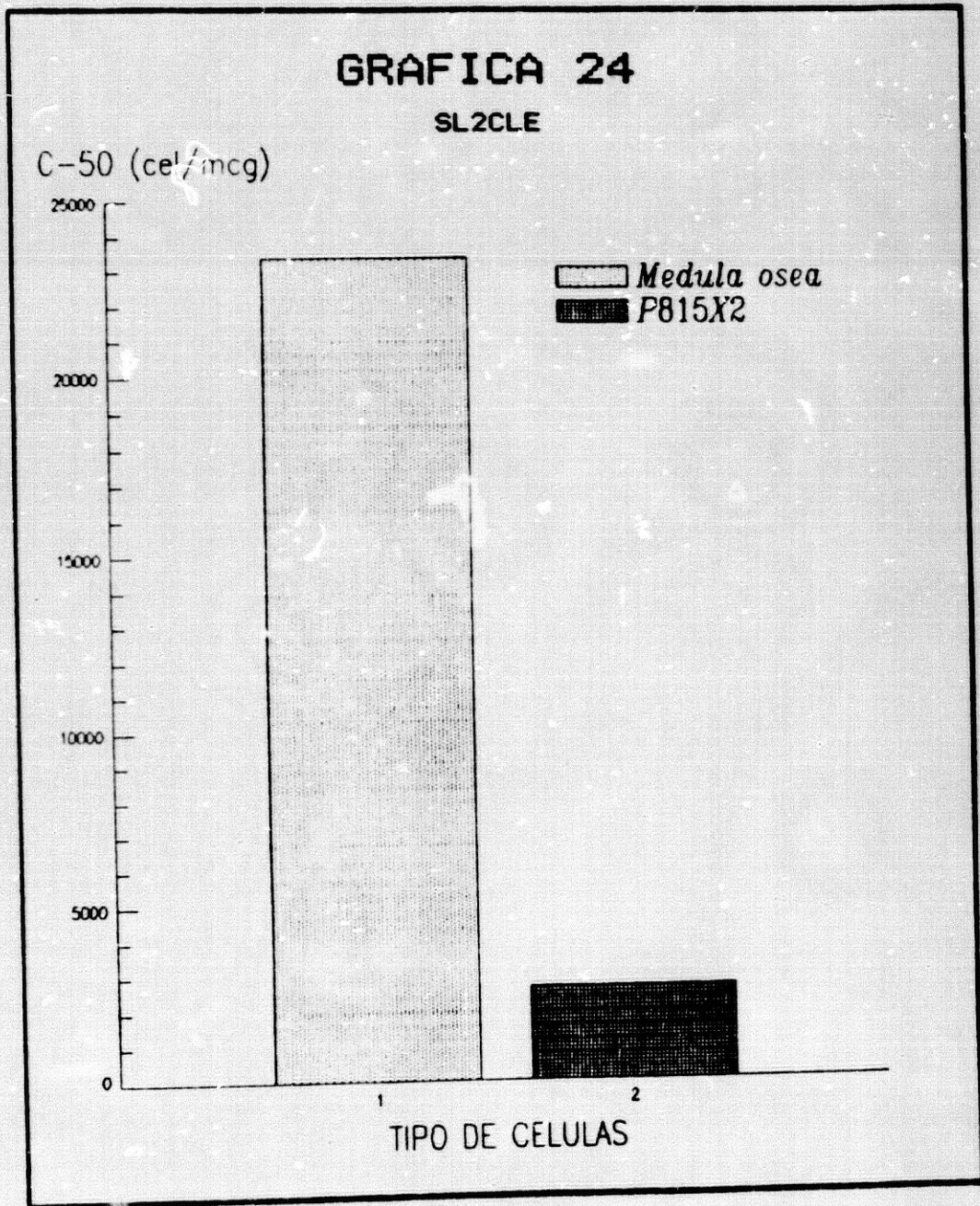
0

Medula osea  
P815X2

1

2

TIPO DE CELULAS



### Tabla 25

Dosis  $I_{50}$  y  $C_{50}$  del efecto inhibidor del extracto lipídico de membranas de SL2 (SL2MLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

### Gráfica 25

Dosis  $C_{50}$  del efecto inhibidor del extracto lipídico de membranas de SL2 (SL2MLE) sobre la incorporación de  $^3H$ -Timidina por parte de células de médula ósea de ratón y por parte de células del mastocitoma de ratón P815X2.

TABLA 25

SL2MLE

TIPO DE CELULAS	I <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$	C <sub>50</sub> ( $\text{cel}/\mu\text{g}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$
- MEDULA OSEA	174,4 $\pm$ 13,2	11510 $\pm$ 891
- P815X2	178,8 $\pm$ 26,6	1419 $\pm$ 210

# GRAFICA 25

SL2MLE

C-50 (cel/mcg)

