

**MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LAS CELULAS
MUSCULARES Y EPITELIALES**

JOSE MARIA GAMIZ JIMENEZ

Granada, Junio de 1.992

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 1991 a 1992

Folio 133

Número 265

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. José Luis Gamiz Jimenez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido. "Modulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico en las células musculares y epiteliales"

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

Granada 17 de Junio de 1992

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Alfonso Llana Marcos

Fdo.: Indalecio Sánchez-Montesinos Gauda

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo.: José Luis Velazco

Fdo.: Luis Mejías Mejías

FIRMA DEL GRADUANDO,



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

DIRECTORA:
PROF. Dra. Dña. ANTONIA ARANEGA JIMENEZ

TUTOR:
PROF. Dr. D. LUIS ALVAREZ GUIADO

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en Medicina por el
Licenciado

JOSE MARIA GAMIZ JIMENEZ

ANTONIA ARANEGA JIMENEZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA :

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, "MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LAS CELULAS MUSCULARES Y EPITELIALES", ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado JOSE MARIA GAMIZ JIMENEZ, durante los años 1989-1992 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 6 de Mayo de 1992.

FDO: ANTONIA ARANEGA

AMELIA ARANEGA JIMENEZ, PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA :

Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis. "MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LAS CELULAS MUSCULARES Y EPITELIALES", ha sido realizada bajo mi dirección por el licenciado JOSE MARIA GAMIZ JIMENEZ. Durante los años 1989-1992 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al título de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 6 de Mayo de 1992.

FDO: AMELIA ARANEGA

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada "MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LA CELULA MUSCULAR Y EPITELIAL", han sido realizados en el Laboratorio del Dpto. de Ciencias Morfologicas de la Universidad de Granada, bajo la supervisión del Profesor D. Luis Alvarez Guisado y la dirección de la Profesora Dña. Antonia Aránega Jiménez.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
Fdo: Prof. Dr. JUAN DE DIOS GARCIA GARCIA

Granada. Junio de 1992

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la dirección, ayuda y ánimo constantes recibidos por la Dra. Antonia Aránega Jiménez. Su consejo y estímulo han inculcado en mí una gran inquietud por la investigación.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- A Jesús Gonzalez y Juan Emilio Fernández, por su valiosa colaboración e inestimable ayuda.
- Al resto de mis compañeros del Departamento de Ciencias Morfológicas que me han ofrecido su amistad y colaboración.
- A mis compañeros y amigos del Departamento de Pediatría del H.G.B. de Baza que me han ofrecido su ayuda desinteresada.
- A Flor Mª por su comprensión, paciencia y extraordinaria ayuda durante la realización de todo mi trabajo.
- A todos mis amigos del Departamento de Parasitología Molecular de la Facultad de Ciencias por su gran ayuda y colaboración demostradas en todo momento.
- A Angel Concha por su asesoramiento y colaboración en la realización de las diversas técnicas inmunohistoquímicas.

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	8
I.A.- Evolución histórica.....	9
I.B.- Factores reguladores de la proliferación celular.....	12
I.C.- Factor de crecimiento epidermal.....	14
I.D.- Receptor del factor de crecimiento epidermal.....	17
I.D.1.-Porción extracelular del receptor.....	18
I.D.2.-Porción intracelular del receptor.....	20
I.D.3.-Activación de la tirosino-quinasa.....	23
I.D.4.-Biosíntesis del receptor.....	23
I.D.5.-Reciclación del EGFr.....	26
I.D.6.-Molécula oncogénica Erb B.....	26
I.E.- Estructuras de otros receptores de factores de crecimiento.....	28
I.F.- Factores de crecimiento y desarrollo.....	32
I.F.1.-Factores de crecimiento.....	32
I.F.2.-Factores de crecimiento y la embriogenesis.....	33

-Evolución de los cultivos.....	64
-Células Hela.....	65
-Células RD.....	67
III.A.4.- Instrumentación.....	67
III.A.5.- Reactivos.....	71
III.B.- METODOS.....	71
III.B.1.-Procesamiento de las biopsias musculares.....	71
III.B.2.-Técnica de inmunofluorescencia indirecta en cortes musculares.....	73
III.B.3.-Cultivos celulares.....	74
III.B.3.1.-Cultivos de células cardíacas procedentes de embriones de pollo.....	74
-Obtención del embrión.....	74
-Aislamiento de las células miocardiocíticas.....	74
-Extracción del corazón.....	75
-Disgregación del tejido embrionario y aislamiento celular.....	75
-Métodos físicos.....	75
-Métodos químicos.....	76
-Determinación de la densidad celular.....	78
-Medios de cultivo.....	79

-Preparación de los medios de cultivo...	79
-Factores de crecimiento.....	80
-Condiciones medioambientales de los cultivos.....	81
-Mantenimiento del cultivo.....	81
-Propagación de los cultivos celulares.....	81
-Cultivos celulares en "Shell-vial".....	82
-Técnica de inmunofluorescencia indirecta de las células en "Shell-vial".....	83
III.B.3.2.- Cultivo de células musculares esqueleticas procedentes de biopsias quirúrgicas.....	84
III.B.4.- Cultivo de células de Rabdomiosarcoma (RD) sometidas a diversos factores.....	86
III.B.5.- Técnicas de realización del FACSCAN (Histograma Simple).....	88
III.B.6.- Test del ciclo celular por contenido de DNA (FACSCAN).....	89
IV .- RESULTADOS.....	91
IV.A .- Estudio de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) en cortes de biopsias musculares humanas.....	92
IV.A.1.- IFI de corte de biopsia muscular estriada.....	93
IV.A.2.- IFI de corte de biopsia muscular cardiaca.....	94

IV.A.3.- IFI de corte de biopsia muscular lisa.....	96
IV.B .- Expresión del EGFr en células musculares cultivadas en "Shell-vial".....	97
IV.B.1.- IFI de rabdomiocitos.....	98
IV.B.2.- IFI de cels. cardiacas de embrión de pollo 34 H.H	99
IV.C .- Modulación del EGFr en células musculares (humanas) normales y tumorales.....	101
IV.D.- Modulación del EGFr en las células cardiacas del embrión de pollo a lo largo del desarrollo.....	107
IV.E .- Relación entre las modificaciones en la expresión del EGFr y sus repercusiones en el ciclo celular.....	116
V .- DISCUSION.....	133
V.A .- Consideraciones generales.....	134
V.B .- Expresión del EGFr en cortes de biopsias musculares.....	135
V. C .- Expresión del EGFr en células musculares cultivadas en "Shell-vial".....	135

V. D .- Modulación del EGFr en células
musculares humanas tumorales y no
tumorales.....136

V. E .- Modulación del EGFr en células
cardiacas de embrión de pollo
a lo largo de su desarrollo
embrionario.....138

V. F .- Relación entre las modificaciones
en la expresión del EGFr y sus
repercusiones en el ciclo
celular.....139

VI .- CONCLUSIONES.....142

VII .- BIBLIOGRAFIA.....144

INTRODUCCION

I.A.- EVOLUCION HISTORICA

El aislamiento y la caracterización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr), incluyendo la clonación de su DNA, se ha visto facilitada por la utilización de una línea celular que presenta una gran cantidad de receptores.

La línea celular fue designada como A-431 y se obtuvo en 1972 de un carcinoma epidermoide humano de vulva (Giard y Aaronson). No hay razones para suponer que la información obtenida del EGFr de las células A-431 es particularmente inusual. Sin embargo, puede presentar pequeñas diferencias en algunos aspectos como puede ser la rapidísima respuesta mitogénica que en otros tipos celulares se encuentra más atenuada.

El EGFr de las células A-431 fue aislado por primera vez en 1.980 con la utilización de afinidad cromatográfica [1]. El receptor tenía una masa molecular de 150.000; sin embargo, métodos de purificación posteriores, indicaron que la masa era de 170.000 [2]. Esta corresponde a estudios realizados con I^{125} -EGF. Casi todas las células contienen una protesa que rompe la molécula primitiva de 170.000 daltons en otra con una masa molecular más pequeña (150.000).

El EGFr ha sido posteriormente aislado en activo ("vivo") a partir de ratones vivos o de preparaciones purificadas de placenta humana [3].

Anteriormente al aislamiento del EGFr, se observó que la adicción del EGF a los receptores de membrana de las células A-431, producía una rápida activación de la proteína kinasa [4,5].

Como resultado de diversos experimentos se llegó a la conclusión de que la molécula del EGFr era un polipeptido, que contenía principalmente unos lugares o bandas de unión sensibles a un factor de crecimiento que activa la tirosina kinasa. Purificaciones posteriores del EGFr han revelado la presencia de otras dos enzimas activas, DNA topoisomerasa y la fosfatidylinositol kinasa, pero esto parece representar una contaminación proteica [6,7,8]. Estén o no asociadas estas proteínas con la purificación del receptor está por determinar. El aislamiento del receptor insulinico en diversas preparaciones han puesto igualmente de manifiesto la presencia de la fosfatidylinositol kinasa.

En 1984, un análisis secuencial del EGFr [9], permitió la clonación del DNA del receptor y la deducción de la secuencia de aminoácidos de la molécula entera [10]. Estos estudios han demostrado la estructura básica, haciendo posible que se puedan realizar los estudios sobre las bandas de unión o de la actividad de la tirosina kinasa activada del EGFr como simples regiones de una cadena polipeptídica. Los resultados de posteriores estudios estructurales han llevado a su representación gráfica.

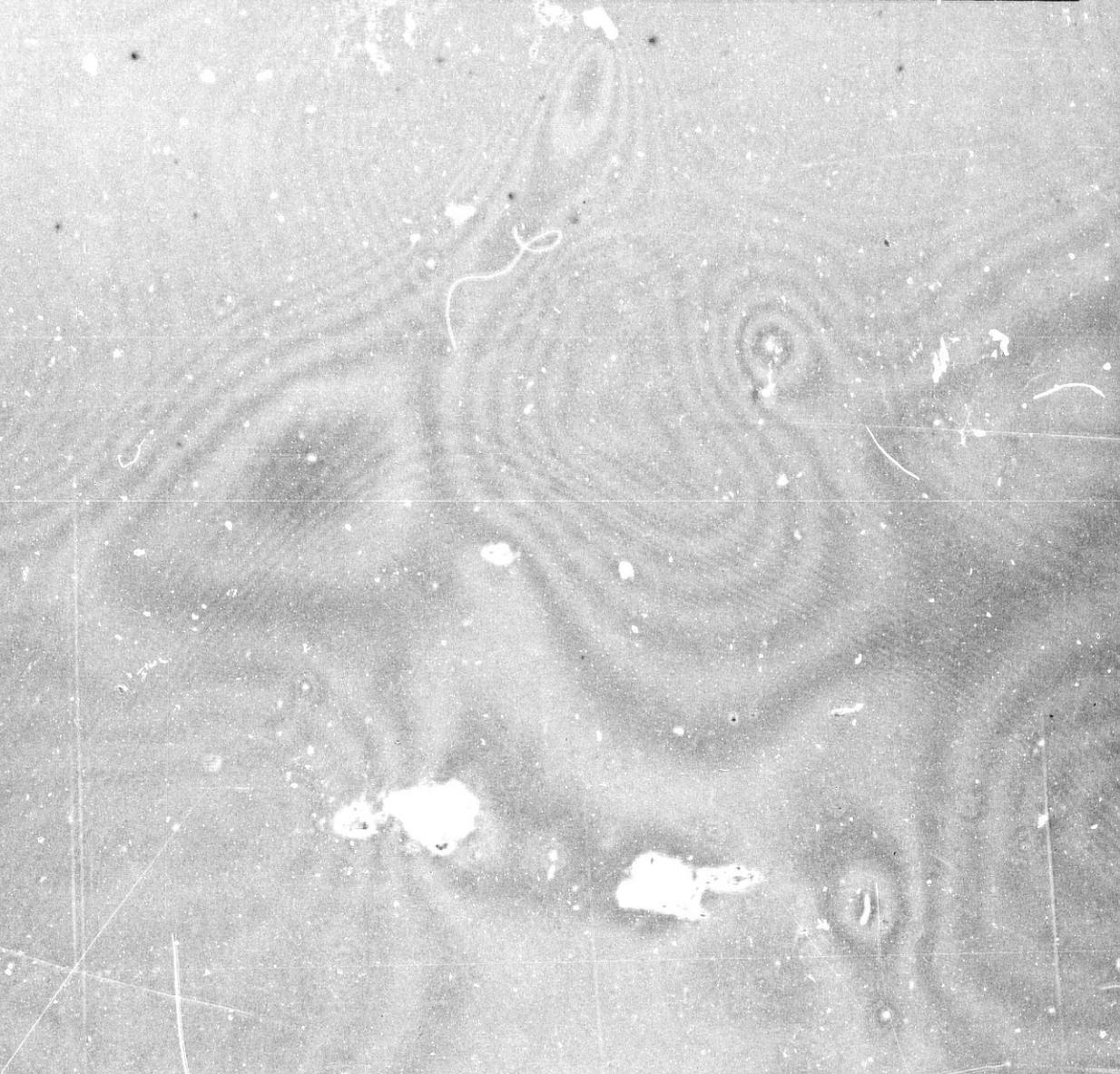


Figura 1. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr). Aplicaciones de los siguientes símbolos: -, secuencia de enlace para N glicosilación; -◄, probable lugar de enlace para cadenas oligosacaridas; •, residuos de cisteina; Y, residuos de tirosina; P-Y, residuos de fosfotirosina; T, residuos de treonina; P-T, residuos de fosfotreonina; K, residuos de lisina; FSBA-K, residuos de lisina unidos covalentemente con p-fluorosulfonilbenzoil adenosina; región de la membrana divisoria; aérea punteada, secuencias similares a src quinasa [10,11,12].

La materia del receptor está formada por una cadena polipeptídica de 1.186 aminoácidos, que está dividida en dos regiones por una membrana hidrofóbica. Si otra membrana abarca ambas regiones que envuelven la molécula no se conoce. Otro grupo, basado en unos programas más complejos de estructuras de membrana, sugieren la existencia de una membrana α -helicoidal en el EGFr [13].

I.B.- FACTORES REGULADORES DE LA PROLIFERACION CELULAR

El conocimiento de los factores reguladores de la proliferación celular ha tenido recientemente grandes descubrimientos. Si bien, el completo conocimiento de estos procesos está aún bastante distante, los mecanismos bioquímicos y las estructuras moleculares han presentado notables avances.

En estos momentos se conocen a fondo unas 20 proteínas que actúan como factor de crecimiento, aunque se supone que existen muchas más. Estas no son distintas de las hormonas en general. Se piensa que estos factores deben tener otras actividades biológicas además de estimular la proliferación celular.

Cuando el factor de crecimiento se une al receptor, se produce la estimulación de diversos cambios bioquímicos:

- * Intercambios iónicos.
- * Activación de diversas quinasas.
- * Alteración de la forma celular.
- * Incremento de la transcripción de genes.
- * Estimulación de enzimas que regulan el metabolismo fosfolipídico.

Estas y otras reacciones, terminan horas después, con la replicación del DNA y la división celular.

Algunos factores de crecimiento son conocidos por actuar, dependiendo del tipo celular y circunstancias fisiológicas, como inhibidores del crecimiento o bien como inductores de la diferenciación celular.

Factores de crecimiento más importantes y sus funciones más características en las fases más primitivas del desarrollo:

- Factor de Crecimiento Insulinico (IGF-I, IGF-II): Promueve la diferenciación de las células nerviosas y del tejido conectivo, así como la mitosis en muchos tipos celulares.
- Factor de Crecimiento Epidermal (EGF): Mitosis en los tejido mesodérmico y ectodérmico.
- Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α): Promueve la diferenciación epitelial.
- Factor de Crecimiento Fibroblastico (FGF): Mitosis en las células endodérmicas y mesodérmicas. Potente agente angiogénico. Induce la formación mesodérmica del embrión.
- Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β): Mitogénico de acción bifásica. Potente inhibidor del crecimiento epitelial y de algunos tejidos conectivos. Estimula el crecimiento de algunos fibroblastos. Induce la formación mesodérmica del embrión. Impide la diferenciación de las células musculares pero potencia aquellas células del epitelio bronquial. Favorece la síntesis de tejido conectivo. Quimiotaxis positiva para los fibroblastos.

- Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas(PDGF):
Mitosis de las células mesodermicas. Quimioatracción para fibroblastos y células musculares.

Estudios con marcadores radioactivos de los factores de crecimiento han señalado claramente que la fase inicial en la interacción de estos con las células diana son las bandas de alta afinidad de los receptores que se encuentran en la membrana plasmática. La estructura y propiedades funcionales de estos receptores ha sido el objetivo de recientes investigaciones científicas, y en este punto existen un considerable número de datos sujetos a revisión.

1.C.- FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL

Durante los estudios del factor de crecimiento nervioso, Stanley y Cohen (1959) detectaron en extractos de glándulas submaxilares un péptido que inducía una estimulación epidérmica con queratinización de los párpados [14].

Utilizando esta experiencia, se obtuvo una secuencia proteica de 53 aminoácidos a partir de glándulas submaxilares de ratón (Savage, 1972). El equivalente humano fue posteriormente aislado a partir de la orina. El precursor del TGF- α contiene 160 aminoácidos, y el precursor del EGF contiene 1.168 aminoácidos [15].

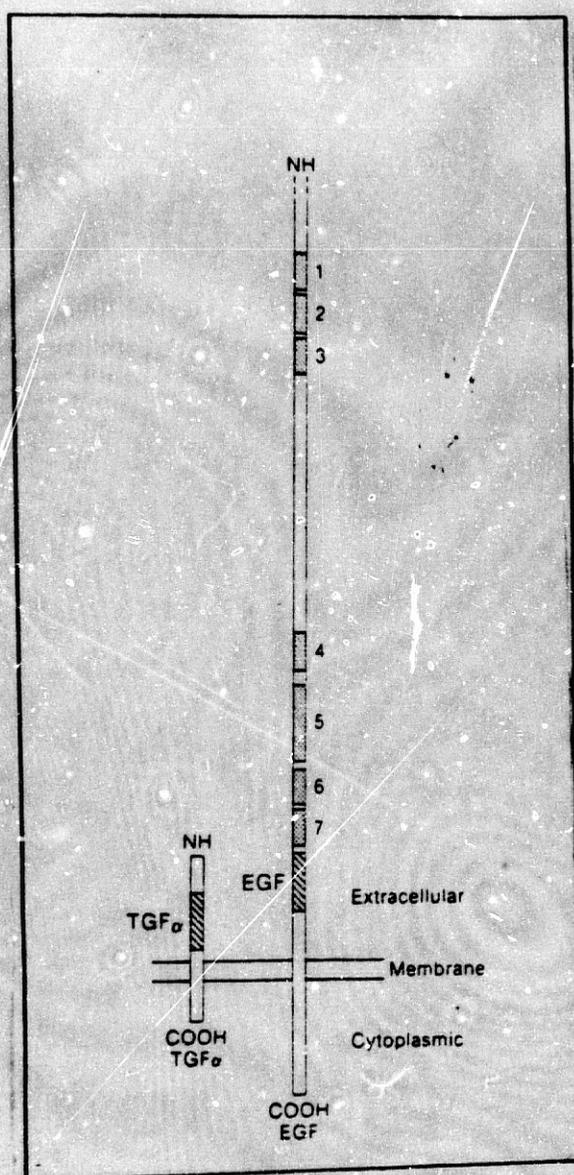


Fig.2. Estructuras de los precursores del EGF y del TGF- α . El precursor del TGF- α contiene 160 aminoácidos, y el precursor del EGF 1.168 [15].

La estructura del precursor del EGF se dedujo desde el DNAC de la estructura que aparece en la figura 2. La proteína comienza con una secuencia de 29 aminoácidos y una estructura semejante al receptor transmembrana. Dicha estructura se encuentra rodeada por una membrana alfa helicoidal, también posee una región de baja densidad lipoproteica semejante a la del receptor.

La comparación de la secuencia proteica del EGF en un gran banco de datos nos indica que existe un parecido con parte del factor de coagulación IX, X, proteína C, activador del plasminogeno, y para la proteína del virus vaccinia (Doolittle et al. 1984; Stroobant et al. 1985). La proteína viral contiene secuencias homologas para el EGF y también del potencial transmembrana. El factor de crecimiento viral es un agonista para el receptor del EGF (EGFr), fue posteriormente aislado a partir de un medio celular infectado con el virus (Stroobant et al. 1985; Twardzik et al. 1985). Parte de la secuencia de aminoácidos procesados forma parte del factor de crecimiento viral, el cual es glicosilado, tuvo un peso molecular de 9084 y correspondía al EGF homologo obtenido a partir de la secuencia del DNA viral. El EGF, TGF- α y el factor de crecimiento del virus vaccinia son derivados de precursores proteicos con receptores de la superficie celular con estructuras semejantes [15].

Diversos estudios sugieren que en las fases tempranas del desarrollo, el EGF puede desplegarse de célula en célula formando un importante sistema de comunicación. Los factores de crecimiento pueden actuar desde la activación de los genes en los estadios más primitivos del desarrollo, hasta asumir funciones reparadoras o regeneradoras en las etapas posteriores [15].

La síntesis de EGF en las glándulas salivares del ratón es altamente inducida por los androgenos y por los agonistas β -adrenergicos. Este es detectable en saliva, leche, y orina, pero en la circulación sanguínea se detecta en los gránulos alfa de las plaquetas, sugiriendo un papel análogo al PDGF y TGF- α , los cuales son también encontrados en gránulos plaquetarios [15].

Como resumen final podemos decir que el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) es un mitogeno bien caracterizado de 53 aminoácidos, que estimula la proliferación de numerosos tipos de células [14,16].

I.D.- RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL

El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) es una glicoproteína de membrana de 170 kd presente en numerosas poblaciones celulares, epiteliales y no epiteliales [16].

Con la excepción de las células hematopoyéticas, el número de receptores por célula oscila de 20.000 a 200.000. Una variación significativa se puede observar en la línea celular A-431 (obtenida en 1.972 a partir de un carcinoma epidermoide de vulva) y en otros carcinomas epiteliales que tienen aproximadamente dos millones de receptores por célula [13].

Todos los datos indican que el EGFr media las señales biológicas no sólo del EGF, sino también de otros dos factores del crecimiento parecidos al EGF, como son el factor transformante del crecimiento alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento del virus vaccinia (VGF) [17].

Los tres factores son practicamente iguales en un 22% de la secuencia de aminoacidos, pero para las bandas del EGFr tienen una afinidad casi idéntica y producen las mismas respuestas en las células diana. Los tres factores son, sin embargo, los productos de diferentes genes que se expresan de forma diferente. En seres humanos el gen del EGF está localizado en el cromosoma 4 y el gen del TGF- α en el cromosoma 2. El gen del VGF está codificado por el genoma del virus vaccinia. La respuesta biológica de las células diana a estos factores, tanto en animales intactos como en cultivos celulares es la proliferación [14]. Sin embargo, otras respuestas que se han descrito son discutidas por el momento.

El receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFr), es un polipeptido de 1.186 aminoacidos, el cual se encuentra dividido en dos campos uno intracelular y otro extracelular, por una membrana hidrofobica.

I.D.1.- Porción extracelular del receptor

La porción extracelular del EGFr está constituida por 621 aminoacidos [10]. Incluye las bandas de unión de alta afinidad, y está caracterizada por dos puntos destacados: un alto contenido de cisteina (aproximadamente un 10%) y un elevado número de secuencias para enlaces N-glicosilados.

Quizas, solamente 9 residuos de cisteina se encuentren en la porción intracelular del EGFr, mientras la extracelular cuenta con 51 los cuales estan localizados en dos regiones que son las que van del 134 al 313 y la otra del 446 al 612 .

Estas dos regiones ricas en cisteina parecen cooperar para la formación de las bandas de unión de alta afinidad para el EGF.

Una gran parte de los residuos de cisteina que se encuentran en la porción extracelular están probablemente en forma de disulfuros, pero el contenido total del receptor todavía no ha sido cuantificado. No obstante, es probable que existan unas regiones termodinámicamente estables en la porción extracelular. Sin embargo, no se conoce de que forma las regiones ricas en cisteina participan en los lugares de unión.

Experimentos realizados en las bandas con I^{125} unido al EGF, nos indican que estas son resistentes a la elevación de la temperatura (10 minutos a 50°C).

Las regiones ricas en cisteina forman parte también de otros receptores (IGF-1, NGF), estas características no están presentes en otros receptores parecidos (PDGF, CSF-1, IL-2).

La zona de las bandas de unión del EGFr está también caracterizada por un contenido relativamente alto de carbohidratos.

El detalle de la estructura al ser compleja es probable que varíen algo en los diferentes tejidos y células.

Al tener la región un alto contenido en cisteina y carbohidratos (aproximadamente el 40% de la masa), este segmento del receptor (EGFr) es altamente resistente a la proteólisis.

En las células intactas, ni la tripsina produce alteraciones en la capacidad de unión a las bandas del I^{125} -EGF. Si las células están destruidas (rotas), sin embargo, se produce un fragmento de aproximadamente 120,000 daltons. Este fragmento contiene la porción extracelular entera, el segmento transmembrana, y una pequeña porción de la región citoplasmática que incluye el zona de fosforilación de la treonina (correspondiente al lugar 654).

Si el receptor (EGFr) es tratado previamente con agentes reductores, entonces la región extracelular puede ser más extensamente digerida por la tripsina [9].

La región de las bandas está separada de la porción intracelular por una membrana hidrofoba que consta de 23 aminoácidos.

1.D.2.- Porción intracelular del receptor

La región citoplasmática del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) está sujeta a un intenso interés por dos razones: la actividad de la tirosino-quinasa encontrada en esta región de la molécula se considera el primer efecto que se produce en el proceso de señales, y una actividad parecida está presente en otros receptores del factor de crecimiento así como en varios productos oncogénicos.

La zona del C-terminal es importante para la función del receptor al contener la mayoría de los lugares de autofosforilización. Estos lugares han sido identificados por secuenciación de las proteínas del EGFr obtenido de células A-431, marcadas con fósforo 32 en presencia de EGF [12].

Los lugares de fosforilización corresponden a tirosinas situadas en el 1.173, 1.148 y 1.068. La tirosina situada en la posición 1.173 parece ser la posición donde se produce con más intensidad en las células intactas. Cuando esta reacción se produce fuera (in vitro), ninguno de los parámetros señalados anteriormente se modifican [12].

La región de la autofosforilización y del carbono terminal del EGFr se obtiene experimentalmente por proteólisis. El tratamiento del receptor con proteasas tales como la tripsina, produce rápidamente dos fragmentos, uno de 20.000 dalton conteniendo el carboxilo terminal y los tres lugares de autofosforilización y por otra parte tenemos un fragmento de 150.000 dalton correspondiente a la región extracelular y a la zona de la tirosino-quinasa.

Investigaciones de la activación de la tirosina quinasa, nos ha indicado que se requieren niveles relativamente bajos de Mn (1-5 Mm) o altos niveles de Mg (10-20 Mm) para adquirir la máxima actividad enzimática [15].

Las bandas de unión del receptor parecen ser los mayores reguladores de la actividad enzimática, aunque se conoce relativamente poco del mecanismo molecular que envuelve la activación por el EGF.

Estudios estructurales del EGFr indican una banda por molécula, pero estudios in vivo sugieren la presencia de dos clases de bandas en muchas células. Ambos tipos han sido descritos como de alta afinidad ($K_d = 0,1 \text{ nM}$) o de baja afinidad ($K_d = 1 \text{ nM}$).

La activación de la tirosina quinasa se produce como resultado de la agregación a las bandas del EGF, sin embargo, otros autores consideran que se trata tan solo de una activación molecular [15].

Se ha señalado que el EGFr es una fosfoproteína in vivo, conteniendo 2.5 - 3.5 moles de fosfato por mol de receptor. Mapas tripticos de los fosfopeptidos revelan que estos fosfatos estan abundantemente distribuidos en el interior de la serina y treonina contenidas en los péptidos .

La estimulación del receptor por el EGF produce la fosforilización de los concentrados de tirosina localizados en la zona próxima al carboxilo terminal de la molécula.

Estudios con dos oncogenes, el v-src y v-ros indicaron que estas proteínas catalizaban la fosforilización de los residuos de tirosina.

La proteína quinasa C cataliza la fosforilización del EGFr resultando un decrecimiento de las bandas de alta afinidad y una inhibición de la actividad de la tirosino quinasa.

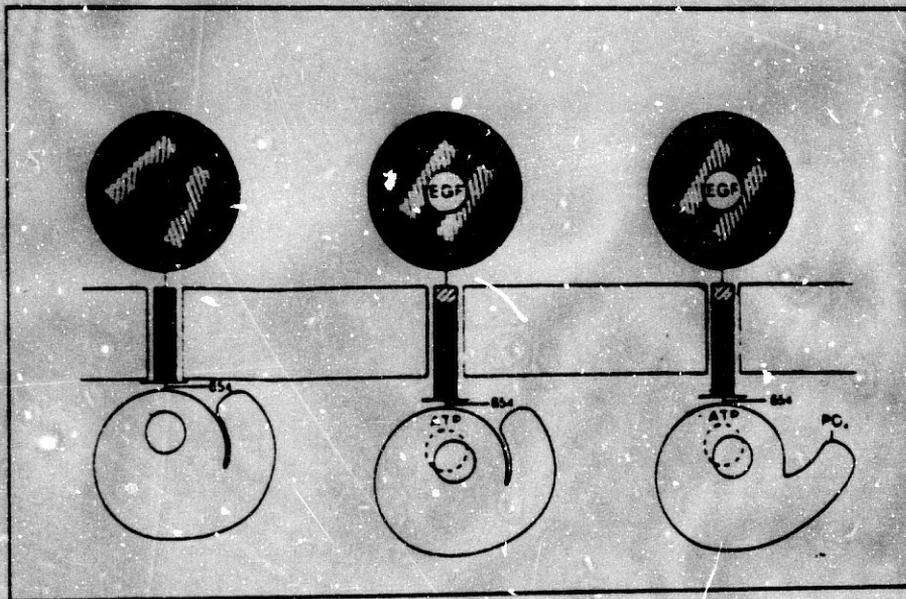


Figura 3 . Mecanismo de activación del receptor del factor de crecimiento epidermal.

I.D.3.- Activación de la tirosino-quinasa

Toda activación enzimática requiere en primer lugar la unión del EGF a las bandas de unión como señal primaria, y la fosforilización como una rápida respuesta secundaria.

Estudios sobre la regulación del EGFr nos indican que los niveles y funciones pueden ser aumentados por EGF, hormonas tiroideas, $17-\beta$ estradiol y TGF- β [15].

La máxima activación de la tirosina quinasa del EGFr, en membranas, preparaciones solubilizadas [18], o preparaciones purificadas del receptor [19,20], requieren concentraciones de saturación del EGF, y las curvas de concentración sugieren una relación lineal entre las uniones y la activación quinasa.

La función más importante de la región citoplasmática del receptor (EGFr) consiste en la transmisión y la amplificación de la señal iniciada por las bandas de unión.

El factor de crecimiento depende de la actividad de la tirosino quinasa de la región citoplasmática, la cual es el mecanismo primario, aunque no exclusivo, para la formación del segundo mensaje intracelular.

I.D.4.- Biosíntesis del receptor

El gen del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 en la región p14-p12.

Muchos tipos de células, con la excepción de las hematopoyéticas, presentan niveles muy variables de EGFr.

Parece no existir relación entre el número de receptores y la respuesta celular al EGF (este punto existen una gran disparidad de criterios).

Cuando las células están creciendo en presencia de EGF, el número de receptores desciende en un 90%. Quizas, el crecimiento responsable del EGF puede ser mediado por pocos receptores, unos 2.000 por célula [13].

Algunas líneas han presentado una sobreexpresión, con niveles de un millón de receptores por célula. La más conocida de estas es la línea celular A-431, la cual se deriva de un carcinoma epidermoide. Casi todas las líneas celulares con sobreexpresión son derivadas de carcinomas escamosos. Esta alteración de la expresión del receptor, se ha encontrado en una gran variedad de tumores humanos (carcinomas). En algunos casos, se encontraba acompañada de una amplificación del gen del EGFr, mientras que en otros esta no se producía, incrementando el RNAm del receptor por un mecanismo transcripcional.

Las variantes de las líneas celulares presentan diversos niveles de EGFr, no estableciéndose relación entre el número de EGFr y el crecimiento celular [21]. Sin embargo, el papel del EGFr en el crecimiento celular está todavía sin aclarar.

I.D.5.- Reciclación del EGFr

Según diversos estudios entre los que podemos destacar los de Sorkin, después de cada interacción EGF/EGFr se produce una reciclación del receptor, para lo cual se requiere la existencia de energía y una temperatura determinada [22].

I.D.6.- Molécula oncogénica Erb B

De una forma bastante inesperada, se ha observado una gran semejanza entre el EGFr y la secuencia del oncogen erb B del virus de la eritroblastosis aviaria (AEV).

Estudios independientes del EGFr y de v-erb B señalaron ambas regiones en el cromosoma 7 humano. Es altamente probable, por lo tanto, que el gen para el EGFr es el protooncogen desde el cual se deriva el gen del virus erb B.

Se debe hacer notar, sin embargo, que el mapa o clonación del EGFr o secuencias celulares correspondientes al v-erb B no han sido descritas en el sistema aviario. Presumiblemente, el oncogen del v-erb B es derivado a partir de secuencias del genoma aviar. El grado de semejanza entre el EGFr y el gen del v-erb B es de destacar dada la distancia evolutiva entre las dos moléculas. Una secuencia cercana a las 400 posiciones en la región citoplasmática del EGFr, incluyendo la región tirosino quinasa, es casi idéntica en un 95% a la secuencia del v-erb B [10]. Las obvias diferencias entre las dos moléculas son la gran reducción de la región extracelular del EGFr en el v-erb B y una pequeña reducción del carboxilo terminal, la cual debe incluir los principales lugares de autofosforilización en el EGFr.

**I.E.- ESTRUCTURAS DE OTROS RECEPTORES DE
FACTORES DE CRECIMIENTO**

La estructura de otros seis receptores del factor de crecimiento se han conocido desde la clonación del DNAc. Con el propósito de comparar estos receptores presentamos las figuras 5-7.

De estos, las estructuras de los receptores del PDGF [10] y el CSF-1, que aparecen en la figura 5, son los más parecidos a la estructura del EGFr, en términos sobretodo de organización y tamaño. Ellos se diferencian del EGFr en dos aspectos bastante obvios. Estos no tienen regiones ricas en cisteina en la porción extracelular y la región tirosino quinasa es interrumpida por pequeñas secuencias, no produciéndose relación entre estas. Esta interrupción de secuencias es bastante diferente en el receptor del PDGF y la del CSF-1. Sin embargo, hay una cierta semejanza entre las secuencias de estos dos receptores, pareciendo representar a miembros de un receptor familiar.

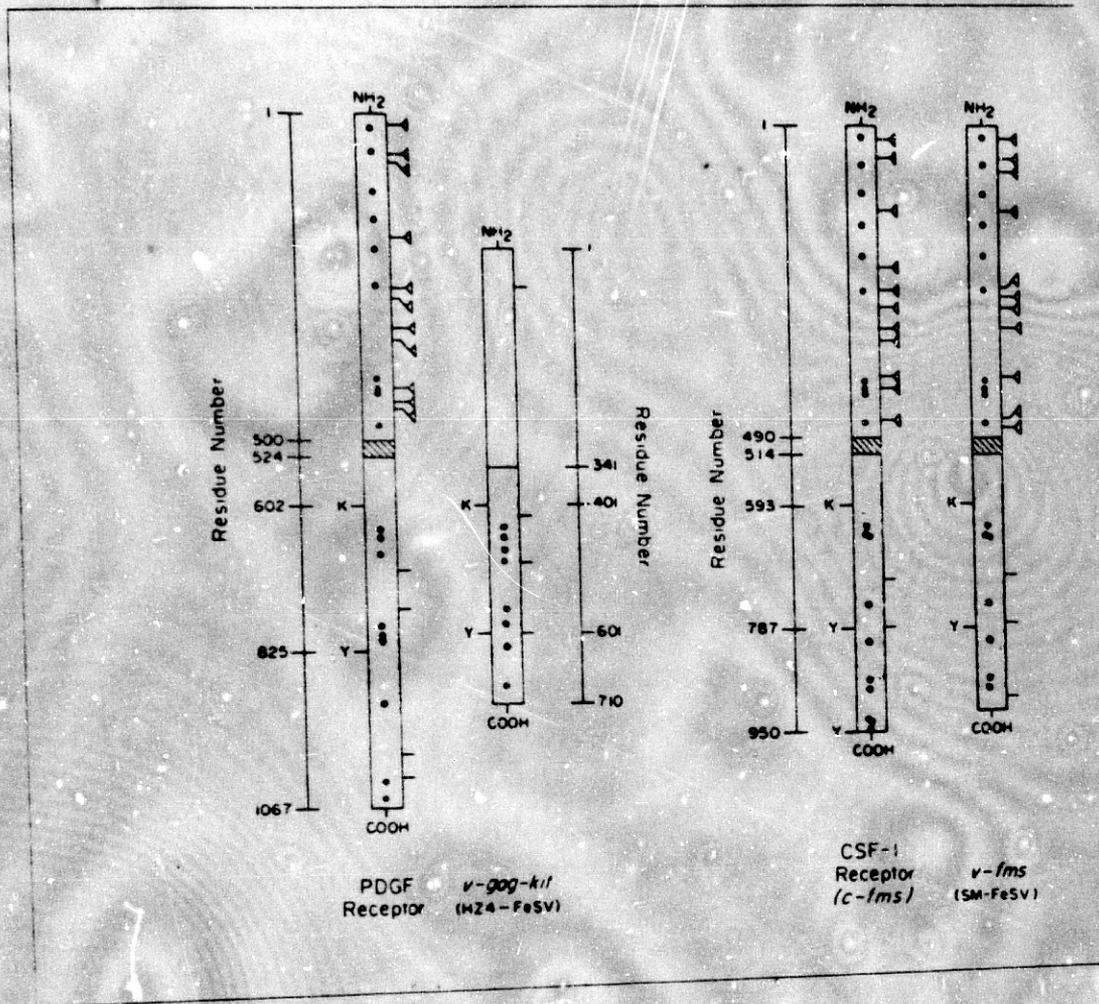


Figura 5. Estructura de los receptores para el PDGF y CSF-1, así como su relación con sus oncogenes productores.

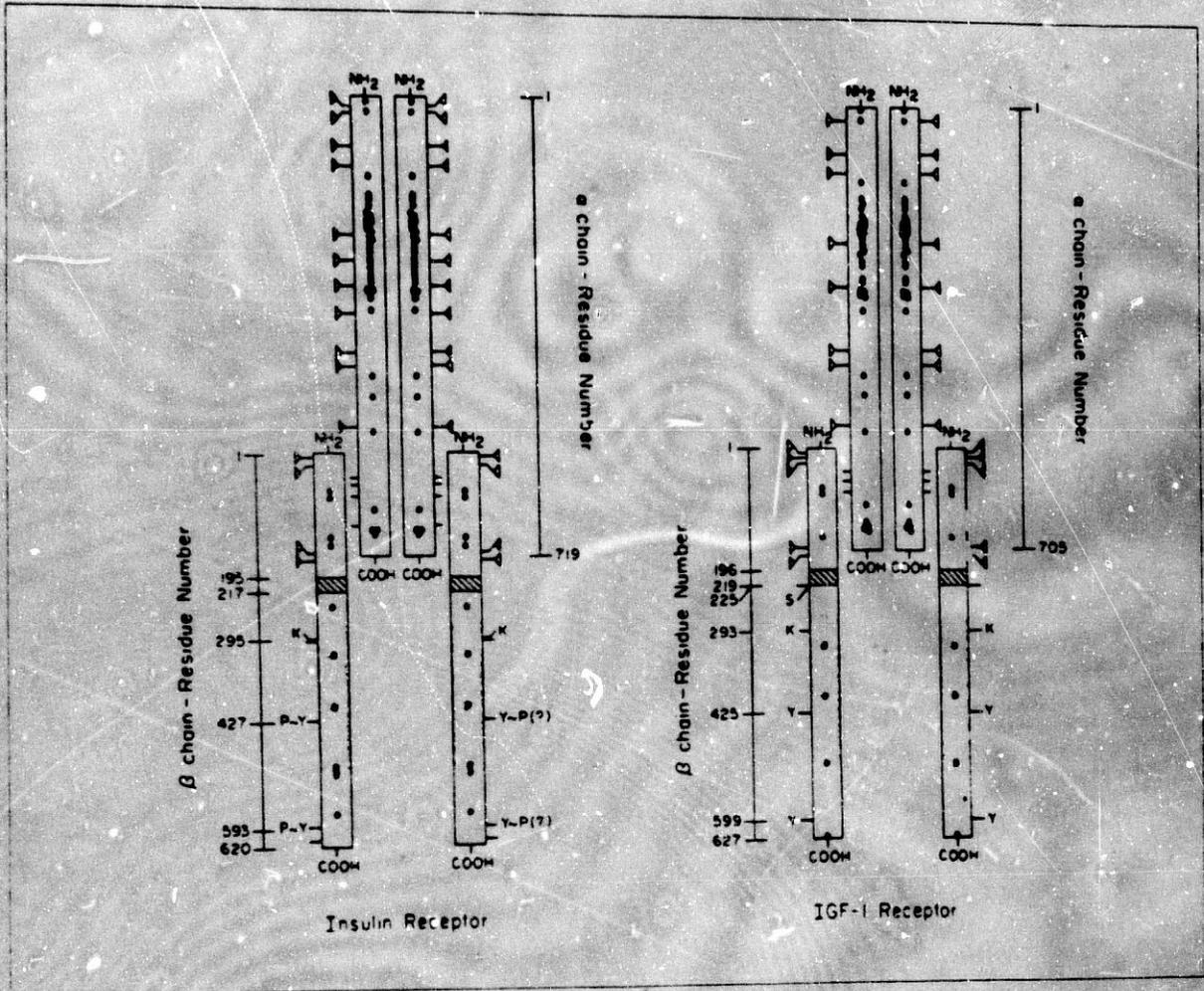


Figura 6. Estructuras para los receptores de la insulina y el IGF-1. Los puentes disulfuro entre cadenas α y α así como entre cadenas β y β no se han señalado en el gráfico.

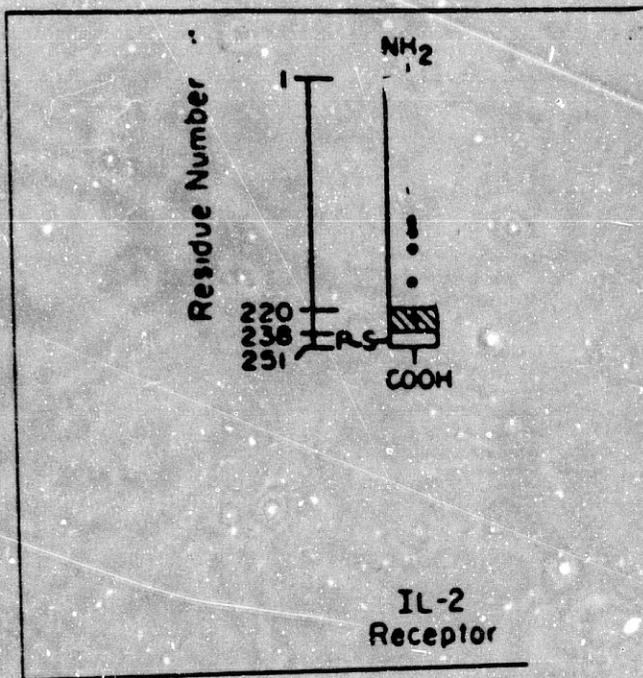


Figura 7. Estructuras de los receptores para el IL-2 y el NGF.

I.F.- FACTORES DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO

I.F.1.- Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento estan estrechamente relacionados con su acción mitogena en células in vitro. Péptidos tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFs) cumplen una función de estimulación sinérgica de las fases del ciclo celular [24].

Las acciones de estos mitógenos es equilibrada por las acciones de los factores de crecimiento que inhiben la proliferación celular, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [25].

Estos factores son:

- Factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I y IGF-II).
- Factor de crecimiento epidermal (EGF).
- Factor de crecimiento transformante α (TGF- α).
- Factor de crecimiento fibroblástico (FGF).
- Factor de crecimiento transformante β (TGF- β).
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Sin embargo, los factores de crecimiento tienen un espectro de acciones biológicas entre las cuales podemos incluir, la regulación morfológica de los tejidos, la diferenciación, movimiento y actividad funcional.

Estudios in vivo sugieren que las acciones no mitógenas pueden ser fisiológicamente dominantes.

Las acciones de los factores de crecimiento se aprecian mejor durante el desarrollo embrionario temprano, cuando el organismo se está organizando y cambiando más rápidamente.

I.F.2.- Factores de crecimiento y la embriogénesis

Las acciones de los factores de crecimiento durante la embriogénesis podemos incluirlas dentro de tres categorías: primeramente, ellos pueden modular la proliferación celular; secundariamente, pueden inducir cambios morfológicos; y finalmente, regulan la diferenciación y la actividad funcional de los tejidos. Estos papeles no son mutuamente excluyentes.

El ectodermo primitivo produce algunos factores de crecimiento los cuales son conocidos por actuar como potentes mitógenos en otros sistemas celulares. Durante la embriogénesis humana la primera diferenciación celular que aparece son los trofoblastos.

Las acciones del FGF y del TGF- β en la proliferación de las células embrionarias es muy parecida, ambos péptidos actúan como agentes inductores durante el desarrollo mesodérmico.

Los cambios más intensos durante la morfogénesis, se producen especialmente en los lugares de interacción con los epitelios adyacentes.

Un papel aparentemente diferente parecen jugar el IGFs y el IGF durante la embriogénesis. Ellos se expresan después de la condensación de los tejidos, y pueden ser responsables de la expansión y posterior diferenciación de la población celular. Los péptidos IGF se han relacionado con el carcinoma embrionario.

El EGF ha sido localizado en fetos humanos en células epiteliales del estómago y duodeno, tubulos renales y glándula pituitaria [26].

I.F.3.- Acciones de los factores de crecimiento en el periodo postnatal

Siguiendo el rápido crecimiento y modelación de los tejidos embrionarios y fetales, vemos como la acción de los factores de crecimiento es aparentemente mitigada durante el crecimiento postnatal y en los tejidos adultos.

Sin embargo, notables excepciones demuestran que las acciones fundamentales de estos péptidos como hormonas autocrinas y paracrinas están aún operativas.

El papel de los factores de crecimiento durante el proceso de curación de una herida ha recibido una considerable atención, y está claro que las células del sistema inmune, destacando los monocitos, así como las plaquetas, almacenan EGF, PDGF y TGF- β , los cuales son liberados en altas concentraciones en el lugar del tejido dañado [27].

Las células intersticiales de la teca del folículo liberan TGF- β [28], la cual produce una pequeña proliferación de la granulosa, al igual que el IGF-I, sinérgicas con la FSH para incrementar el número de receptores para el LH y la génesis esteroidea de la células de la granulosa [29], acciones que son atenuadas por el FGF. TGF- β también incrementa el número de receptores del EGF en las células de la granulosa.

El EGF estimula la proliferación de la granulosa en muchas especies examinadas (excepto en la rata), y esta acción es suprimida por la FSH.

I.F.4.- Crecimiento fetal humano

El crecimiento fetal no es una progresión uniforme de multiplicación celular, sino una serie de procesos anabólicos fundamentalmente distintos que se integran de forma precisa. El desarrollo embrionario temprano muestra ciertas semejanzas con la proliferación de algunos tumores. Los marcadores oncogénicos tumorales se expresan normalmente durante la embriogénesis ordenada [30,31].

El desarrollo anterior a la implantación placentaria comprende una hiperplasia celular rápida según un patrón concreto, que se vuelve aparente al separarse las capas germinales primitivas y poderse identificar por primera vez los presuntos órganos. En ese momento, el metabolismo es anaerobio y las células se comunican por contacto célula-célula y por la liberación de factores autocrinos y paracrinos.

La implantación placentaria permite la respiración aerobia y el desarrollo de sistemas enzimáticos que utilizan la energía necesaria para llevar a cabo una función celular diferenciada.

La aparición de la circulación fetoplacentaria mejora el aporte de nutrientes a los tejidos y, en consecuencia, se eleva la tasa de multiplicación. La placenta actúa también como un órgano endocrino que afecta tanto la fisiología materna como la fetal.

En los humanos, la hiperplasia celular contribuye menos al aumento del tamaño fetal que la hipertrofia celular y el depósito de grasa subcutánea durante la última mitad del embarazo. La maduración funcional de las vías metabólicas en órganos como el hígado, los riñones y el intestino, y la maduración estructural de los pulmones, preparan al feto para la vida extrauterina.

Durante el desarrollo prenatal temprano, el patrón de crecimiento está dictado en gran parte por el genoma fetal, pero al aumentar el tamaño corporal, el feto se ve afectado por influencias maternas y medioambientales como el flujo sanguíneo uterino, el tamaño y las enfermedades maternas. La influencia de estos factores sobre el tamaño en el nacimiento ha sido revisada en otros trabajos [32], así como también la biología placentaria [33] y la morfometría del desarrollo fetal humano [34].

Tanto los genotipos fetales como maternos pueden influir en el peso al nacer. Modelos matemáticos han estimado que los factores genéticos explican el 38% de la variación del peso al nacer y el resto se debe a factores medioambientales, como la fisiología materna [35]. De la contribución genética, el 53% depende del genotipo materno, el 39% del genotipo fetal y el 5% del sexo fetal.

El varón es más grande a término que la mujer, con un promedio de 150 g [34]. La diferencia ligada al sexo relacionada con el peso corporal vuelve aparentemente a las 34 semanas de gestación, es independiente de la multiparidad o de la raza y se mantiene en la desnutrición materna. La menor masa corporal de la mujer se encuentra parcialmente enmascarada al haber más grasa subcutánea [36].

El feto rara vez desarrolla completamente su potencial de crecimiento genéticamente determinado, a causa de la influencia materna. Ello se demuestra claramente por experimentos de trasplante posteriores a una fertilización in vitro en animales domésticos. Al transferir huevos de cerdos talla normal a cerdas enanas se obtienen crías de la mitad de la talla normal de la raza mayor. Por el contrario, al transferir huevos de cerdos enanos a cerdas de talla normal se obtienen crías con talla del doble de lo normal para crías normales [37].

El medio ambiente materno influye o libera el potencial genético fetal de crecimiento. Los pesos de nacimiento reducidos individuales en múltiples embarazos humanos ilustran la influencia materna.

I.F.5.- Control endocrino del crecimiento

La mayoría de las hormonas que regulan postnatalmente la división y maduración celulares, como la hormona del crecimiento (GH), las hormonas tiroideas (TH), la insulina y la prolactina (PRL) no cruzan la placenta en cantidades fisiológicamente importantes.

La placenta es permeable al cortisol, pero éste es predominantemente convertido a una forma biológicamente inactiva, la cortisona, por la 11 β -hidroxidehidrogenasa placentaria. Las influencias endocrinas directas sobre el crecimiento fetal están principalmente circunscritas dentro del feto.

El control endocrino del crecimiento in útero no puede ser determinado por simple extrapolación de mecanismos posnatales.

En primer lugar, los mecanismos de crecimiento no son comparables. El crecimiento fetal implica una hiperplasia celular masiva coordinada con la maduración y diferenciación de órganos y tejidos y, en ciertos casos, la muerte celular programada.

El crecimiento posnatal trae consigo más hipertrofia celular que hiperplasia. Estos diferentes modelos de crecimiento requieren diferencias hormonales, ya que las hormonas de estimulación del crecimiento más importantes en la vida posnatal, la GH y la tiroxina, tienen poca influencia aparente en el crecimiento fetal humano.

La segunda diferencia importante es que in útero existe una inmensa glándula endocrina adicional, la placenta, que duplica muchos de los mecanismos de síntesis hormonal observados en el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. Algunas hormonas placentarias, como el estradiol 17β y la progesterona, son idénticas a los esteroides gonadales, pero otras son producto de gen único no expresados de otra manera.

Así pues, el sincitiotrofoblasto sintetiza un análogo de la hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica, una molécula relacionada con la GH/prolactina, lactógeno placentario (somatotropina coriónica) y un péptido similar a la HET, la tirotropina coriónica [38,39,40]. Si se compara el sincitiotrofoblasto a la hipófisis en relación a la síntesis hormonal, el hipotálamo estaría representado por el citiotrofoblasto. Estas células contienen una hormona liberadora de LH, una hormona liberadora de tirotropina (TRH), un factor liberador de GH y somatostatina, que pueden contribuir a la regulación de la secreción hormonal por el sincitiotrofoblasto [41,42,43].

Hormona del crecimiento (GH)

El papel de la GH hipofisaria en la regulación del desarrollo posnatal ha sido la fuente de una extensa literatura.

La GH humana (hGH) es expresada mediante un gen perteneciente a un grupo de cinco genes relacionados en series sobre una extensión de 55 kb del cromosoma 17 [44,45].

El gen hGH-V no se expresa normalmente en la hipófisis, pero cuando se expresa experimentalmente en células renales de mono transferidas, codifica un péptido GH que posee tanto la actividad biológica somatotrófica como lactogénica [46].

Los péptidos hPL y hGH comparten un 85% de la estructura de aminoácidos homóloga. El hPL trofoblástico es codificado por los genes hPL-A y B, siendo los péptidos traducidos idénticos, mientras que el gen hPL-L no se expresa normalmente en la placenta.

La importancia del grupo del gen GH se encuentra en la posibilidad de que genes normalmente inactivos puedan expresarse en personas en quienes los genes dominantes han sido suprimidos, lo que explicaría por qué los embarazos normales y sin incidentes pueden continuar en ausencia de hGH o hPL detectables.

La GH se encuentra presente en la hipófisis fetal humana como mínimo a partir de las 12 semanas de gestación, y en el segundo trimestre puede alcanzarse niveles circulantes de más de 100 ng/ml, concentraciones que se relacionarían con la acromegalia en la vida adulta [47].

Los niveles de GH disminuyen al final del embarazo, pero siguen siendo más elevados en la sangre del cordón que posteriormente. A pesar de una gran disponibilidad, la GH tiene poca influencia en el desarrollo de los tejidos musculoesqueléticos in útero.

La aplasia hipofisaria y el hipopituitarismo hipotalámico del feto no causan retraso en el crecimiento [48,49].

Control paracrino del crecimiento

Aunque las hormonas potencian el crecimiento, ninguna de ellas es esencial. En cambio, los factores de crecimiento peptídicos se encuentran íntimamente asociados con la diferenciación embriológica temprana y el crecimiento fetal subsiguiente.

No se ha informado de ningún caso de un niño con delección del gen que codifica los péptidos como el SM-C/IGF-I, IGF-II, EGF o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Las células embrionarias carcinomatosas, que son células indiferenciadas derivadas experimentalmente del ectodermo primitivo, expresan estos tipos de péptidos, lo que hace pensar que son indispensables para el desarrollo temprano.

Es evidente que los factores de crecimiento peptídicos no cruzan la placenta de la madre al feto, pero esto ha sido demostrado experimentalmente sólo para los SM-IGFs [50].

Los factores de crecimiento peptídicos son un grupo de mensajeros intracelulares que inducen la diferenciación y la proliferación. A diferencia de las hormonas clásicas, son liberados por muchos tipos celulares distintos y funcionan como señales autocrinas y paracrinas.

La frecuencia de su asociación con proteínas transportadoras aumentan de forma importante su vida media y aporta un potencial para la función endocrina.

En el periodo posnatal, los efectos somatogénicos de la GH estan mediados por el SM/IGF-1 que actúa de manera paracrina-endocrina, mientras que la síntesis de ECF y el factor de crecimiento nervioso (NGF) dependen de la presencia de TH y estan potenciados por la testosterona [51,52].

Se ha postulado, aunque no se ha demostrado, que el EGF y el NGF median los efectos del crecimiento y diferenciación de la TH en los tejidos epidermicos y neurales [53]. Por tanto, después del nacimiento, algunos factores de crecimiento peptídicos pueden actuar como mediadores entre el control endocrino y la capacidad de respuesta celular.

Las respuestas celulares a varios factores de crecimiento peptídicos son similares y comprenden la estimulación del transporte de glucosa y aminoácidos, la síntesis de ARN y de proteínas, y la multiplicación celular. Ello sucede generalmente en presencia de 1-10 Nm de factor de crecimiento in vitro. Aunque parece que los factores de crecimiento como los SM/IGFs, EGF y PDGF, dupliquen la actividad biológica en tipos celulares diferentes, no es así.

El ciclo de proliferación celular incluye la activación de células inactivas o la reintegración de células con divisiones rápidas en la fase G1 cuando aparece la utilización de nutrientes y la síntesis de proteínas. En los fibroblastos, la G1 puede durar de 12 a 24 horas y está seguida por la fase S en la que se produce la síntesis de ADN. El ciclo está completado con por las fases G2 y M durante las que aparece la formación del huso y la división celular. El movimiento inicial hacia la fase G1 incluye la inducción al estado de "competencia". Algunos factores de

crecimiento peptídicos, como el PDGF, se denominan factores de competencia ya que son esenciales para la entrada de la célula en la fase G1. La progresión de la fase G1 a la S durante el crecimiento fibroblástico requiere la presencia específica y dependiente del tiempo del EGF y de los SM/IGFs llamados factores de "progresión". Los papeles complementarios del PDGF, el EGF y los SM/IGFs resultan en una interacción sinérgica *in vitro*, dado que los tres son necesarios para la proliferación celular óptima [24]. En una escala de tiempo más larga, los factores de crecimiento peptídicos pueden también inducir la diferenciación, apareciendo así los tejidos anatómicamente especializados.

Esta dicotomía de las acciones de los factores de crecimiento más estudiados (SM/IGFs, EGF, PDGF, TGF- β y NGF), no niega los posibles efectos de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico, las interleuquinas, el factor de necrosis tumoral y la angiogenina, durante el desarrollo temprano.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipeptido de 53 aminoácidos y un peso molecular de 6 kd, que puede ser detectado en el cerebro, el páncreas, las glándulas de Brunner del duodeno, el yeyuno, la tiroides, la glándula mamaria y el riñón [54]. El EGF normalmente no se encuentra presente en el plasma sino dentro de las plaquetas y es liberado durante la agregación plaquetaria en los sitios de daño tisular [55]. El EGF estimula la mitosis *in vitro* en las células epiteliales, el tejido conjuntivo, las células gliales y las células ováricas de la granulosa [14]. La administración de EGF a la rata o a conejos jóvenes provoca un engrosamiento de la piel y una hiperplasia corneal [16]. Ello se ve acompañado por la estimulación de la síntesis de colágeno y una queratinización, la apertura prematura de los párpados y la erupción dental en el ratón neonato [56].

Otras propiedades biológicas del EGF son el incremento de la proliferación de las células epiteliales a lo largo del tracto digestivo [57] y la capacidad de inducir la resorción ósea [58].

Un análogo estructural del EGF es el factor de crecimiento transformante α (TGF- α). Este péptido tiene un peso molecular de 7.5 kd y presenta un 30-40% de aminoácidos homólogos con el EGF [17]. El TGF- α reproduce todas las propiedades biológicas estudiadas hasta ahora del EGF, y compite por el receptor de membrana para el EGF. Sin embargo, si existe una especificidad de respuesta ya que el TGF- α es un potente agente angiogénico in vitro, mientras que el EGF no lo es [59], y las actividades de resorción ósea del TGF- α son más potentes que las del EGF [60]. El TGF- α es liberado por varias líneas celulares transformadas por virus ARN tumorales [61] y por una gran variedad de tumores humanos [62].

El EGF se encuentra presente muy al principio del desarrollo, ya que los receptores de EGF han sido identificados en las células trofoectodérmicas presentes en las excrecencias de puros blastocitos cultivados in vitro [63]. La unión específica del EGF a tejidos únicamente embrionarios ha sido identificada el día 11 de gestación del ratón, y el número de receptores por unidad de tejido aumenta progresivamente hasta el término. En el feto humano, los receptores para el EGF han sido identificados en el corion, el amnios y la decidua y en grandes cantidades en la placenta [64,65]. Los receptores para el EGF en la placenta se encuentran localizados preferentemente en las microvellosidades de las membranas plasmáticas en contacto con la circulación materna y en las membranas plasmáticas vasolaterales adyacentes a la circulación fetal. La importancia fisiológica de tal distribución no se conoce.

Al ser analizado in vivo, el EGF induce cambios tanto anabólicos como de maduración.

En contraste con estos efectos de diferenciación, el EGF puede evitar la maduración tisular en ciertos tejidos. Esto se observa claramente en la influencia del EGF en el paladar secundario. Estudios de cultivo de tejidos han mostrado que el EGF impide la fusión de los dos procesos palatales que separan completamente las cavidades oral y nasal, evitando la muerte celular programada del epitelio del eje medial del paladar [66]. Parece posible que los cambios ontológicos en la expresión del EGF y péptidos relacionados, o de sus receptores tisulares, contribuyan en muchos aspectos de la diferenciación en el feto.

El control del crecimiento fetal evoluciona debido a una serie de interacciones cambiantes entre las variables materna, placentaria y fetal diseñadas para permitir la expresión más completa posible del genotipo fetal dentro de ciertas limitaciones. La ruptura de cualquiera de estas variables, como la fisiología útero-placentaria o el control metabólico fetal, afectará el crecimiento potencial. Sin embargo, el hipercrecimiento somático fetal es muy poco frecuente, lo que sugiere que el feto crece hasta aproximadamente su tasa óptima.

Los mecanismos de proliferación celular, hipertrofia y diferenciación están coordinados por factores de crecimiento peptídicos y otros mensajeros intercelulares que actúan paracrino o autocrino. La tasa de proliferación celular y la liberación de los factores de crecimiento peptídicos pueden depender de la disponibilidad óptima de metabolitos nutricionales. La insulina es esencial pero muy permisiva en relación al crecimiento fetal y puede actuar predominantemente en el mantenimiento de la incorporación celular de nutrientes y en la oxidación.

La paracrinología fetal puede estar influida hasta cierto grado por las hormonas endocrinas como el hPL.

Factores peptídicos del crecimiento en la leche

La leche contiene células mitógenas que contiene factores de crecimiento peptídicos. Se ha mostrado un interés particular en la posible presencia de EGF debido a las actividades inductoras del crecimiento de este péptido sobre el tracto digestivo [67].

Se ha observado la presencia de EGF en la leche humana y de roedor [68,69,70]. En la leche humana las concentraciones de EGF son más altas en el precalostro y disminuyen al ser sintetizada la leche madura [71]. La glándula mamaria podría ser el sitio de síntesis de EGF, ya que se han localizado grandes cantidades de ARNm en el tejido mamario de ovejas en lactancia [72].

Sin embargo, la extracción de las glándulas salivares en los ratones en periodo de lactancia reduce las concentraciones de EGF, lo cual indica que una síntesis extramamaria también es posible [73].

Otros factores peptídicos de crecimiento identificados en la leche son el péptido parecido al PDGF en el calostro de los rumiantes [74], y el SMC/IGF-I, tanto en la leche humana como bovina [75,76]. Se han descrito interacciones sinérgicas entre los diferentes factores peptídicos de crecimiento en relación a la proliferación de fibroblastos [77].

I.G.- RELACION ENTRE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO CELULAR Y SU MALIGNIDAD

La hipótesis autocrina de Sporn y Todaro, sugiere que uno de los caminos por los cuales una célula tumoral llega a ser autónoma es por la producción de factores de crecimiento para los cuales poseen receptores funcionales.

Como resultado, nosotros podemos ahora percibir al menos tres niveles a través de los cuales una mutación somática predispone a una tumeración [78]:

- Alteración en los factores de crecimiento.
- Alteración de los receptores.
- Alteración en el camino intracelular postreceptor.

Alteraciones cuantitativas y cualitativas en el EGFr han sido implicadas en la génesis tumoral. Un incremento en el número de EGFr ha sido demostrado en carcinomas escamosos [79] y en células tumorales de la glia [80], y en ambos tipos de tumores se ha encontrado un aumento del gen EC (gen c-erb B-2).

En un estudio realizado en el Freeman Hospital de Newcastle, sobre células cancerosas y normales de pulmón, se pudo observar que los tumores tenían una concentración significativamente más alta de receptores para el factor epidermal de crecimiento (EGFr) [81].

Según un estudio realizado en el Instituto de Patología de la Universidad de Heidelberg sobre la expresión del EGFr en tumores benignos y malignos [82], se llega a la siguiente conclusión:

En contraste con el estado normal, la expresión del EGFr es un fenómeno bastante raro en las células de carcinoma de pecho, posiblemente relacionado con una declinación del grado de diferenciación.

No se ha llegado a establecer todavía una relación entre la expresión de los receptores, los niveles de los factores de crecimiento y los procesos tumorales o su factor pronóstico.

1 H.- CICLO CELULAR

La célula durante su período vital, pasa a través de diversas etapas o períodos (G₀, G₁, S, G₂ y M) que forman el Ciclo Celular .

Se sabe que el conjunto de eventos que dan lugar a la división de una célula en dos células hijas se conoce como proliferación celular, y al aumento de masa de esta como crecimiento celular.

Las células que se encuentran en un cultivo de baja densidad con un medio adecuado, se multiplican de forma exponencial, es decir, con un tiempo fijo de duplicación, aunque cada una de estas células se divide al azar.

Las células de los cultivos estacionarios y las diferenciadas de los órganos se encuentran en una fase de ausencia de crecimiento.

El Ciclo Celular está formado por cinco etapas:

- G₀ : Estado de reposo o diferenciación.
Síntesis de RNA y proteínas < degradación.
- G₁ : Estado de crecimiento celular.
Síntesis de RNA y proteínas > degradación.
- S : Síntesis de DNA.
- G₂ : Período entre S y M.
- M : Mitosis.

El ciclo de crecimiento celular se mantiene gracias a la existencia de una serie de fenómenos encadenados. Las diversas fases se acompañan de importantes cambios en la superficie celular.

CICLO CELULAR

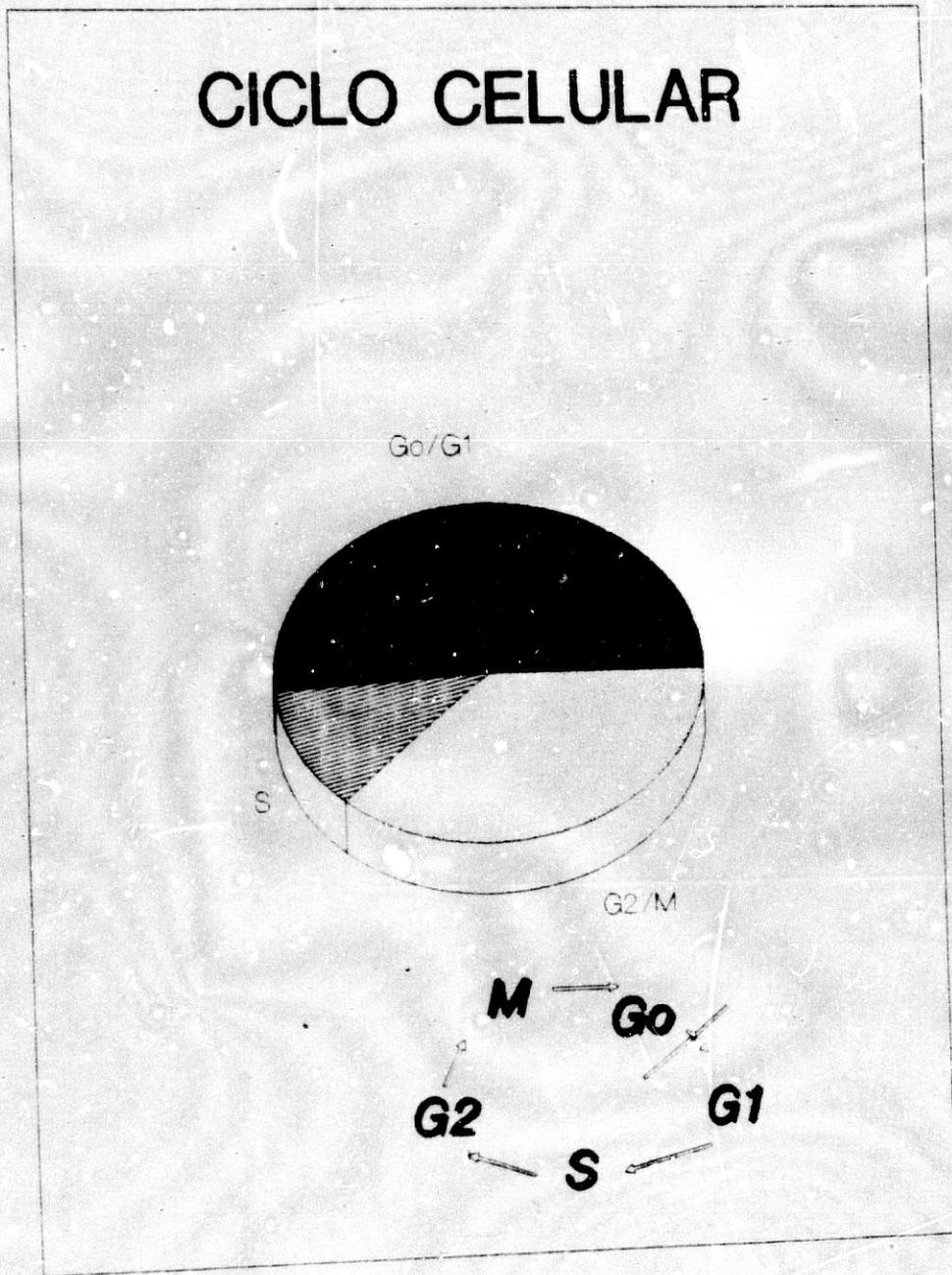


Figura 8 . Representación gráfica del Ciclo Celular.

FASES DEL CICLO CELULAR Y
SUS PUNTOS DE RESTRICCIÓN

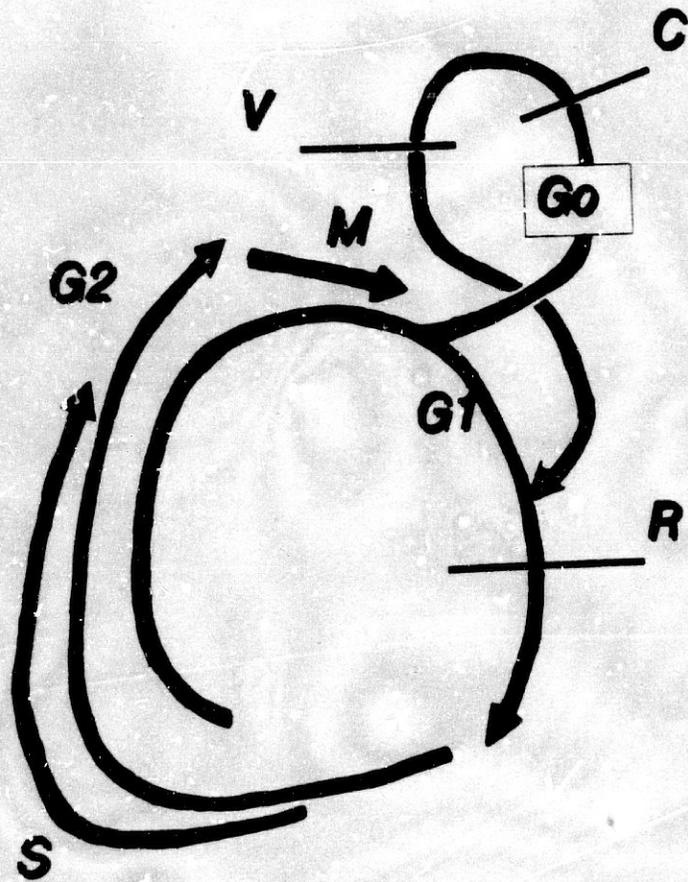


Figura 9 . Fases del Ciclo Celular y sus Puntos de Restricción.

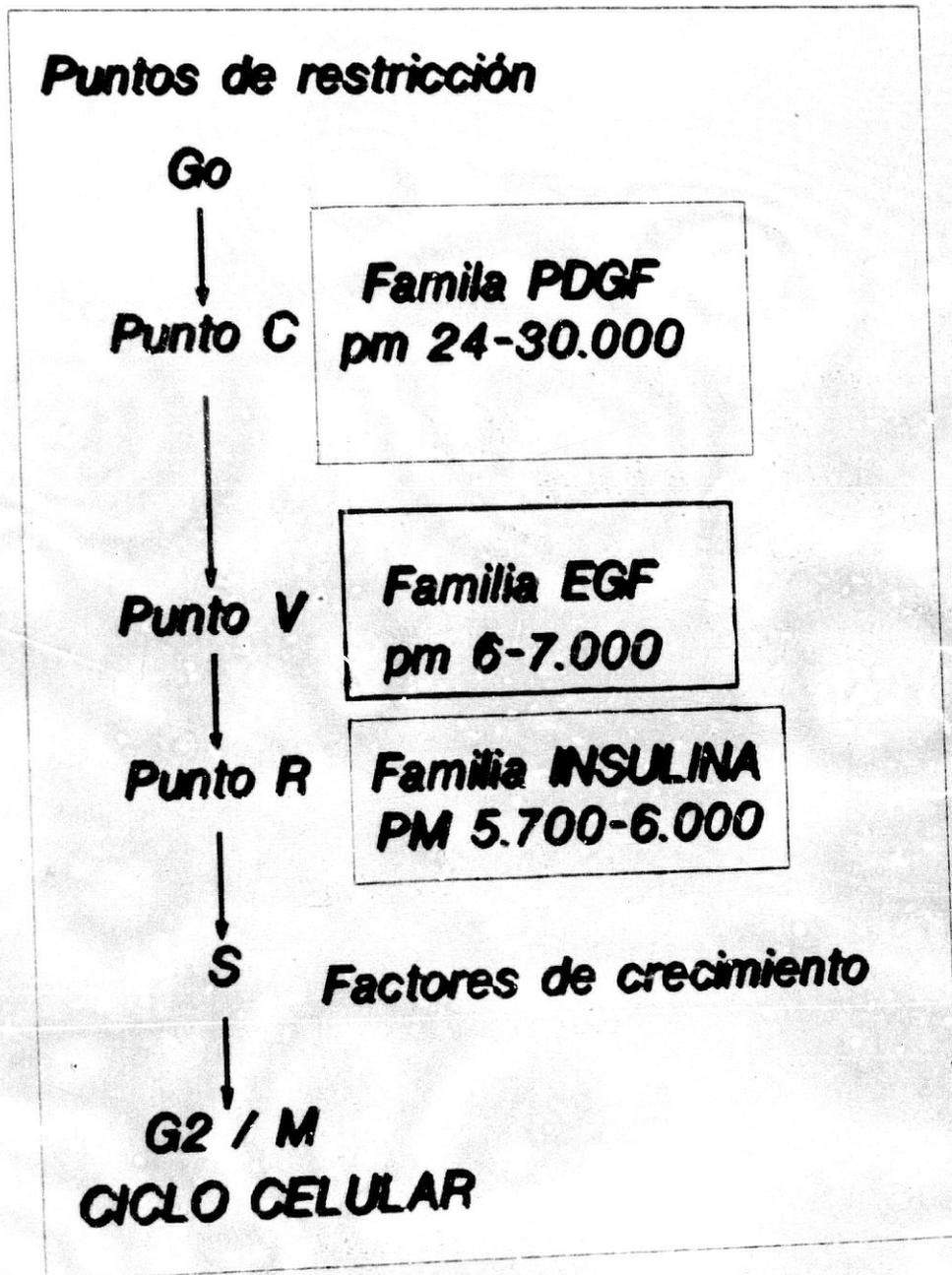


Figura 10 . Puntos de restricción del Ciclo Celular y de los Factores de Crecimiento que actúan sobre ellos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

- I) Estudio de la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) en cortes de biopsias musculares humanas:
 - Musculatura estriada.
 - Musculatura lisa.
 - Musculatura cardíaca.

- II) Expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) en células musculares cultivadas en "Shell-vial".

- III) Modulación de los Receptores del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) en células musculares (humanas) normales y tumorales.

- IV) Modulación de los Receptores del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) en las células cardíacas del embrión de pollo a lo largo del desarrollo.

- V) Relación entre las modificaciones en la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) y sus repercusiones en el Ciclo Celular.

MATERIAL Y METODOS

III.- MATERIAL Y METODOS

III.A.- MATERIAL

III.A.1.- INCUBACION DE LOS HUEVOS

Las experiencias se realizaron en embriones de la especie *Gallus domesticus*, raza Shavers-Star-Cross.

La incubación de los huevos se llevó a cabo a una temperatura constante de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, tras disponer los huevos con el extremo más estrecho hacia abajo y formando un ángulo de 30° con la vertical, para evitar malas posiciones del embrión dentro del huevo.

Durante el período de desarrollo embrionario, los huevos fueron volteados de forma automática cada hora. La humedad relativa fue del 70% a lo largo de la incubación.

III.A.2.- BIOPSIAS MUSCULARES HUMANAS

Las biopsias humanas utilizadas en las experiencias proceden de músculos pectíneo y papilar obtenidas en las intervenciones quirúrgicas cardiovasculares realizadas en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Regional "Virgen de las Nieves" de Granada. Otras biopsias humanas proceden del músculo cuádriceps femoral y vasto externo realizadas en el Servicio de Traumatología del Hospital General de Baza.

III.A.3.- CULTIVOS CELULARES

Las primeras experiencias en cultivos de tejidos fueron realizadas en 1.885 por Wilhem Roux, el cual a partir de técnicas

embriológicas, fue el primero en mantener con vida, fuera del organismo de origen, durante algunos días médula de embrión de pollo en una solución salina a una temperatura cercana a la fisiológica.

A partir de la década de los sesenta empezaron a realizarse diversas manipulaciones en las células que dieron lugar a técnicas como las de fusión celular [83] y como consecuencia de ellas las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales [84], cuya utilización ha proporcionado gran información acerca de los mecanismos básicos del funcionamiento celular, así como del comportamiento antigénico de los diferentes componentes celulares, identificación de la ultraestructura celular y otros muchos aspectos celulares han sido clarificados mediante el uso de anticuerpos monoclonales. La manipulación genética de las células ha permitido el conocimiento de procesos tal como la transcripción o las estructuras de los epítomos, aplicándose dicha manipulación para la obtención de líneas celulares a partir de células normales o la producción de compuestos como pueden ser hormonas humanas o interferón.

La tecnología de cultivos ha llegado a ser en la actualidad de aplicación cotidiana en clínica e investigación sanitaria, así como a nivel industrial.

La tecnología aplicada a los cultivos de células animales "in vitro" intenta reproducir, en lo posible, las condiciones medioambientales en las cuales se desarrollan las células en organismos vivos.

En los organismos vivos no podemos encontrar dos tipos de células, unas que se encuentran libres, en suspensión, en los diferentes fluidos biológicos (sobre todo las células sanguíneas y las que forman parte de los diferentes líquidos secretados por

el organismo), y otro tipo de células que se encuentran adheridas estrechamente unas a otras formando los distintos tejidos del organismo.

Medios de cultivo

Mediante el uso de los medios de cultivo se intenta reproducir las condiciones medio ambientales en que se desarrollan las células de los organismos vivos; los medios de cultivo además de aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento de todas las funciones celulares, contribuye a mantener las constantes físico-químicas del medio ambiente celular "in vitro".

Los primeros medios de cultivo empleados para el cultivo de células de animales fueron diferentes fluidos biológicos naturales, tales como el plasma.

Todas las investigaciones llevadas a cabo en la primera mitad del siglo condujeron a que en 1.948, Fischer describiera el medio V605 considerado como el medio sintético más antiguo.

Los medios de cultivo sintéticos deben de conservar las propiedades físico-químicas de los fluidos biológicos, debiendo poseer un Ph óptimo que está comprendido entre 7.2-7.4 (pH sanguíneo), aunque puede variar según el tipo celular en cultivo entre los valores 7.0 y 7.8 de pH; las variaciones de pH son controladas al llevar los medios de cultivo en su composición un indicador de pH, siendo el más utilizado el rojo fenol que vira de violeta a amarillo al pasar de pH básicos a pH ácidos. Para intentar mantener el pH óptimo, los medios contienen un sistema tampón siendo los más utilizados el bicarbonato y el HEPES.

El ambiente gaseoso donde crecen las células "in vitro" está constituido por una mezcla de anhídrido carbónico (CO_2), oxígeno, nitrógeno y vapor de agua. La concentración de nitrógeno y oxígeno es normalmente igual a la del aire ambiental, por ello la atmósfera regulada en las estufas de cultivo está normalmente constituida por el 5% de CO_2 y el 95% de aire. Cuando se utiliza el tampón bicarbonato, éste debe estar en equilibrio con el porcentaje de CO_2 existente en la atmósfera de cultivo, ya que el CO_2 formado en los medios de cultivo puede escapar de él aumentando el pH del medio, y en caso de que el CO_2 atmosférico se disuelva en el medio o por producción de CO_2 endógeno por las células en cultivo pueden llevar el pH del medio hasta valores más ácidos.

La osmolaridad de los medios de cultivo debe de estar controlada para que las células no sufran daño debido a cambios bruscos de la presión osmótica, por ello los valores de la osmolaridad del medio de cultivo deben estar comprendidos entre 260 miliosmolar/kg y 320 miliosmolar/kg. Para evitar el aumento de la osmolaridad del medio, por aumento de la evaporación del agua, la atmósfera del cultivo debe estar saturada de vapor de agua.

La viscosidad del medio de cultivo está influida principalmente por el contenido de suero, pudiendo tener un pequeño efecto sobre el crecimiento celular sobre todo cuando las células crecen en suspensión; el daño celular debido a una baja viscosidad se puede evitar mediante la introducción en el medio de agentes químicos sintéticos que aumenten la viscosidad.

La temperatura del medio de cultivo debe ser lo más cercana a la corporal del animal de origen, siendo la idónea de $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$; las variaciones de temperatura aparte de influir en el crecimiento celular, puede hacerlo sobre el pH al aumentar la solubilidad del CO_2 cuando baja la temperatura.

La base de la composición de los medios de cultivo es una disolución salina isotónica de diferentes sales inorgánicas, siendo los iones sodio, potasio, magnesio, calcio, cloro, sulfato, fosfato y carbonato los más abundantes, normalmente se reduce la concentración de calcio, cuando el cultivo va a ser en monocapa, ya que el calcio reduce la agregación y adherencia celular en cultivo.

Además de los iones componentes de las disoluciones salinas base de los medios de cultivo, pueden contener pequeñas trazas de minerales. La mayoría de los medios de cultivo llevan glucosa como fuente de energía, generalmente utilizada a una concentración de 1 gramo/litro.

Los medios de cultivo deben tener en su composición una serie de aminoácidos esenciales los cuales no pueden ser sintetizados "in vitro" por las células y que juegan un papel fundamental en el mantenimiento del funcionamiento celular, interviniendo en la síntesis proteica, regulando los sistemas enzimáticos y la síntesis de DNA y RNA; siendo esencial la presencia de glutamina y una serie de doce aminoácidos más para la supervivencia de las células en cultivo.

La mayoría de los medios de cultivo, para prevenir la contaminación bacteriana, suelen llevar una serie de antibióticos en su composición capaces de combatir la posible presencia de microorganismos

Factores de crecimiento

Los constituyentes fundamentales de los medios de cultivo citados anteriormente, dependiendo de las necesidades celulares, pueden ser suplementados por una serie de componentes que enriquecen la composición de los medios de cultivo. Se puede suplementar el medio con diversas sustancias de composición cualitativa y cuantitativa conocida como pueden ser proteínas de transporte como la transferrina, una serie de hormonas siendo la más utilizada la insulina que además de promover la utilización de la glucosa y de aminoácidos, puede tener cierto poder mitógeno en algunas células, la hidrocortisona, progesterona y la hormona de crecimiento también son utilizadas. Pero sobre todo, es importante la utilización de diversos factores de crecimiento y diferentes sueros para suplementar los medios de cultivo.

Los factores de crecimiento son sustancias que participan en todas las etapas de la fisiología celular y tisular, tanto en los procesos de embriogénesis como en la etapa adulta de la vida, participando también en procesos patológicos como el cáncer. Estas sustancias son añadidas a los medios de cultivo para mejorar las características de los cultivos, pues intervienen en los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia por largos períodos de tiempo. Las principales características que definen a un factor de crecimiento son las siguientes:

- La mayoría de su estructura es de naturaleza proteica.
- Al interaccionar con su receptor específico que se encuentra en la membrana plasmática celular forma un complejo factor de crecimiento-receptor específico que desencadena una respuesta celular.

- La célula responde ante el estímulo producido por el complejo factor de crecimiento-receptor específico con una respuesta hipertrófica (aumento del tamaño celular) y/o hiperplásica (aumento de la población celular) o bien induce todos los procesos de diferenciación celular.
- El factor de crecimiento y su receptor específico son eliminados de la superficie de la membrana plasmática celular por un proceso de endocitosis.

Los principales factores de crecimiento que son más utilizados en la actualidad como mitógenos de las células en cultivo, son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF).

La simple presencia de los medios sintéticos básicos descritos anteriormente, no son suficientes para que la mayoría de las células sobrevivan y se desarrollen en cultivo. La mayoría requieren que el medio de cultivo donde se siembran esté suplementado por sueros en cuya composición hay una gran variedad de componentes que van a influir en la funcionalidad celular. La composición del suero es compleja, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, y puede afectar a la morfología celular y a procesos como la capacidad de adherencia a las superficies de cultivo, la capacidad proliferativa, la diferenciación o la transformación celular.

Los sueros utilizados pueden ser de origen animal o humano, siendo el más frecuente el suero bovino fetal (FBS). El porcentaje de suero utilizado varía desde el 2-20% dependiendo del tipo celular. Este porcentaje puede ser disminuido u omitido, sustituyendo el suero por una combinación de hormonas y factores nutricionales a la cual se adaptan algunas células en cultivo.

Evolución de las células en cultivo

La evolución de las células en los cultivos es estudiada en función de dos propiedades fundamentales de las células: su capacidad proliferativa y sus funciones diferenciadas, estas dos propiedades van a evolucionar a lo largo del tiempo de cultivo de una manera muy diversa dependiendo del tipo de célula y de las técnicas de cultivo empleadas.

Las células aisladas de los tejidos por métodos enzimáticos o mecánicos son sembradas en los medios de cultivo obteniéndose los cultivos primarios, en estos se pueden obtener además de las células especializadas del tejido, otras células pertenecientes a otros tejidos como el conectivo o células sanguíneas; la evolución posterior de estos tipos celulares es muy variada, la mayoría tiene una vida media muy corta, como es el caso de la mayoría de células sanguíneas que mueren y desaparecen del cultivo a los dos o tres días. Otras como las células nerviosas pueden permanecer en el cultivo durante meses sin dividirse pero la mayoría de las células conservan en cultivo, en la mayoría de los casos, la capacidad de división que poseen "in vivo". El tiempo que tarda en aparecer esta capacidad proliferativa en cultivo depende del tipo celular y de la edad del tejido del cual se han aislado las células.

Algunas células, sobre todo las embrionarias, tienen la capacidad de dividirse en cultivo y continúan haciéndolo durante algún tiempo, llegando posteriormente a morir después de un período variable de tiempo; pero algunos tipos celulares son capaces de proliferar, pudiéndose estimular esta proliferación con diversos factores de crecimiento, aumentando la población celular hasta que las células llegan a ser confluentes formando una monocapa, en ese momento si las células no son transferidas a un medio fresco con división del número de células existentes en los subcultivos, se inhibe su crecimiento por contacto con otras células cercanas y la población celular comienza a disminuir. Después del primer pase obtenemos los cultivos secundarios, empezando una línea celular que puede seguir creciendo y propagándose por pases sucesivos, obteniéndose cada vez una población más homogénea y que puede dar lugar a una celular finita con un número de generaciones limitada y definida, parándose el crecimiento después de la última generación.

Células Hela

Son células aisladas de un carcinoma de cérvix de una mujer de 31 años por Gey y col. en 1.951 [85]. Se han empleado las células Hela como soporte de nuestras experiencias. Para el mantenimiento en el laboratorio se han empleado las siguientes técnicas:

Criopreservación. Este método parte de cultivos en monocapa cuyas células son despegadas del substrato y se suspenden en medio MEM suplementado con un 20% v/v de suero bovino fetal, previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos (SBFI), y un 10% v/v de dimetilsulfoxido (DMSO). La suspensión se ajusta a una concentración final de cien mil a un millón de células/ml.

Esta suspensión celular se introduce en viales sometiéndose a un enfriamiento progresivo de 1°C/minuto hasta llegar a -170°C en nitrógeno líquido (N₂).

Cuando se requieren estas células se descongelan rápidamente por inmersión en un baño maría a 37°C. Las células se traspasan a contenedores estériles de fondo cónico (Eurotubo) en esterilidad y se centrifugan a 600 g 10 minutos previa adición de 2 volúmenes de medio MEM (20% v/v SBFI).

Esta operación se repite para eliminar el DMSO y finalmente se resuspenden las células en medio MEM con 20% de SBFI en una concentración de 100.000 células/ml. Esta suspensión se vierte en frascos Roux de 25 cm² de superficie y se cultivan a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% de CO₂.

Subcultivos de células Hela. El medio utilizado para el cultivo de células ha sido el MEM 20% v/v SBFI al que se le añade 100 U.I /ml de Penicilina G sódica, 100 µg/ml de Sulfato de Estreptomina y 50 µg/ml de Sulfato de Kanamicina. Este medio se esteriliza por filtración a través de membranas de 0.45 µm de tamaño de poro.

El cultivo se inicia inoculando en un frasco de Roux (Costar) de 25 o 75 cm² de superficie una suspensión de 100.000 células/ml. A estos frascos se adiciona medio de cultivo renovándolo cada 4 días aproximadamente.

La alta capacidad de crecimiento de estas células hace necesaria la realización de subcultivos por tripsinización, para lo cual se retira el medio y se adiciona una solución estéril de EDTA disódico (Merck) al 0.02% en tampón PBS-Tripsina al 0.25% pH 7.2.

Tras un primer lavado con esta solución, se añade nuevamente y se mantiene durante 1 minuto en contacto con la superficie celular. Posteriormente se retira la solución y se comprueba a los 5 minutos, por observación al microscopio invertido de contraste de fase, si las células se han despegado del frasco.

Una vez despegadas se adiciona medio de cultivo y se disgregan muy bien por agitación hasta formar una suspensión homogénea.

Se inoculan 100.000 ó 500.000 por cada frasco de 25 ó 75 cm² respectivamente. Estos se llevan finalmente al incubador de CO₂ a 37°C.

Células de Rabdomiosarcoma (RD)

Esta cepa fue donada a nuestro centro por la Sección de Inmunología de la R.S. "Virgen de las Nieves" de Granada.

El cultivo se inició inoculando en un frasco Roux (Costar) de 25 ó 75 cm² de superficie una suspensión de 100.000 ó 500.000 células/ml. A estos frascos se adiciona medio MEM con 20% de SBF1 y se cultivan a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% de CO₂. El medio se renueva cada 5-7 días aproximadamente.

III.A.4.- INSTRUMENTACION

Los cortes de las biopsias se realizaron en un criostato para cortes en congelación (BRIGHT 5020 ROTATORY RETRACTINE MICROTOME AND REMOTE CONTROLS).

La incubación de los huevos se realizó en dos incubadoras con volteo automático y ventilación marca Masalles typ.-0675, con capacidad para 90 huevos cada una.

Las pesadas se hicieron en una balanza Mettler AJ-100. Para las medidas de pH se utilizó un phmetro Crison micropH 2.000 ($\text{pH} \pm 0,0004$).

Para la agitación de los tubos se empleó un vibrador Heidolph Reax-2.000, la agitación de los distintos reactivos se realizó mediante un balanceador Adams Modelo-1106 y un Magneto Agitador A-06 SBS.

Las centrifugaciones se realizaron mediante centrifuga Labofuge Ae de Heraeus para bajas velocidades utilizadas en las técnicas de cultivos celulares.

La esterilización de material no fungible se realizó mediante autoclave CERTO clav. Typ. CV II/1.600 y el material fungible no desechable se esterilizó en un pupitre de esterilización por rayos ultravioletas Selecta 415. La esterilización de las soluciones utilizadas en los cultivos celulares se llevó a cabo mediante filtración con filtros de Millipore.

El material plástico utilizado para los cultivos celulares fueron suministrados por las casas comerciales Greine, Nuclon Nunc e Inter Med.

Para la aclimatación de todas las soluciones a las temperaturas adecuadas para las distintas técnicas de cultivo celulares se utilizó baño termostato Selecta TECTRON S-473.100.

Todas las manipulaciones que requerían condiciones de esterilidad fueron realizadas en cabina de flujo laminar CAPTAIR tipo 2005-HPS.

Las incubaciones de los cultivos se realizó en estufa de cultivos celulares Heraeus modelo 5060 EK/O2 suministrandole los gases a partir de balas de O₂ (OXIMESA) y CO (Sociedad Española de Oxígeno S.A.).

La conservación de los reactivos y muestras biológicas a bajas temperaturas se realizó en frigorífico congelador (Miele).

La observación microscópica se realizó mediante lupa PZO modelo 17318, microscopio Leitz Wetz Lar. Germany 585039, microscopios de contraste de fase invertido BAUSCH & LOMB modelo PhotoZoom y Nikon modelo DIAPHOT-TMD; para la observación de las preparaciones tratadas con técnicas de inmunofluorescencia se utilizaron microscopio de fluorescencia Nikon modelo LABOPHOT y microscopio de contraste de fase invertido Nikon modelo DIAPHOT-TMD.

Para la impresión en películas fotográficas de las observaciones microscópicas mediante el instrumental mencionado anteriormente, se utilizaron cámaras de fotografía Pentax P50, Nikon FX-35WA y Nikon MF-20.

Los tejidos y células (a menos que se indique lo contrario) se homogeneizaron en un "Potter" manual.

La determinaciones colorimétricas se hicieron en un fotocolorímetro Perkin-Elmer 35 Spectrophotometer.

FACSCAN. Para la realización de estos estudios estamos utilizando el modelo de citometría de flujo FACSCAN, de la compañía Becton-Dickinson, que como su propio nombre indica (FACS) (Fluorescence Activated Cell Sorter), consiste en el análisis de células basándonos en sus fluorescencias y propiedades de dispersión de la luz. Para ello las células en estudio, interceptan individualmente un rayo de luz (rayo láser) por medio del cual se obtienen dos parámetros fundamentales que analiza el citómetro de flujo:

- Medida de la luz láser dispersada.
- Medida de la fluorescencia mediante la excitación de un fluorocromo por la luz del láser.

Estos datos obtenidos son detectados y amplificados, originándose unos "pulsos de voltaje" que son analizados por una computadora y posteriormente se expresan en forma de gráficos que nos permiten clasificar las muestras celulares en estudio.

El FACSCAN consiste en cuatro subunidades básicas:

- 1) Un sistema de Fluido que transporta las células desde el tubo de la muestra hacia la región sensora.
- 2) Un sistema óptico que genera y recoge los pulsos de luz derivados de la célula a analizar.
- 3) Un sistema electrónico que amplifica y digitaliza las señales detectadas.
- 4) Una base de datos donde se recogen los pulsos electrónicos y se transforman en números y gráficos.

III.A.5.- REACTIVOS

Para la conservación de las biopsias intraoperatoria antes de su congelación se utilizó O.C.T. 4583 (Mile Scientific).

Todas la soluciones enzimáticas proteolíticas utilizadas en los procesos de disgregación tisular fueron de Sigma; el tampón de fosfatos (PBS) utilizado como base de todas las disoluciones utilizadas en los cultivos celulares, la base de los medios de cultivo (salvo la base del medio MEM (Gibco)) y el suero fetal de ternera fueron suministrados por Flow Laboratories. Los factores de crecimiento fueron administrados por Sigma.

El azul trypan utilizado en las tinciones vitales de las células, el anticuerpos monoclonal frente al receptor del factor de crecimiento epidermal y los reactivos utilizados en las inmunofluorescencias, fueron adquiridos de Sigma.

Los fármacos fueron suministrados por el Servicio de Farmacia del Hospital General de Baza.

III.B.- METODOS

III.B.1.- PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS MUSCULARES

La multitud de compuestos químicos (bioquímicos) que constituyen el substrato biológico de las diferentes estructuras celulares y tisulares, que son el objetivo para su demostración por medio de técnicas inmunohistoquímicas, nos obliga, con vistas a asegurar el éxito de estas últimas, a plantearnos, en cada caso, las condiciones óptimas de tratamiento de las muestras celulares y/o tisulares para preservar al máximo tanto la distribución como la estructura de dicho substrato.

Congelacion:

- Congelar la pieza en Nitrógeno líquido o en Metilbutano previamente enfriado en nitrógeno líquido (puede ser válido cualquier método de congelación instantánea. Ej. O.C.T.).
- De no procederse a cortar inmediatamente los bloques congelados, se pueden almacenar siempre impidiendo su desecación, en N₂ líquido o en congelados a -70°C.
- Las piezas congeladas se cortan en criostato (criomicrotomo), con un grosor de 5-8 μ .
- El corte una vez efectuado, se deseca en corriente de aire, durante 30 minutos o una hora, lo que facilita su adherencia al portaobjetos.
- Fijar los cortes durante 5-10 minutos en acetona a 4°C, volviendo a desecarlos de nuevo durante 15-30 minutos. En ocasiones este paso de fijación se omite si desconocemos el efecto que puede tener sobre la estructura que queremos demostrar.
- En estos momentos las preparaciones histológicas están listas para la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas.

De no realizarlas en este momento, se procede a conservar los cortes, envolviendo cuidadosamente los portaobjetos en papel de aluminio y manteniéndolos a -20°C hasta su utilización.

Antes de procesar un corte que haya sido almacenado en estas condiciones, dejaremos que alcance la temperatura ambiente sin desprotegerlo de la lámina de papel de aluminio.

III.B.2.- TECNICA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN CORTES MUSCULARES

Se procede a lavar el corte muscular con PBS durante 10 minutos. Añadimos 30 μ l de anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) a la dilución 1/1.000 e incubamos 45 minutos en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se lava con PBS 4 veces y añadimos 30 μ l del segundo anticuerpo Anti-Mouse Ig G (Whole molecular)-FITC Conjugate (Sigma), a la dilución de 1/100 e incubamos en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente durante 45 minutos y se lava 2 veces con PBS durante 5 minutos.

Una vez finalizados los lavados con PBS, se dejan secar y se añade una gota de glicerina tamponada previamente con carbonatos hasat un pH 8, y se coloca el cubreobjetos y se presiona ligeramente para que no queden burbujas de aire. A continuación se procede a su observación mediante microscopio de fluorescencia.

III.B.3.- CULTIVOS CELULARES

III.B.3.1.- Cultivos de células cardíacas procedentes de embriones de pollos.

Aislamiento de células miocardiocíticas.

Obtención del embrión

Los huevos fértiles fueron incubados a diferentes períodos de tiempo, obteniéndose un intervalo de desarrollo embrionario que abarca los estadios XV - XL de Hamburger-Hamilton (H.H.) [86]. Una vez que los huevos fértiles han alcanzado el estadio H.H. deseado, se procede a la localización del embrión por transiluminación en un ovoscopio, marcándose con un círculo dibujado en la cáscara y el huevo podrá ser trasladado con el embrión localizado.

La cáscara de los huevos son limpiadas con alcohol etílico de 70°C y tras depositar el huevo sobre una placa de Petri (60/15 de diámetro, Greiner) amortiguada con algodón, en condiciones estériles y con la ayuda de aguja enmangada, microsegueta y pinzas vanas, abrimos una ventana en la cáscara del huevo en la zona donde estaba localizado el embrión. A continuación procedemos a retirar las membranas extraembrionarias.

Posteriormente con la ayuda de pinzas y tijeras el embrión es extraído del huevo y depositado en una placa Petri estéril con 10 ml de PBS a 37°C (todas las soluciones utilizadas en las técnicas de cultivos celulares, al ponerse en contacto con las células se encuentran a una temperatura de 37°C)

Extracción del corazón

En los estadios tempranos del desarrollo embrionario la localización del corazón es extracorporea, siendo fácil su extracción con la ayuda de unas pinzas de disección de puntas rectas.

Cuando el desarrollo embrionario es más avanzado, el corazón se encuentra en el interior del embrión, siendo necesario diseccionar el embrión para extraer el corazón.

Los corazones son extraídos siguiendo los planos de corte, uno a nivel del tronco arterial y otro a nivel del seno venoso en aurícula; previamente al corte, fueron perfundidos con PBS para eliminar en lo posible las células sanguíneas. Una vez aislados los corazones se depositaron en una placa de Petri estéril que contenía 2 ml de PBS.

Disgregación del tejido cardíaco embrionario y aislamiento celular

Método físico

Los tejidos cardíacos embrionarios fueron disgregados mecánicamente basándose en la técnica descrita por ZAROFF y col. 1.961 [87] y utilizando las modificaciones a esta técnica introducidas por nosotros [88].

Los corazones embrionarios extraídos son colocados en una placa de Petri estéril con 2 ml de PBS. A continuación se procedió a la disgregación mecánica mediante tijeras y pinzas, reduciendo el tejido cardíaco a pequeños trozos de aproximadamente 2-3 mm de lado. se lavaron 5 veces con PBS en tubo universal (1.000 rpm durante 5 minutos), desechando el sobrenadante de las centrifugaciones, con objeto de retirar los restos sanguíneos de los tejidos. Posteriormente a la pequeñas piezas de tejido se le añade 3 ml de PBS y la suspensión de tejido se hace pasar 100 veces por jeringa con agujas de 0.8 mm de diámetro y seguidamente por otra jeringa con aguja de 0.36 mm de diámetro, con el fin de lograr la disgregación de las células del tejido por rozamiento, continuándose esta operación hasta que no observemos ningún resto de tejido en la suspensión en PBS.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 3.000 rpm por minuto durante 10 minutos en una centrifuga Heraeus Labofuge Ae. Tras la centrifugación, en el botón se obtiene una capa inferior de color rojizo que contiene los restos de tejidos, células sanguíneas y algunos miocardiocitos, y una capa superior blanquecina donde predominan los miocardiocitos; se extrajo la capa superior mediante una pipeta pasteur y las células fueron suspendidas en el medio de cultivo.

Métodos químicos

Técnica de tripsina a 37°C

Los corazones embrionarios una vez troceados y lavados varias veces con PBS, fueron disgregados en una solución enzimática de tripsina, basándonos en la técnica descrita por MOSCONA [89,90].

La solución enzimática contiene tripsina al 0,025 % en PBS libre de iones calcio y magnesio [91,92], los trozos de tejido son introducidos en dicha solución enzimática que se encuentra a 37°C y en agitación continua durante una hora.

Posteriormente se añaden 2 ml de medio de cultivo con el 20% de suero fetal de ternera y se procede a recoger las células mediante centrifugación diferencial, retirándose en primer lugar los restos de tejidos y posteriormente recogiendo las células en suspensión (1.500 rpm durante 5 minutos).

Técnica de tripsina a 4°C

El tejido cardíaco embrionario una vez troceado en pequeñas piezas 2-3 mm de lado y lavado para eliminar los restos sanguíneos, fue disgregado para su posterior cultivo usando el método descrito por COLE y PAUL [93], con algunas modificaciones.

Una vez lavadas las pequeñas piezas de tejido se retira el último sobrenadante y se pesa la última cantidad de tejido obtenido, añadiéndose a continuación por cada 100 mg de tejido 1 ml de solución de tripsina (0,5 g/l) en PBS libre de iones calcio y magnesio, y suplementada con EDTA (0,2 g/l) [94].

La digestión enzimática del tejido se produjo durante un período de tiempo de 18 horas a 4°C, posteriormente es retirada la tripsina y el tejido con el residuo de tripsina fue incubado durante 30 minutos a 36,5°C.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión enzimática a 36,5°C se añade 1 ml de medio de cultivo DMEM adicionado con el 20% de suero fetal de ternera, por cada 100 mg de tejido digerido, y mediante una pipeta pasteur pipeteando suavemente y expulsando la suspensión de tejido con suavidad, se repite el proceso hasta la total disgregación del tejido.

Tras dejar que se depositen en el tubo los retos de tejido que hayan quedado sin disgregar, se recoge con una pipeta pasteur la suspensión celular y se deposita en un tubo universal estéril, estando lista para su utilización (cultivo).

Determinación de la densidad celular

Las suspensiones celulares obtenidas tras la disgregación de los tejidos, se procedió a la determinación de la densidad de la población celular existente mediante un hemocitómetro (Brand) y con la ayuda de azul trypan (Sigma) como colorante vital, para distinguir las células vivas de las muertas [95].

La suspensión celular antes de ser introducida en el hemocitómetro, ha sido previamente diluida a un 1/2 con solución de azul trypan (0.1 % (p/v)), y tras agitación se añaden 2 gotas con ayuda de una pipeta pasteur en el hemocitómetro, precediéndose posteriormente al contaje del número de células con ayuda del microscopio invertido con un ocular de 10X y un objetivo de 10X.

El recuento celular se lleva a cabo en los cuadros grandes del hemocitómetro, haciéndose la medida de 10 contajes (medidas) y posteriormente se determina la concentración celular [96].

La concentración celular (c.c.) referida al número de células/ml. se realizó utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$c.c = n \times 10^5 \times d$$

n = número de células contadas

d = dilución realizada con la solución colorante

Mediante diluciones o concentraciones de la suspensión celular en los medios de cultivo, se obtiene la densidad celular deseada para su puesta en cultivo.

Medios de cultivo

Preparación de los medios de cultivo

La base de los medios de cultivo utilizados (MEM, DMEM y RPMI-1640) fue disuelta en PBS, posteriormente, una vez disueltos, fueron suplementados con HEPES (ácido N-2-hidroxiethyl piperazina-N'-2-etanosulfónico) (Sigma) (20 mM), bicarbonato sódico (8.92 mM), glutamina (4 mM), bencilpenicilina (100 UI/ml), gentamicina (40 µg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml).

La contaminación, sobre todo de fibroblastos, fue evitada por la adición de 10 µM de citosina-B-D-arabinofuranósido en los días 1 y 3 de cultivo [97,98].

La capacidad de crecimiento celular en cada medio de cultivo, fue valorada mediante la siembra de cultivos primarios y secundarios, observándose mediante recuento la evolución de la población celular al cabo de 28 días de cultivo.

Factores de crecimiento

Los medios de cultivo, generalmente, fueron suplementados con diferentes proporciones de suero fetal de ternera y en algunas experiencias con diferentes factores de crecimiento, aislados a una concentración determinada o medios de cultivo en donde se ha cultivado células de líneas celulares establecidas, añadidos a una dilución determinada con el medio de cultivo de nuestras células. Las concentraciones de los factores de crecimiento y las diluciones de los sobrenadantes de cultivos celulares fueron los siguientes:

Factor de crecimiento	Concentración
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	10^{-7} y 10^{-8} (p/v)
Fitohemaglutinina	6 μ l/ml y 8 μ l/ml
Transferrina	10^{-6} y 10^{-7} (p/v)
Insulina	0,2 UI/ml y 2UI/ml

El efecto de los diferentes factores de crecimiento y de los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados sobre la proliferación celular en los diferentes pocillos de cultivo al cabo de los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo.

Condiciones medioambientales de los cultivos celulares

Las células una vez aisladas y suspendidas en los medios de cultivo, son depositadas en las placas de pocillos o en los frascos de cultivo (falcon) de 50 ml y son incubados en la estufa de cultivo a una temperatura ambiental de 37°C, 80% de humedad relativa y el 5% de CO₂.

Mantenimiento del cultivo

Cambio del medio de cultivo

El medio de cultivo generalmente es cambiado cada 3 días, cuando se observa un viraje de color del medio de cultivo (desde rojo a anaranjado), dependiendo de la periodicidad del cambio, de la proliferación y de la densidad celular.

En el caso de las células que crecen adheridas el cambio del medio de cultivo se efectuó por simple retirada del medio de cultivo y adición del medio fresco.

Propagación de los cultivos celulares

Cuando el número de células en los frascos de cultivo es muy elevado, las células están adheridas cubriendo toda la superficie de cultivo y disminuyen su crecimiento celular, siendo necesario la transferencia de población celular a distintos frascos de cultivo. Para la división de la población celular a distintos subcultivos celulares, en primer lugar procedemos a desprender

las células adheridas de las superficies de cultivo mediante solución de tripsina (0.25 (p/v)) en PBS.

Una vez desechado el medio de cultivo, añadimos 1 ml de tripsina al frasco de cultivo (50 ml) y lavamos las células adheridas a la superficie, repetimos la operación una vez más y a continuación añadimos 1 ml de nueva tripsina, precediéndose a balancear el frasco de cultivo levemente para que la tripsina llegue a toda la superficie de cultivo durante 1 minuto.

Posteriormente desechamos la solución de tripsina y añadimos 2 ml de medio de cultivo con el 20 % de suero fetal de ternera, repitiéndose un proceso de succión-expulsión con pipeta pasteur sobre la superficie de cultivo durante 30 veces, obteniéndose las células suspendidas en el medio de cultivo.

Una vez que las células están suspendidas, se hace un recuento de la población y se diluyen en medio fresco, repartiéndose en nuevos frascos de cultivo .

Cultivo celular en "shell-vial"

Las células en cultivo fueron sembradas en tubos de "shell-vial" (Soria Melguizo, S.A), los cuales llevan en su fondo un cristal cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro. Se añade en cada tubo 2 ml de suspensión celular a una concentración de 200.000 células/ml.

Los tubos de "shell-vial" sembrados se mantienen en la estufa de cultivo, hasta que las células se adhieren y forman monocapa. en dicho momento son utilizadas para la inmunofluorescencia [99].

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

En primer lugar se retira el medio de cultivo de los "shell-vial" y se lava 3 veces con 1 ml de PBS; a continuación se añade 2 ml de metanol y se mantiene en el tubo durante 10 minutos. Posteriormente se realizan 3 lavados con PBS y se extrae el cubreobjetos pinchando en el fondo del "shell-vial" con una aguja enmangada y caliente.

Los cubreobjetos obtenidos son adheridos por la cara contraria a donde están las células, a un portaobjetos con la ayuda de una gota de DPX (Aldrich Chemical), comprimiendo ligeramente con unas pinzas para evitar la presencia de burbujas de aire.

Una vez preparados los cubreobjetos con las células, se añaden 30 μ l del anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Sigma Chemical) a la dilución 1/100 y se incuba en cámara húmeda a 37°C durante 15 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación se lava con PBS 2 veces y añadimos 30 μ l del segundo anticuerpo Anti-Mouse Ig G (mole molecular)-FITC Conjugate (Sigma), a la dilución 1/20 e incubamos en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos y se lava 2 veces con PBS durante 5 minutos.

Una vez finalizados los lavados con PBS, se dejan secar y se añade una gota de glicerina tamponada previamente con carbonatos hasat con un pH de 8, se coloca el cubreobjetos y se presiona ligeramente para que no queden burbujas de aire. A continuación se procede a su observación mediante microscopio de fluorescencia.

III.B.3.2.- CULTIVOS DE CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS
PROCEDENTES DE BIOPSIAS QUIRURGICAS

Extracción de las células musculares esqueléticas

El tejido muscular es aislado a partir de biopsias musculares obtenidas mediante intervención quirúrgica, y transportada en frasco estéril, suspendidas en PBS hasta la cámara de flujo laminar.

La biopsia es introducida en un contenedor estéril y suspendida en una mezcla antibiótica (Amikacina 1 mg/ml, Anfotericina B 100 µg/ml y Vancomicina 50 mg/ml) a una proporción de 200 µl de muestra antibiótica por cada 1 ml de muestra (biopsia suspendida en PBS); manteniéndose a 37°C durante 30 minutos.

Una vez transcurridos los 30 minutos de suspensión de la biopsia en la mezcla antibiótica, la biopsia es extraída con ayuda de unas pinzas e introducida en una placa de Petri estéril de 60/15, a la cual añadimos 5 ml de PBS y con la ayuda de pinzas y tijeras se limpia de los restos grasos; a continuación se trozea en pequeñas piezas de 2-4 mm de lado.

Los fragmentos musculares son introducidos en un contenedor estéril al cual añadimos 10 ml de PBS y lavamos para retirar los restos sanguíneos, centrifugando a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, repitiéndose la operación 5 veces. A continuación se retira el sobrenadante de la última centrifugación, se pesa el tejido y tenemos preparados los fragmentos musculares para añadirle la solución enzimática.

Disgregación del tejido muscular humano

**Disgregación del tejido mediante solución
enzimática a 37°C**

Los fragmentos musculares fueron introducidos en una solución enzimática que contenía colagenasa 1 mg/ml, elastasa 0,5 mg/ml en PBS libre de calcio y magnesio a 37°C y con agitación continua (mediante un agitador magnético), durante 1 hora, se recoge el sobrenadante y los restos de tejido se vuelven a incubar en solución enzimática durante 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación en la solución enzimática, la suspensión celular obtenida por la digestión enzimática con agitación, en dos ciclos de 30 minutos recogiéndose mediante centrifugación las células aisladas en cada ciclo de digestión enzimática de tejido.

**Disgregación del tejido mediante solución
enzimática a 4°C**

Una vez retirado el sobrenadante de la última centrifugación de lavado, se añade la solución enzimática compuesta por tripsina al 0,05%, EDTA 0,2 g/l y colagenasa 1 mg/ml en PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++} , a unas concentraciones enzimáticas utilizadas por otros autores [100-103]. Se añade la mezcla enzimática a la proporción de 1 ml de mezcla enzimática por cada 100 mg de tejido y se mantiene durante 18 horas a 4°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación enzimática a 4°C. se retira el sobrenadante y el tejido muscular con el resto de solución enzimática que permanece se incuba a 37°C durante 30 minutos: a continuación se añade 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con el 20% de suero fetal de ternera, se pipetea con una pipeta pasteur (succión-expulsión) 30 veces el tejido y se vuelve a recoger el sobrenadante, conservándose a 4°C. Se repite la operación de disgregación con tripsina-EDTA de los restos de tejido 3 veces.

Las células de los diferentes sobrenadantes obtenidos son recogidas mediante centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos.

III.B.4.- CULTIVO DE CELULAS DE RABDOMIOSARCOMA (RD) SOMETIDAS A DIVERSOS FACTORES

Las células R.D se encuentran en un frasco de cultivo (falcon) de 50 ml con medio DMEM. Se retira el medio del falcon, se le añade PBS-EDTA (poca cantidad, lo suficiente como para cubrir la superficie) y se coloca en la estufa de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se agita ligeramente y se observa al microscopio invertido para comprobar que las células se han despegado del falcon. Se añade PBS y se agita, posteriormente lo extraemos y se pone en un universal. Centrifugamos a 1.000 - 1.500 r.p.m. durante 5 minutos. Se tira el sobrenadante y se le añade 1 ml de PBS para contarlas en la cámara de Neubauer.

Las células suspendidas en DMEM más un 10% de SBF1, son depositadas en 5 pocillos de una placa de microtitulación, poniendo 2.500 células en cada pocillo.

Una vez en el pocillo se dejan 24 horas en estufa de cultivo a una temperatura de 37°C, 80% de humedad relativa y el 5% de CO₂ para que se fijen en el falcon.

Posteriormente se añaden diversos factores a cada pocillo:

- 1) Al pocillo número 1 al DMEM más el 10% de SBF1 le añadimos anticuerpo monoclonal frente al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF). A una concentración de 10 µl de EGF al 1/100 por cada ml de DMEM+SBF1.
- 2) Al pocillo número 2 al DMEM más el 10% de SBF1 (suero bovino fetal inactivado) le añadimos Insulina, a una concentración de 10 µl de Insulatard al 1/1.000 por cada ml de medio (DMEM+SBF1).
- 3) Al pocillo número 3 al DMEM más el 10% de SBF1 le añadimos Fitohemaglutinina, a una concentración de 100 µl de FTH por cada 10 ml de medio (DMEM+SBF1).
- 4) Al pocillo número 4 al DMEM más el 10% de SBF1 le añadimos Gamma-Interferón, a una concentración de 400 U de Gamma-Interferón por cada 10 ml de medio (DMEM+SBF1).
- 5) Al pocillo número 5 se pone el DMEM más el 10% de SBF1, y no se le añade ningún factor.

Estos medios se van renovando cada 4-5 días, pero siempre se le pone a cada pocillo su medio correspondiente. Las células se mantienen en estufa de cultivo a una temperatura de 37°C, 80% de humedad relativa y el 5% de CO₂.

III.B.5.- TECNICA DE REALIZACION DEL FACSCAN (HISTOGRAMA SIMPLE)

Ajustamos las células a razón de 6×10^6 por ml. Ponemos 0,1 ml de esta suspensión en sendos tubos de 5 ml. Centrifugamos a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos en una centrifuga refrigerada a 4°C. Decantamos el sobrenadante y sobre el botón celular añadimos 20 µl del anticuerpo monoclonal frente al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), agitamos e incubamos durante 30 minutos a 4°C.

Pasado este tiempo lavamos una vez con PBS frío (4°C) centrifugando a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos. Decantamos el sobrenadante y le añadimos sobre el botón celular 15 µl del segundo anticuerpo Anti-Mouse Ig G (Whole molecular)-FITC Conjugate, a la dilución de 1/20. Incubamos durante 30 minutos a 4°C y posteriormente, después de 2 lavados con PBS frío, decantamos el sobrenadante y fijamos el botón celular con 0.5-1 ml de formaldehido al 1% (PBS).

A continuación se procede a su análisis por medio del FACSCAN.

III.B.6.- TEST DEL CICLO CELULAR POR CONTENIDO DE DNA
(FACSCAN)

Las células Hela se encuentran en un frasco de cultivo (falcon) de 50 ml con medio DMEM. Se retira el medio del falcon, se le añade PBS-EDTA (poca cantidad, lo suficiente como para cubrir la superficie) y se coloca en la estufa de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se agita ligeramente y se observa al microscopio invertido para comprobar que las células se han despegado del falcon. Se añade PBS y se agita, posteriormente lo extraemos y se pone en un universal.

Centrifugamos a 1.000 - 1.5000 r.p.m. durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se añade 1 ml de PBS para contarlas en la cámara de Neubauer, y se ajustan a razón de 100.000 células por mm³. transfiriéndose a tubos de FACS.

Centrifugamos y posteriormente añadimos 40 µl de buffer (citrato sódico, sucrosa y DMSO) para la preparación y ruptura de los núcleos celulares. De forma sucesiva agregamos:

- La SOLUCION A, conteniendo tripsina en buffer de tetrahidrochloride de spermine para la degradación enzimática de los fragmentos sólidos de tejido y la solubilización de las membranas celulares.
- La SOLUCION B, conteniendo inhibidor de la tripsina y Ribonucleasa A.
- La SOLUCION C, conteniendo propidium iodide para la tinción del DNA.

MATERIAL Y METODOS

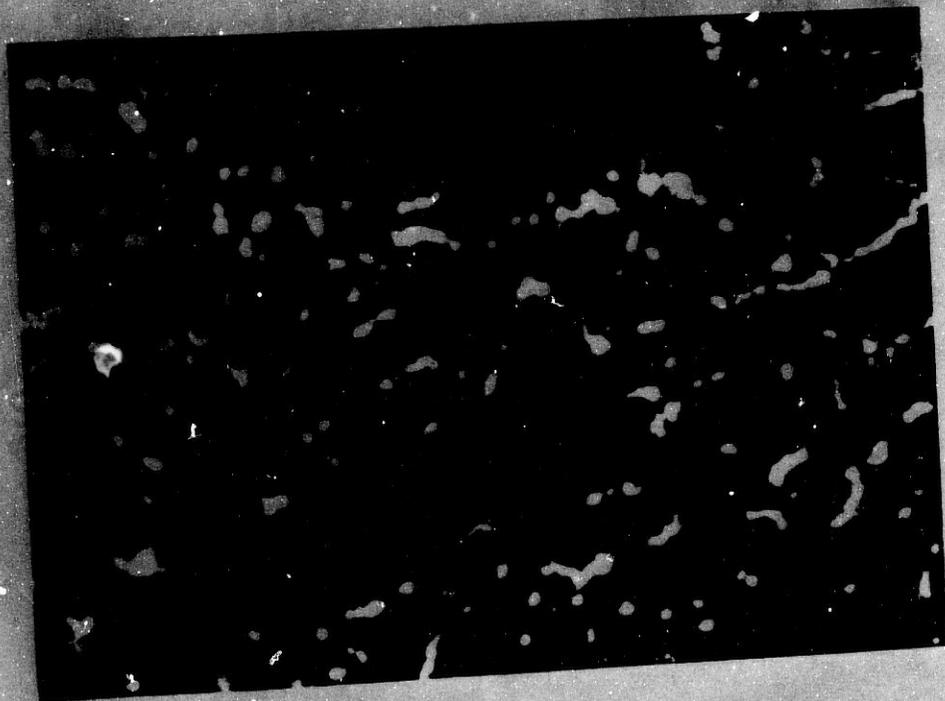
Se intercala entre cada solución un período de 10 minutos de agitación suave a temperatura ambiente.

Posteriormente se procede a su análisis por citometría de flujo (FACScan).

RESULTADOS

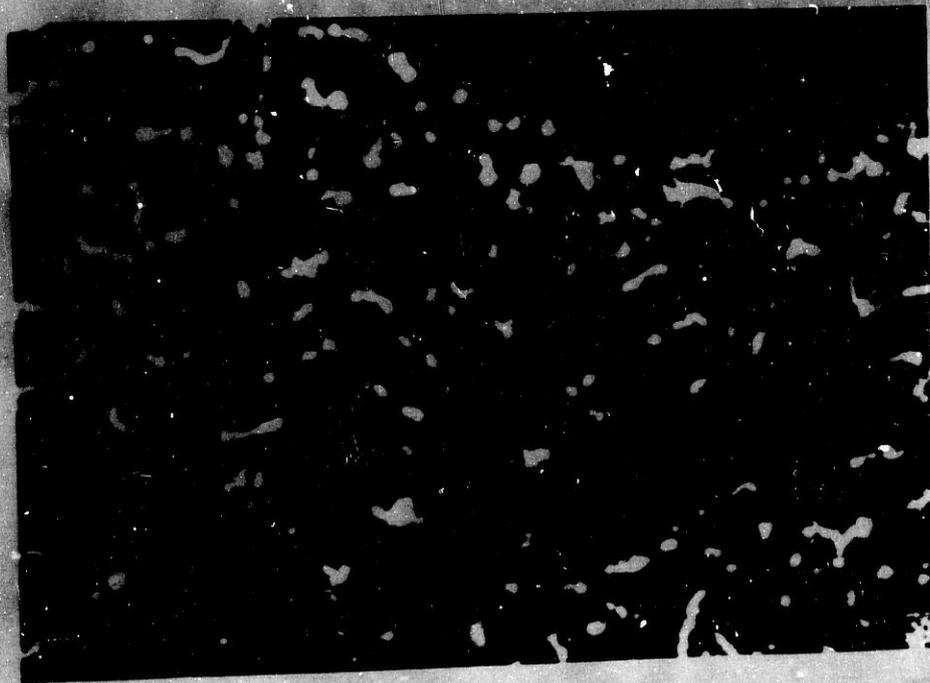
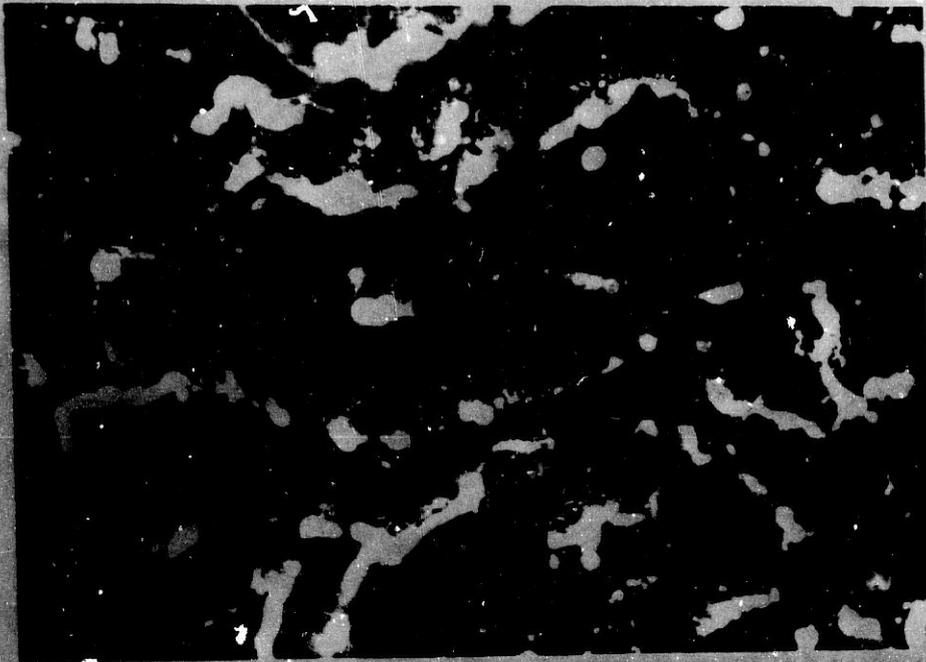
IV.A.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) EN CORTES DE BIOPSIAS MUSCULARES HUMANAS.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) de los cortes de las distintas biopsias musculares humanas (estriado, liso y cardíaco), nos ponen de manifiesto una expresión positiva y homogénea del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr).

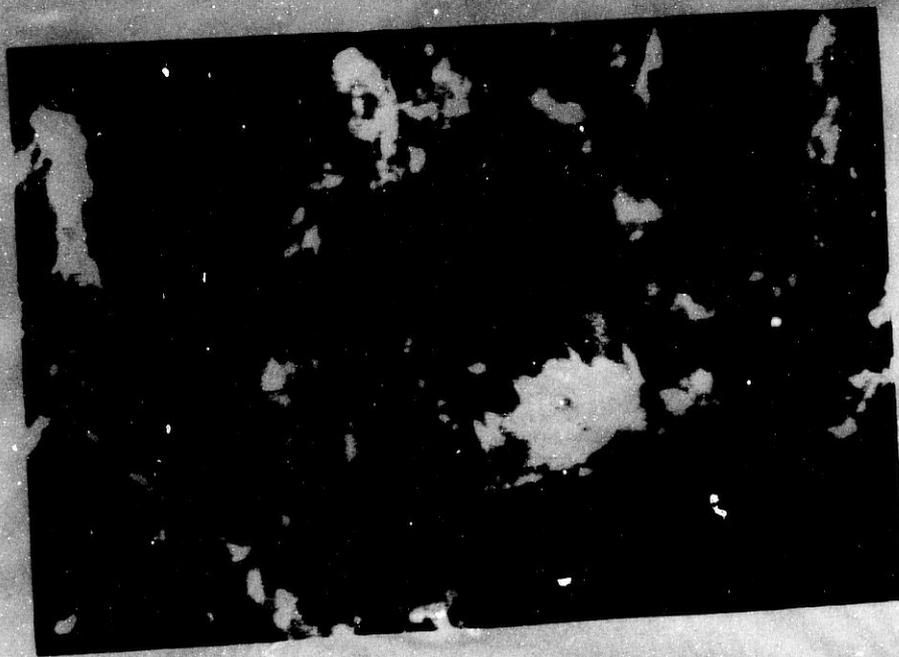
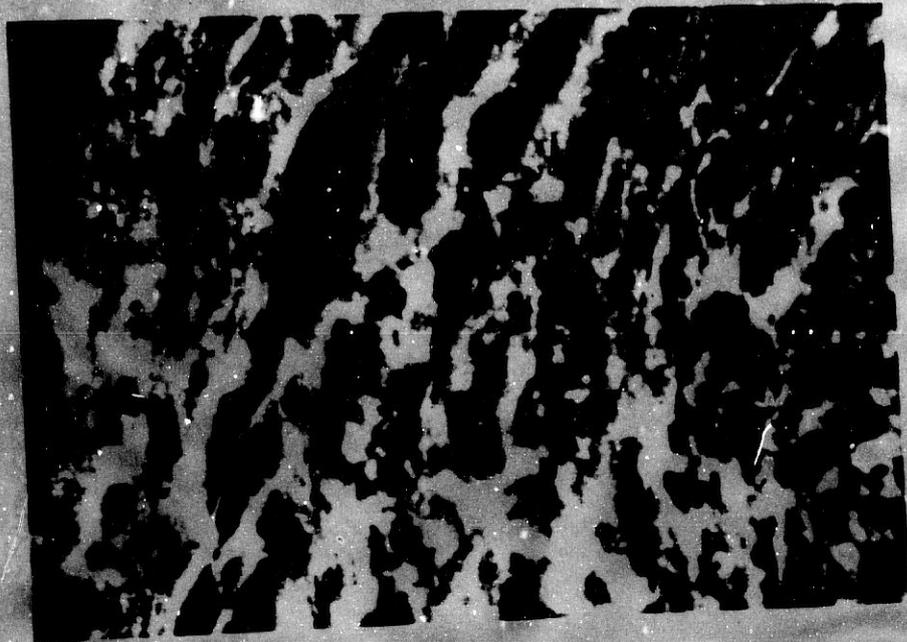


INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) DE UN CORTE DE BIOPSIA MUSCULAR ESTRIADA EN LA QUE SE PONEN DE MANIFIESTO LOS RECEPTORÉS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr)

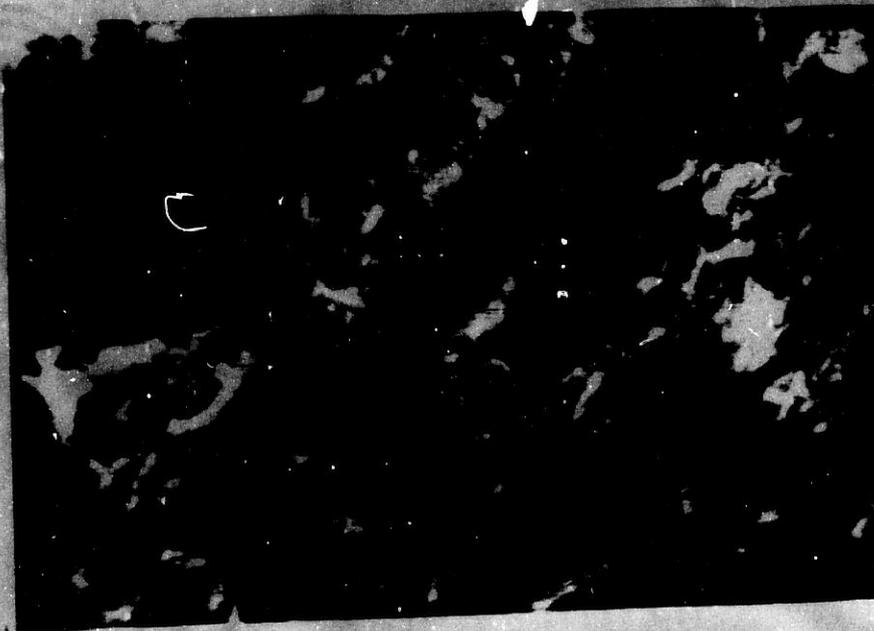
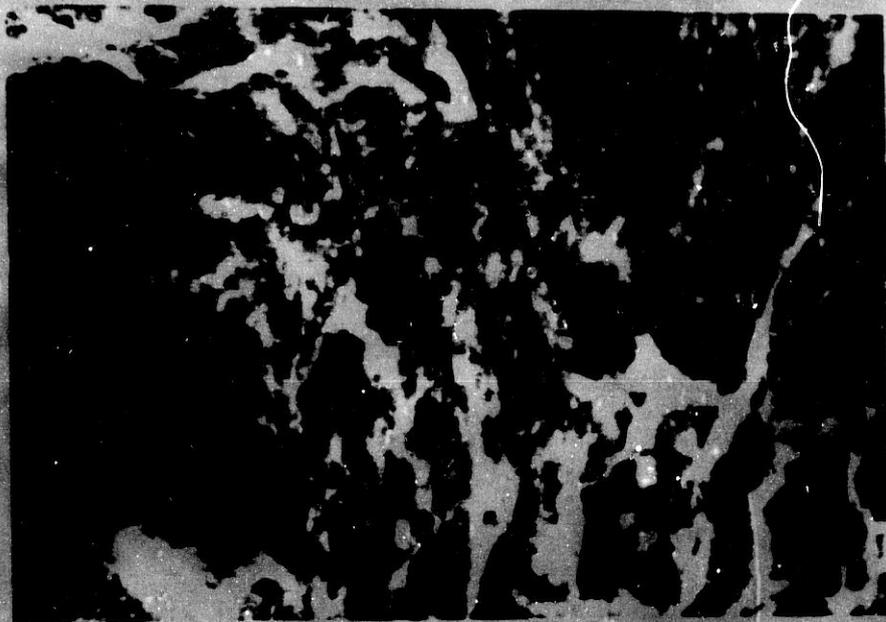
IV.A.1.- INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS (IFI) DE DOS CORTES
DE UNA BIOPSIA MUSCULAR ESTRIADA EN LA QUE SE PONEN
DE MANIFIESTO LOS EGFr



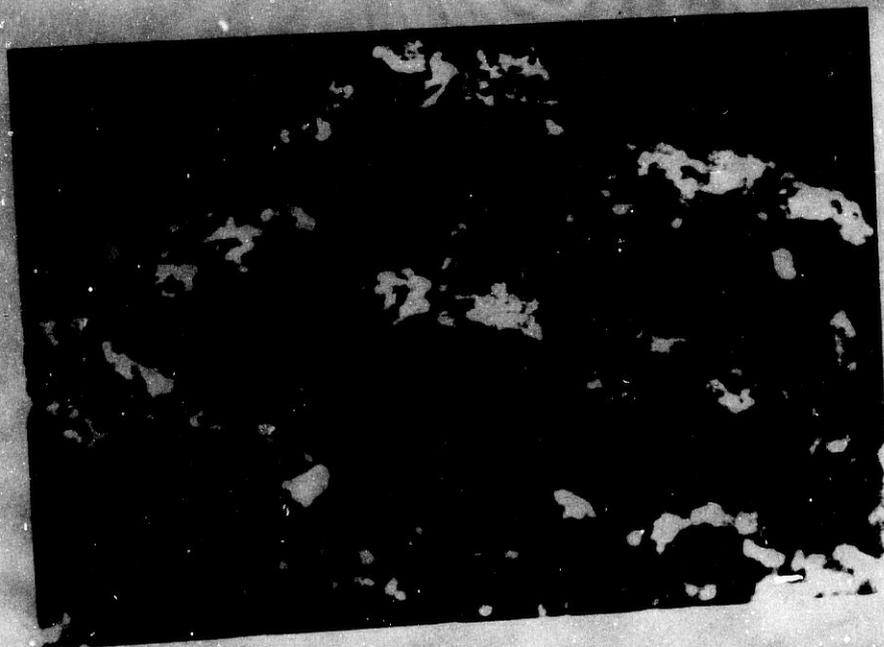
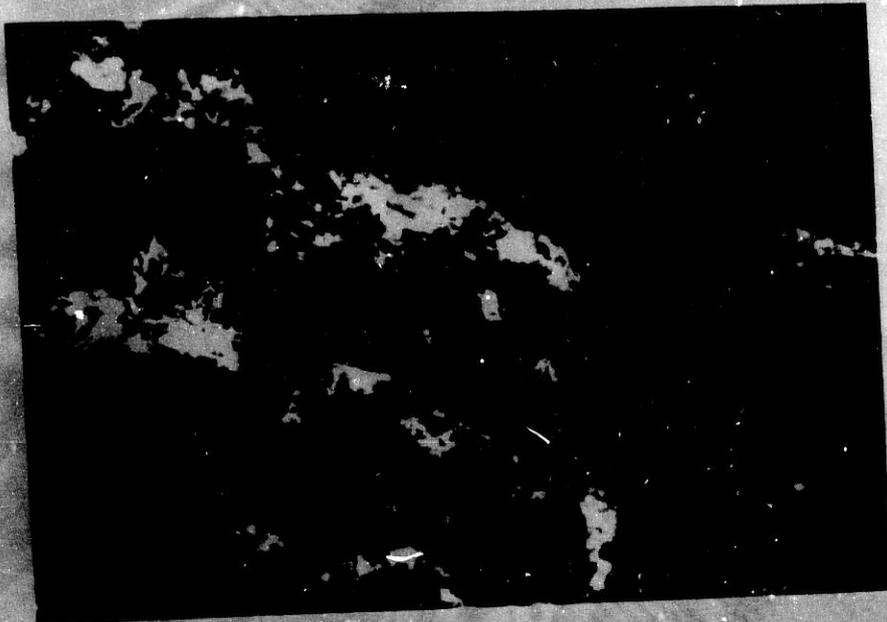
IV.A.2.- INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS (IFI) DE DOS CORTES
DE UNA BIOPSIA DE MUSCULATURA CARDIACA
(VENTRICULO), DONDE SE EXPRESAN LOS EGFr



INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS (IFI) DE CORTES DE
BIOPSIAS DE MUSCULATURA CARDIACA (VENTRICULO), DONDE SE
EXPRESAN LOS EGF τ



IV.A.3.- INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS (IFI) DE DOS CORTES
DE UNA BIOPSIA DE MUSCULATURA LISA (VENOSA), CON
EXPRESION POSITIVA DE LOS EGFr



**IV.B.- EXPRESION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMAL EN CELULAS MUSCULARES CULTIVADAS EN
"SHELL-VIAL".**

La expresión de los receptores del factor de crecimiento epidermal en células de rabdomiosarcoma (R.D) cultivadas en "Shell-vial". y puestos de manifiesto mediante inmunofluorescencia indirecta. resultó positiva.



INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DEL EGFR EN CELULAS DE
RABDOMIOSARCOMA (R.D) CULTIVADAS EN "SHELL-VIAL".

IV.B.1.- INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS DEL EGFr EN CELULAS DE RABDOMIOSARCOMA (R.D) CULTIVADAS EN "SHELL-VIAL".

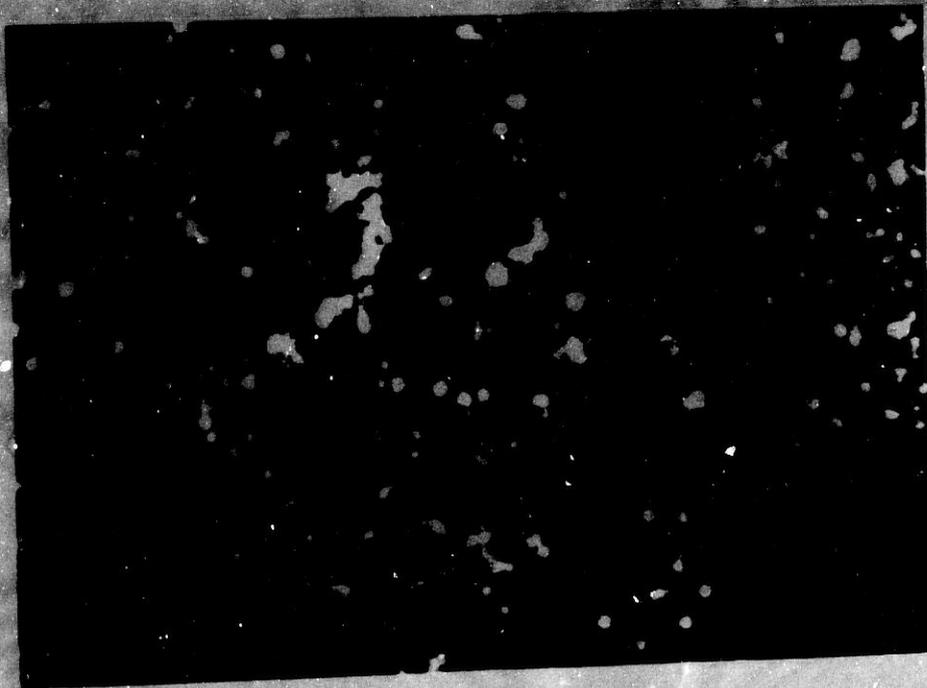


IV.B.2.- INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA DEL EGFR EN CELULAS
CARDIACAS DE EMBRION DE POLLO EN 34 H.H Y
CULTIVADAS EN " SHELL-VIAL "



La expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFr) en las células cardíacas de embrión de pollo en 34 H.H (fase de desarrollo embrionario de Hamburger-Hamilton) cultivadas en "Shell-vial", resultó positiva.

INMUNOFLORESCENCIAS INDIRECTAS DEL EGF_r EN CELULAS
CARDIACAS DE EMBRION DE POLLO EN 34 H.H Y CULTIVADAS EN
"SHELL-VIAL".



IV.C.- MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN CELULAS MUSCULARES (HUMANAS) NORMALES Y TUMORALES.

Tanto las células musculares normales como las tumorales (células de rabdiosarcoma) presentaron una expresión positiva al EGFr.

La Fluorescencia Media Inducida (MFi) para el EGFr en los rabdociocitos era de 740, con un incremento relativo en el porcentaje de la fluorescencia media (MF) del 85% .

En las células musculares esqueléticas encontramos una Fluorescencia Media Inducida (MFi) para el EGFr de 715, mientras que el incremento relativo en el porcentaje de la fluorescencia media (MF) era del 78,75% .

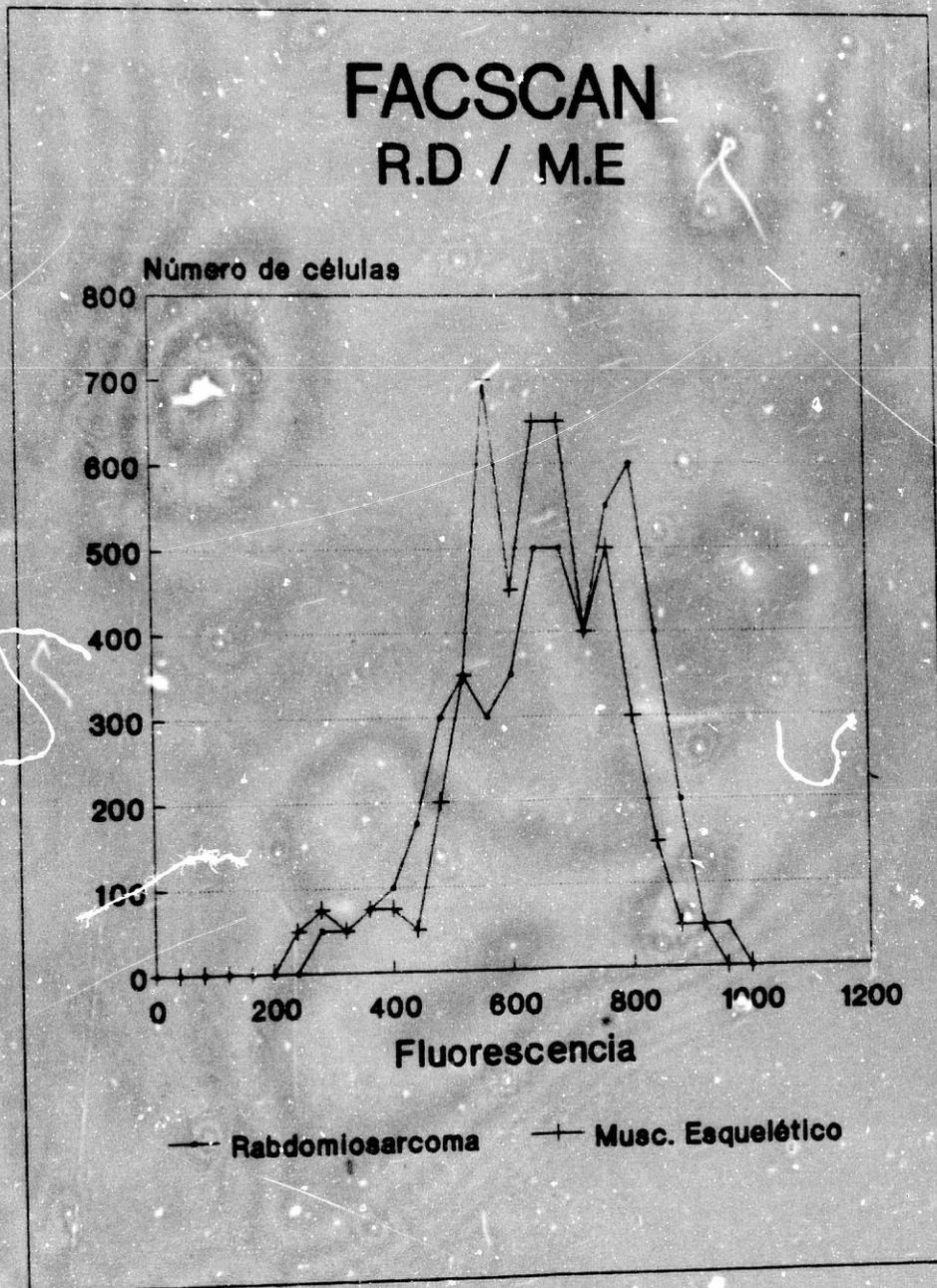
La fluorescencia media basal (control negativo) fue de 400. En la tabla 1 se relaciona la fluorescencia media inducida (MFi) y el incremento relativo en el porcentaje de la fluorescencia media (MF) para el EGFr, en los rabdociocitos y en las células musculares esqueléticas (normales).

	MFi (EGFr)	MF
Rabdociocitos	740	85%
Cels. Musc Esquel.	715	78,75%

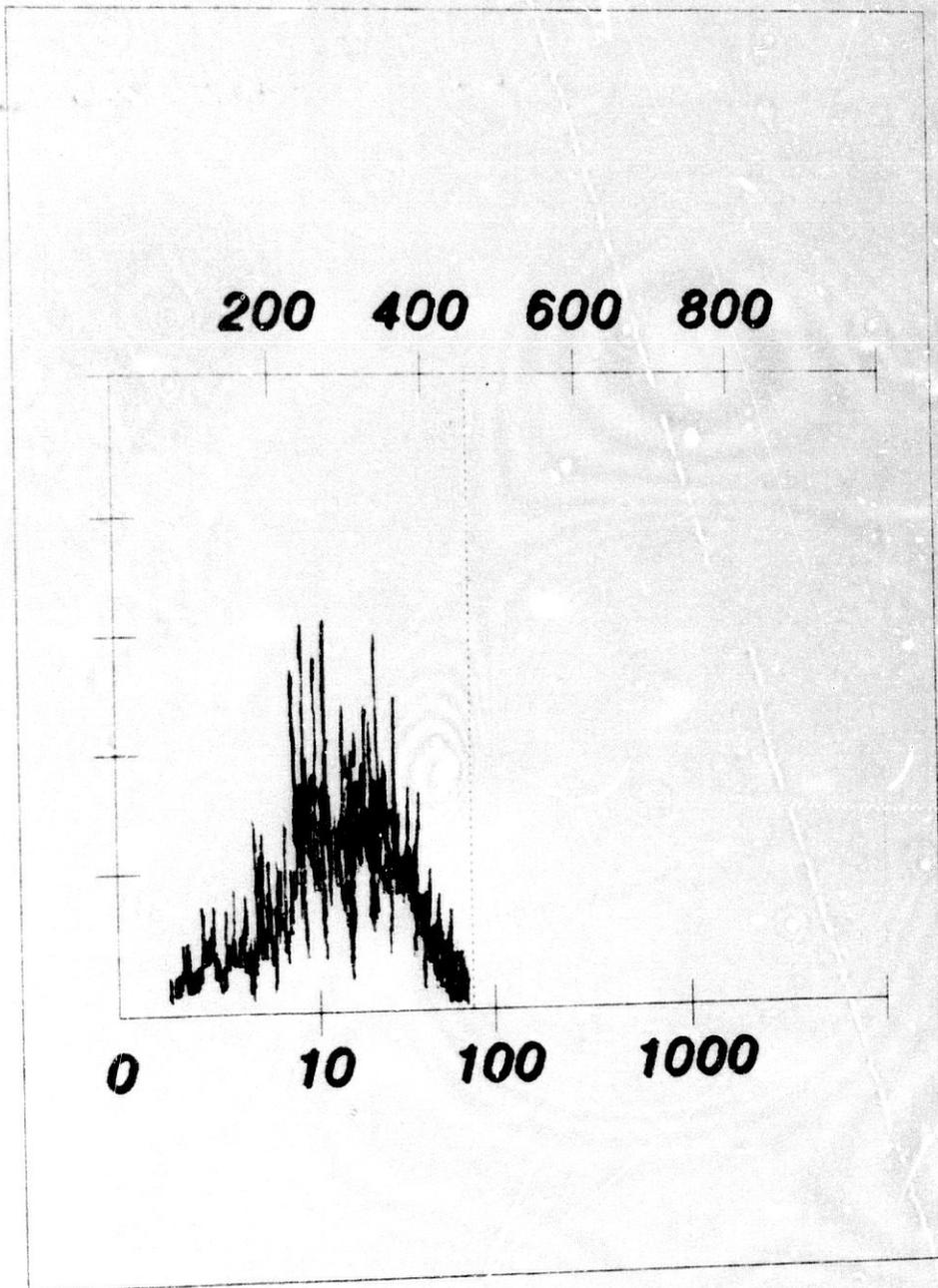
Fluoresc.	R.D	M.E	C. Negativo
40	0	0	50
120	0	0	100
200	0	0	250
280	50	75	300
360	75	75	350
440	175	50	50
520	350	350	0
600	350	450	0
680	500	650	0
760	550	500	0
840	400	150	0
920	50	25	0
1.000	0	0	0

Tabla 2. Se cuantifica la fluorescencia (IFI del EGFr) en células de rabdomiosarcoma (R.D) y musculares esqueleticas normales.

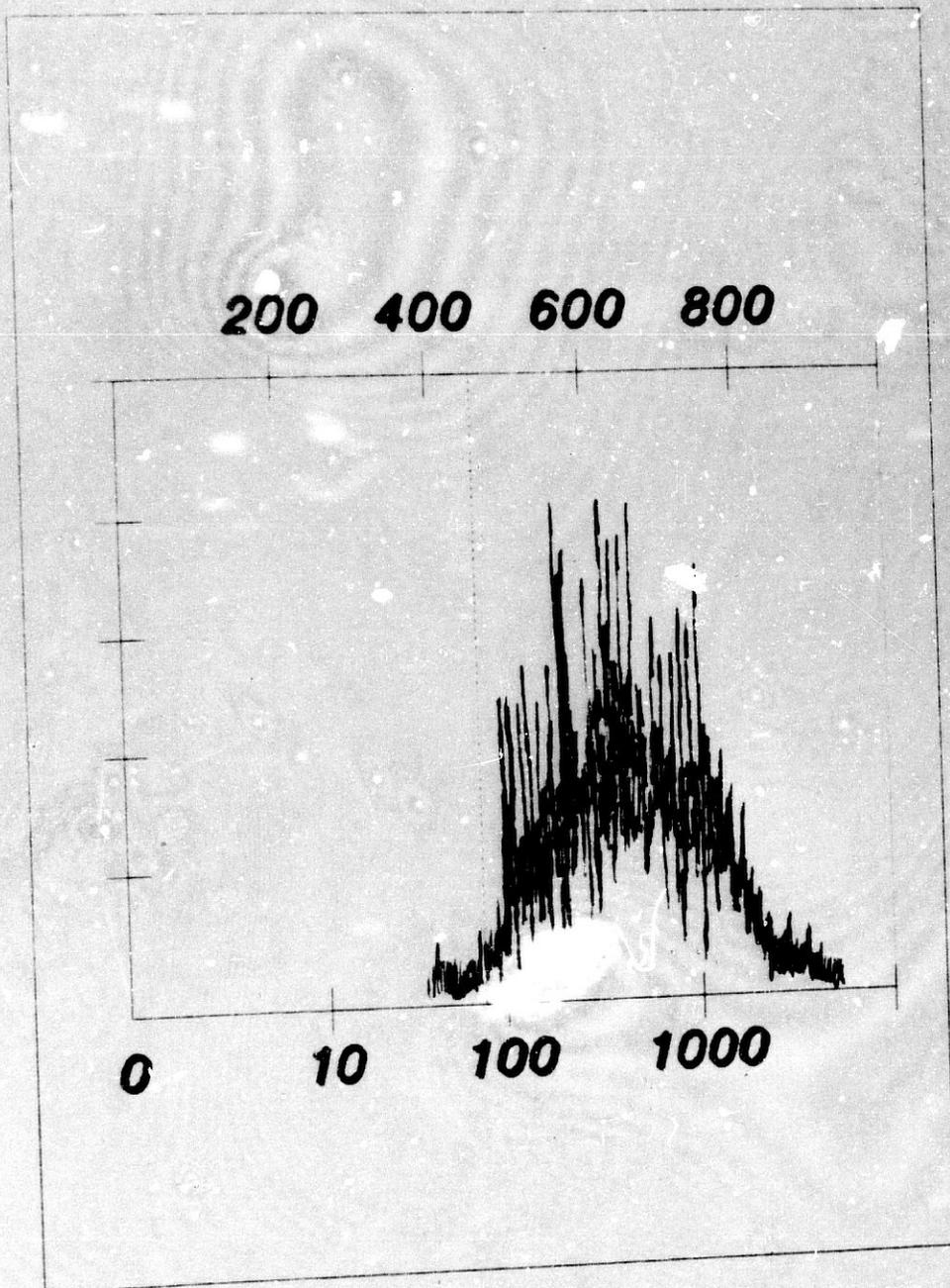
GRAFICA DE LOS FACSCAN DEL EGFr EN CELULAS DE RABDOMIOSARCOMA Y MUSCULO ESQUELETICO



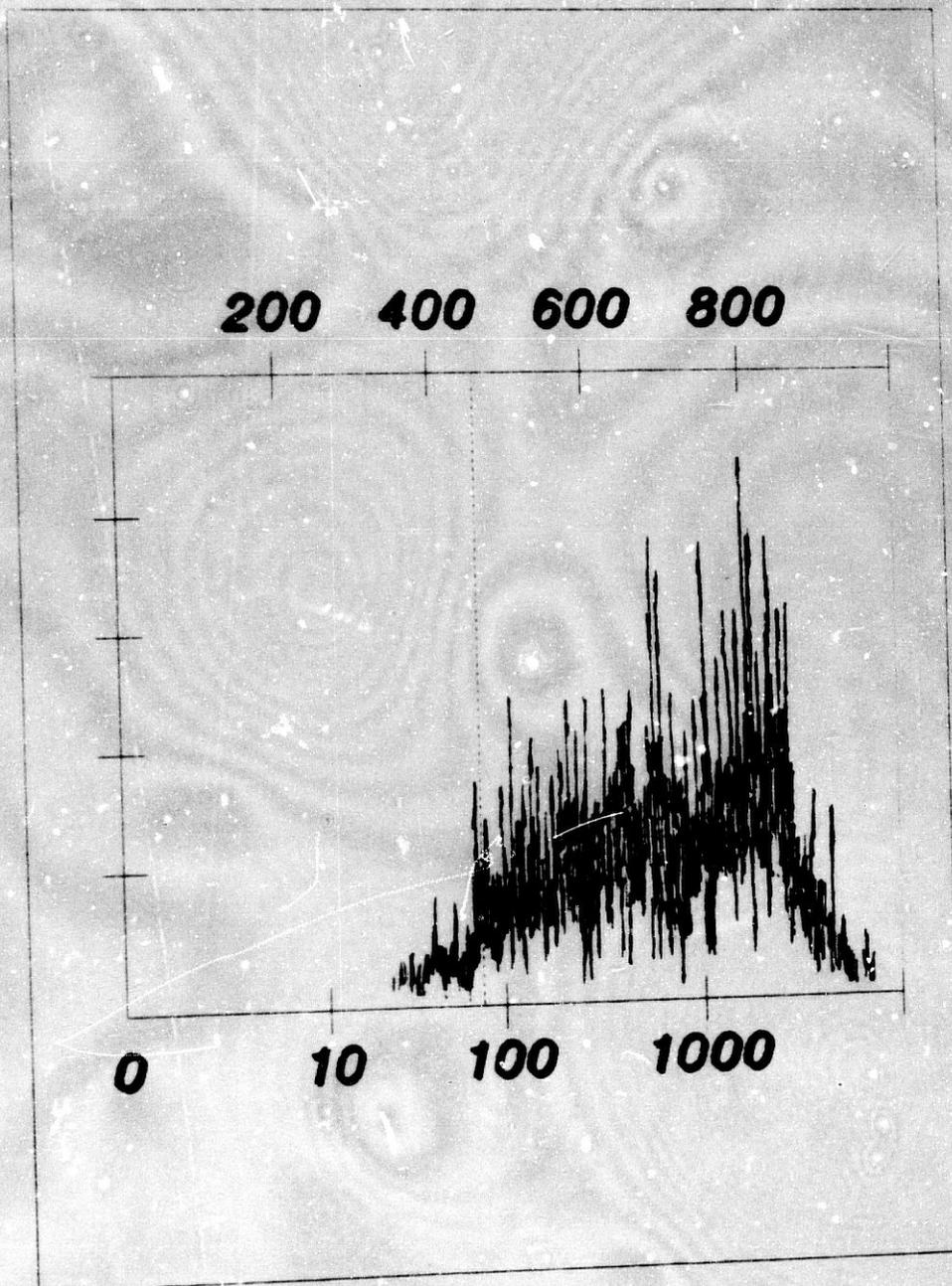
FACSCAN DEL EGFR (CONTROL NEGATIVO)



FACSCAN DEL EGFr EN CELULAS DE MUSCULO ESQUELETICO



FACSCAN DEL EGFR EN CELULAS DE RABDOMIOSARCOMA



IV.D.- MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LAS CELULAS CARDIACAS DEL EMBRION DE POLLO A LO LARGO DEL DESARROLLO

El 17 H.H (estadio de desarrollo de Hamburger-Hamilton) y el 25 H.H presentan una fluorescencia media inducida (MFi) para el EGFr de 491 y 471, con un incremento relativo en el porcentaje de la fluorescencia media (MF) del 47% y 41.01% .

El 35 H.H y el 40 H.H tienen una MFi para el EGFr de 431 y 391, con un MF de 29.04% y el 17.06% respectivamente.

	MFi (EGFr)	MF
17 H.H	491	47%
25 H.H	471	41,01%
35 H.H	431	29,04%
40 H.H	391	17,06%
Control Negativo	334	—

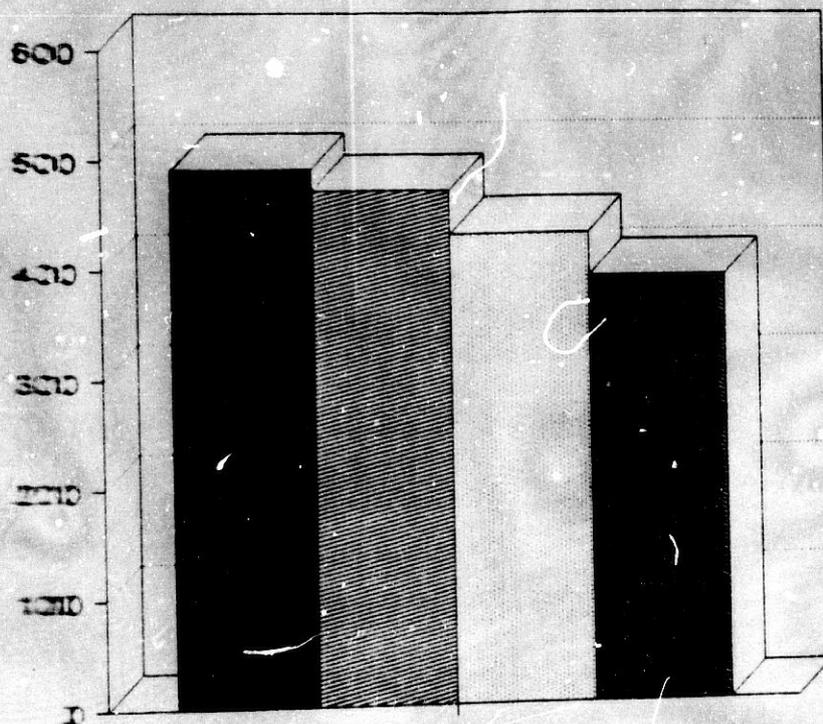
Tabla 3. Expresión de la fluorescencia media inducida (MFi) para el EGFr y del incremento relativo en el porcentaje de la fluorescencia media (MF) a lo largo del desarrollo embrionario del pollo.

Fluoresc.	17 H.H	25 H.H	35 H.H	40 H.H
40	0	0	0	0
120	0	0	0	0
200	50	50	0	50
280	50	100	50	200
360	300	300	350	300
440	500	500	450	250
520	400	200	250	0
600	100	100	50	0
680	50	0	0	0
760	0	0	0	0
840	0	0	0	0
920	0	0	0	0
1.000	0	0	0	0

Tabla 4. Se establece la relación existente entre los diversos estadios embrionarios y su fluorescencia (EGFr).

REPRESENTACION GRAFICA DE LA MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO

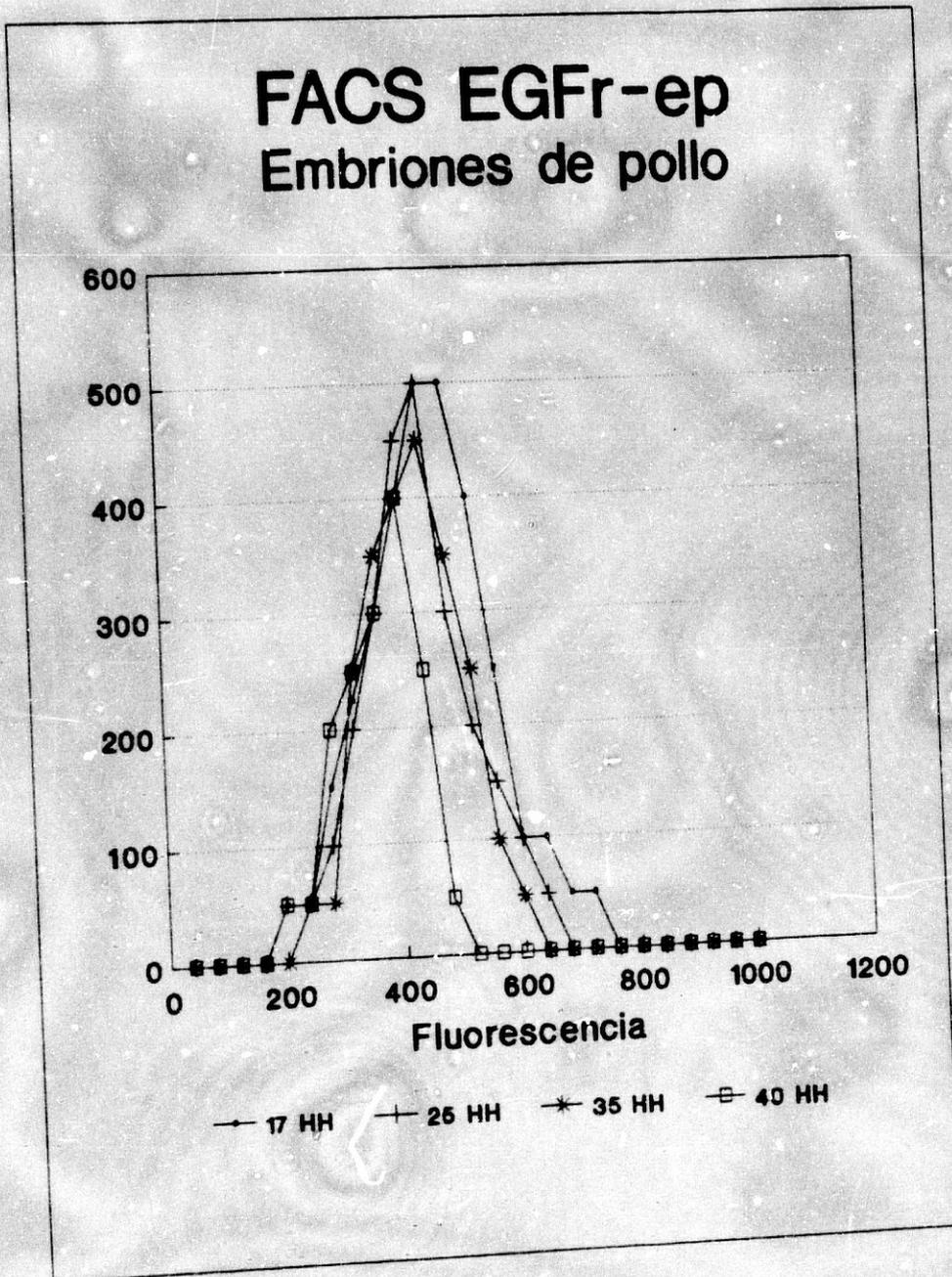
Desarrollo Embrionario EGFr (pollo)



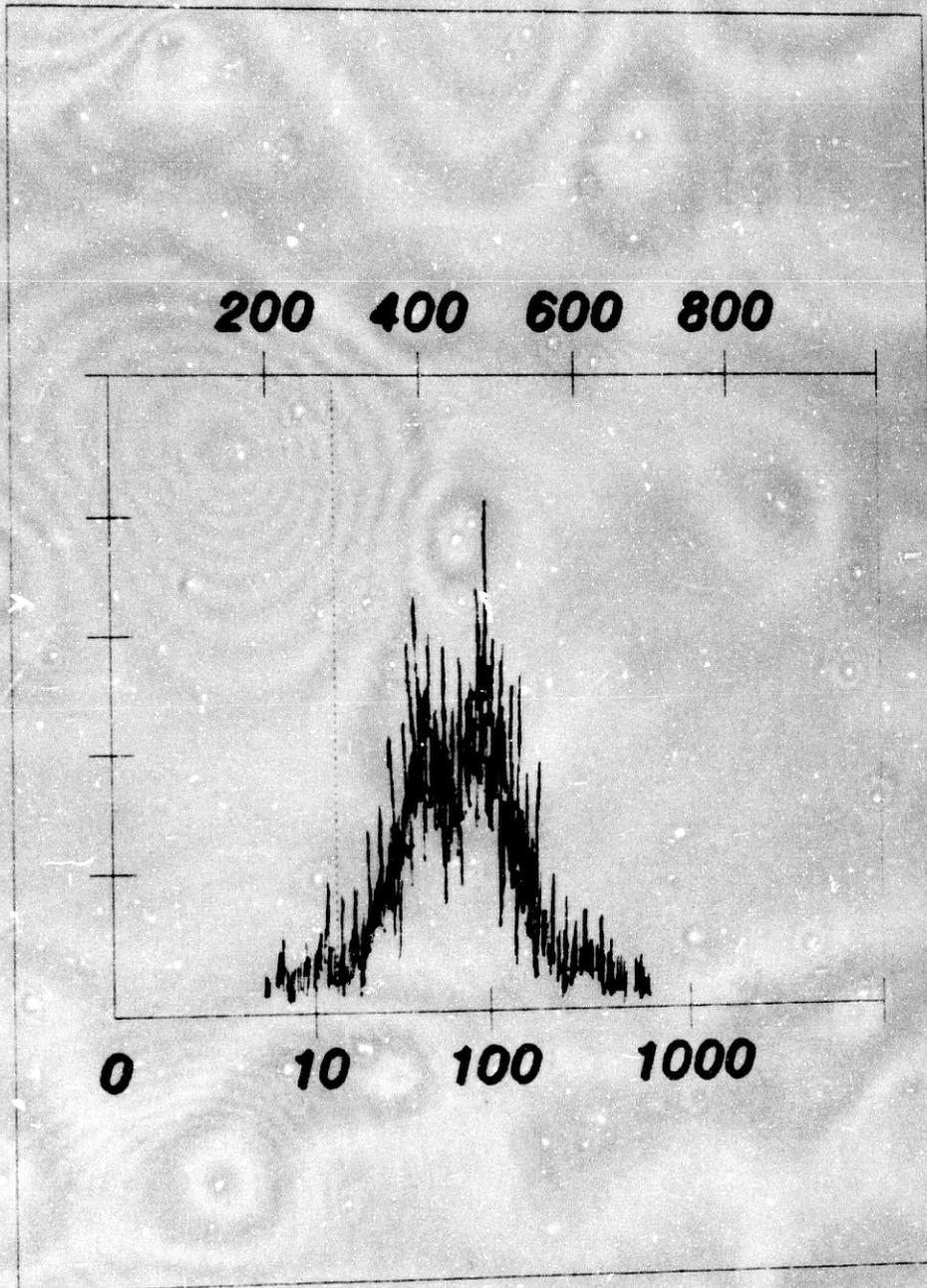
Estadios Embrionarios

■ 17 H.H. ■ 25 H.H. □ 35 H.H. ■ 40 H.H.

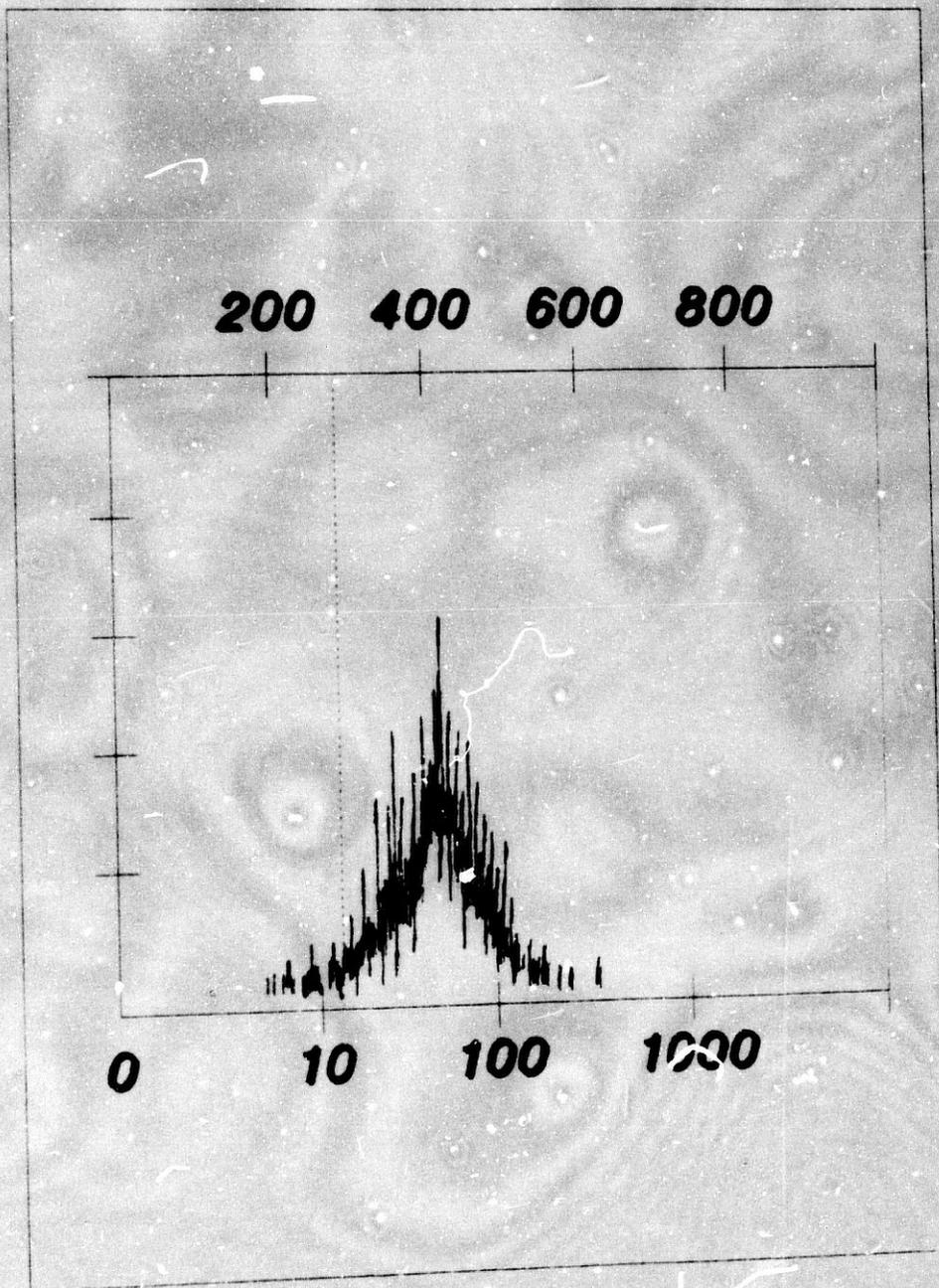
REPRESENTACION GRAFICA DE LOS FACSCAN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO



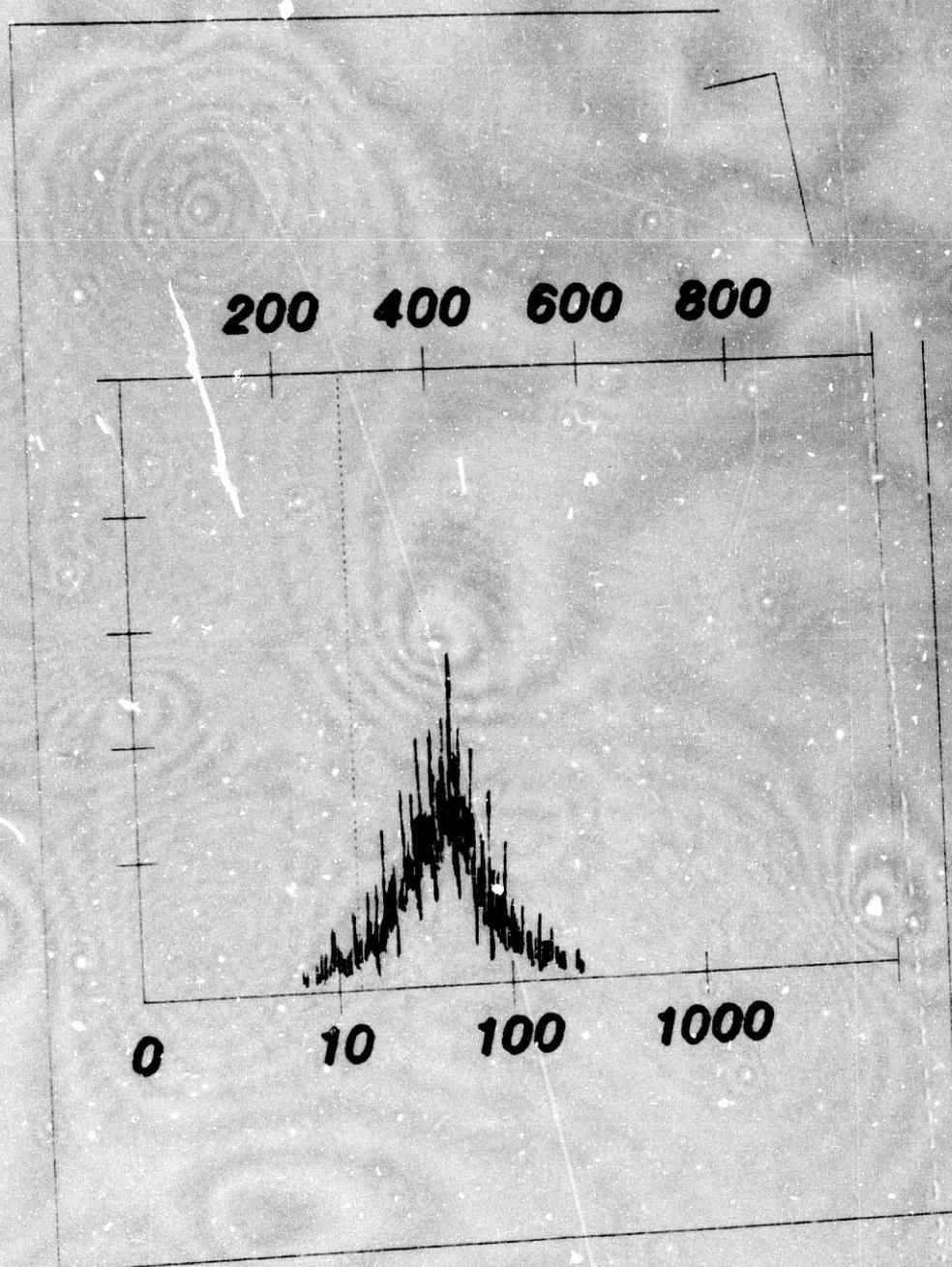
FACSCAN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO (EGFR)
EN EL ESTADIO 17 H.H



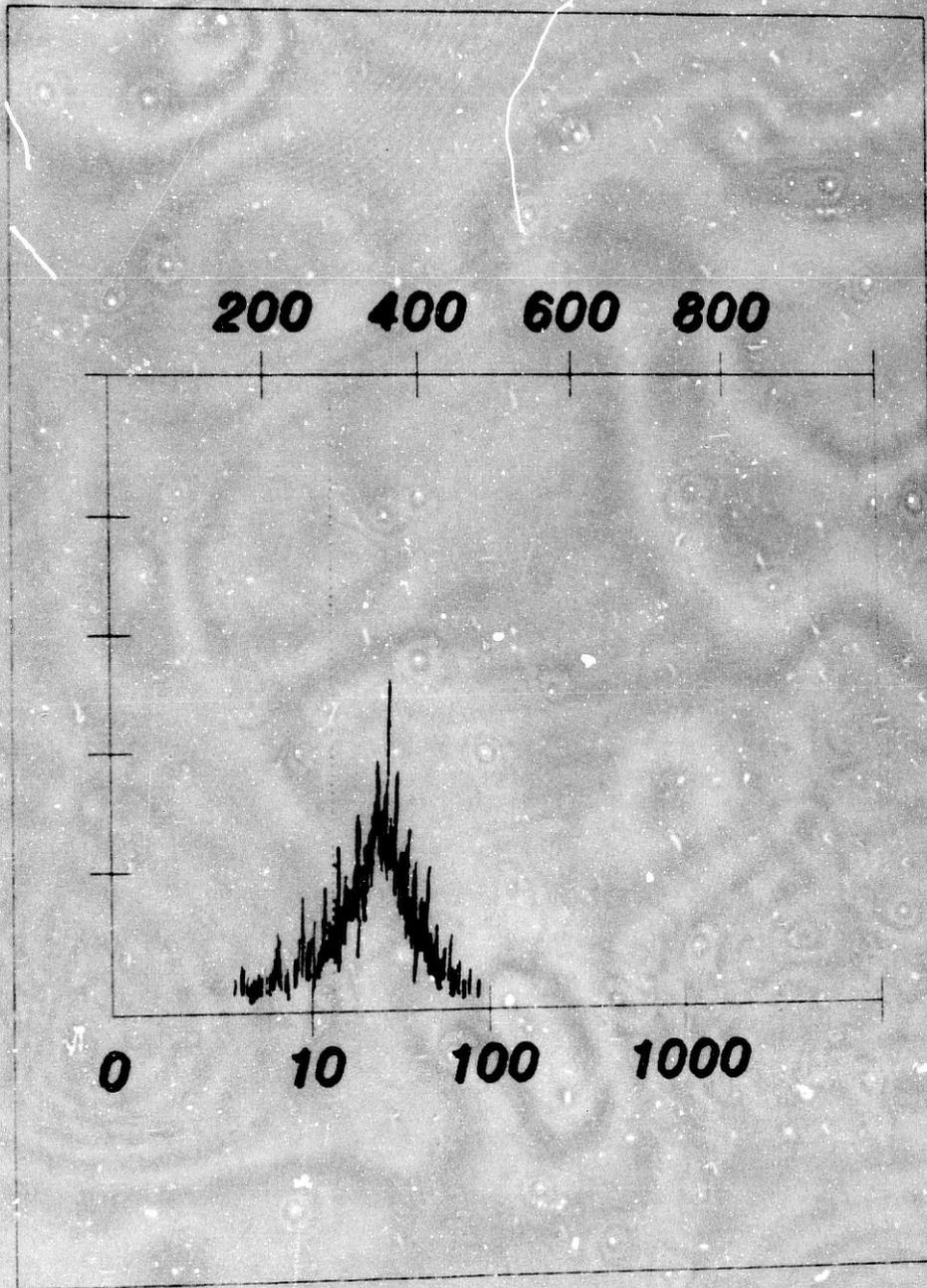
FACSCAN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL
(EGFr) EN EL ESTADIO 25 H.H



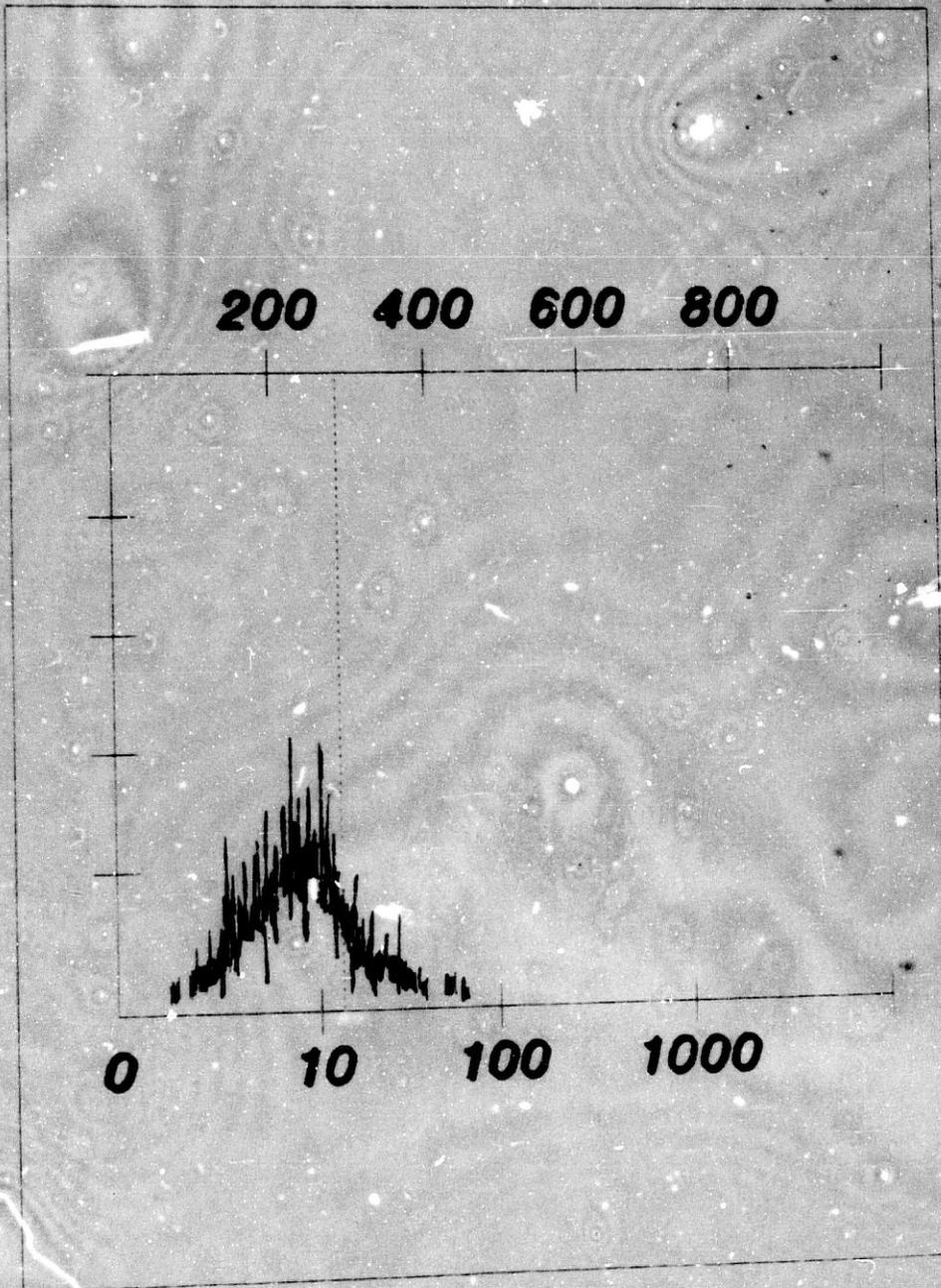
FACSCAN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL
(EGFr) EN EL ESTADIO 35 H.H



FACSCAN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL
(EGFr) EN EL ESTADIO 40 H.H



FACSCAN DEL EGFr (CONTROL NEGATIVO)



IV.E.- RELACION ENTRE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESION DEL EGFr Y SUS REPERCUSIONES EN EL CICLO CELULAR.

Las células tratadas con EGF (Epidermal growth factor) o con Insulina presentan una fluorescencia media inducida (MFi) para el EGFr de 652 y 583, con un incremento relativo en el porcentaje de fluorescencia (MF) de 76.21% y 57.56% respectivamente.

En el caso de la Fitoheماغlutinina (PHA) o el γ -Interferon (γ -IFN), presentaron una MFi para el EGFr de 656 y 701, con una MF de 77.29% y 89.45% .

Las células que recibieron medio sin factores adicionales presentaron una MFi para el EGFr de 620 con una MF del 67.56% .

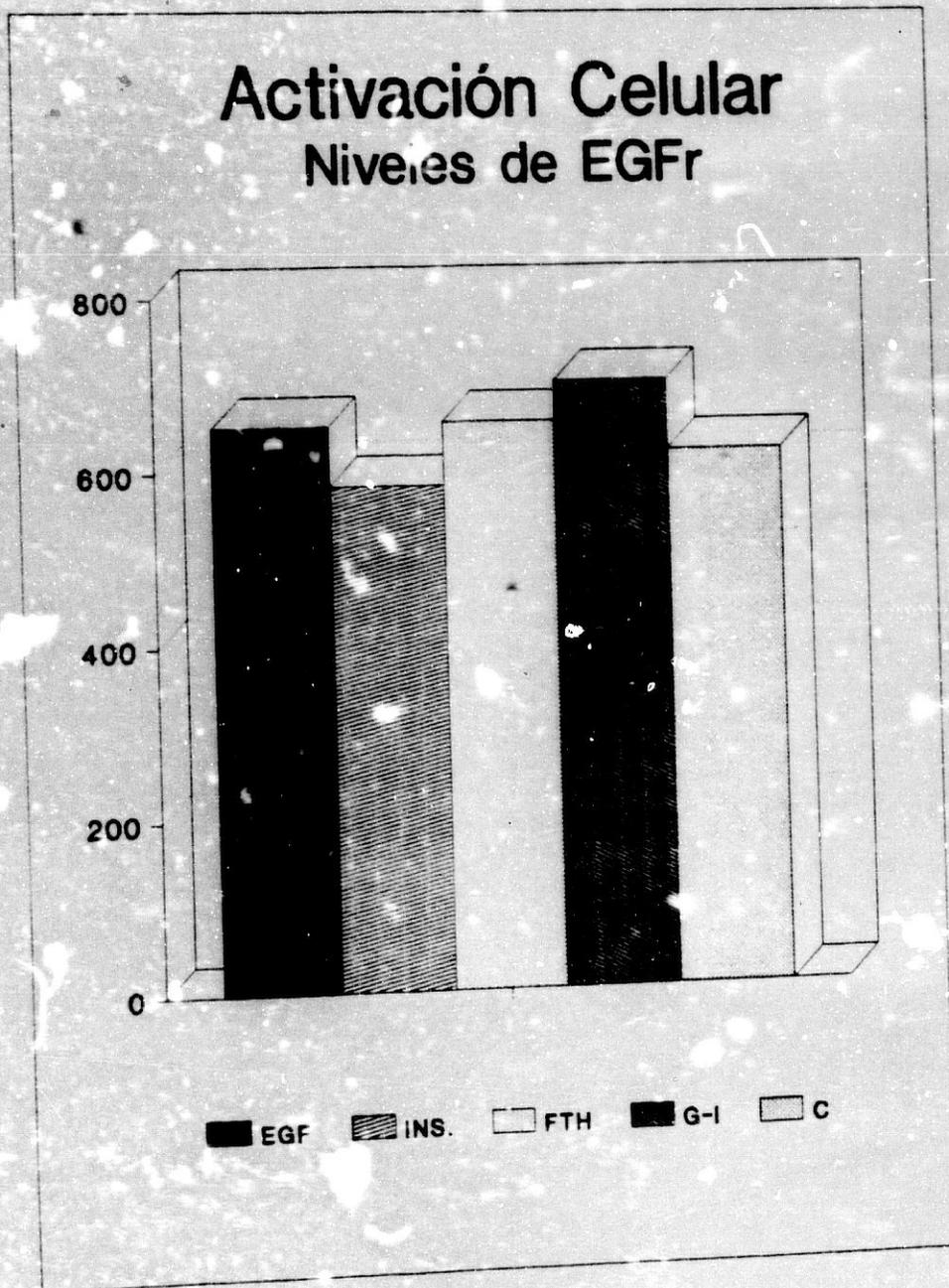
	MFi	MF
EGF	652	76,21%
INSULINA	583	57,56%
FITHEMAGLUTININA	656	77,29%
γ -INTERFERON	701	89,45%
CELS. CONTROL	620	67,56%
Control Negativo	370	-----

Tabla 5. Expresión del MFi para el EGFr y MF en células sometidas a diversos factores.

Podemos clasificarlas según el número de receptores (EGFr) por célula:

INSULINA < C. CONTROL < EGF < FITHEMAGLUTININA < γ -INTERFERON

REPRESENTACION GRAFICA DEL NUMERO DE RECEPTORES (EGFr) POR
 CELULA DESPUES DE 10 DIAS DE CULTIVO SOMETIDAS A DIVERSOS
 FACTORES



RESULTADOS

Los resultados del Test del Ciclo Celular por DNA de las células sometidas a diversos factores fue el siguiente:

- 1.- Cels. trat. con EGF :..... 50% Go/G1 17% S 27% G2/M
- 2.- " " INSULINA:..... 42% Go/G1 10% S 29% G2/M
- 3.- " " FITOHEMAGLUTININA: 45% Go/G1 11% S 27% G2/M
- 4.- " " γ -INTERFERON:.....17% Go/G1 15% S 15% G2/M
- 5.- Cels. CONTROL:.....43% Go/G1 10% S 31% G2/M

La relación que existe entre las diversas fases del ciclo de las células tratadas con respecto a las células control, es la siguiente :

- 1) Cels trat. con EGF:..... > GO/G1 > S < G2/M
- 2) " " INSULINA:..... = Go/G1 = S = G2/M
- 3) " " FITOHEMAGLUTININA: = Go/G1 = S < G2/M
- 4) " " γ -INTERFERON:..... << Go/G1 > S << G2/M

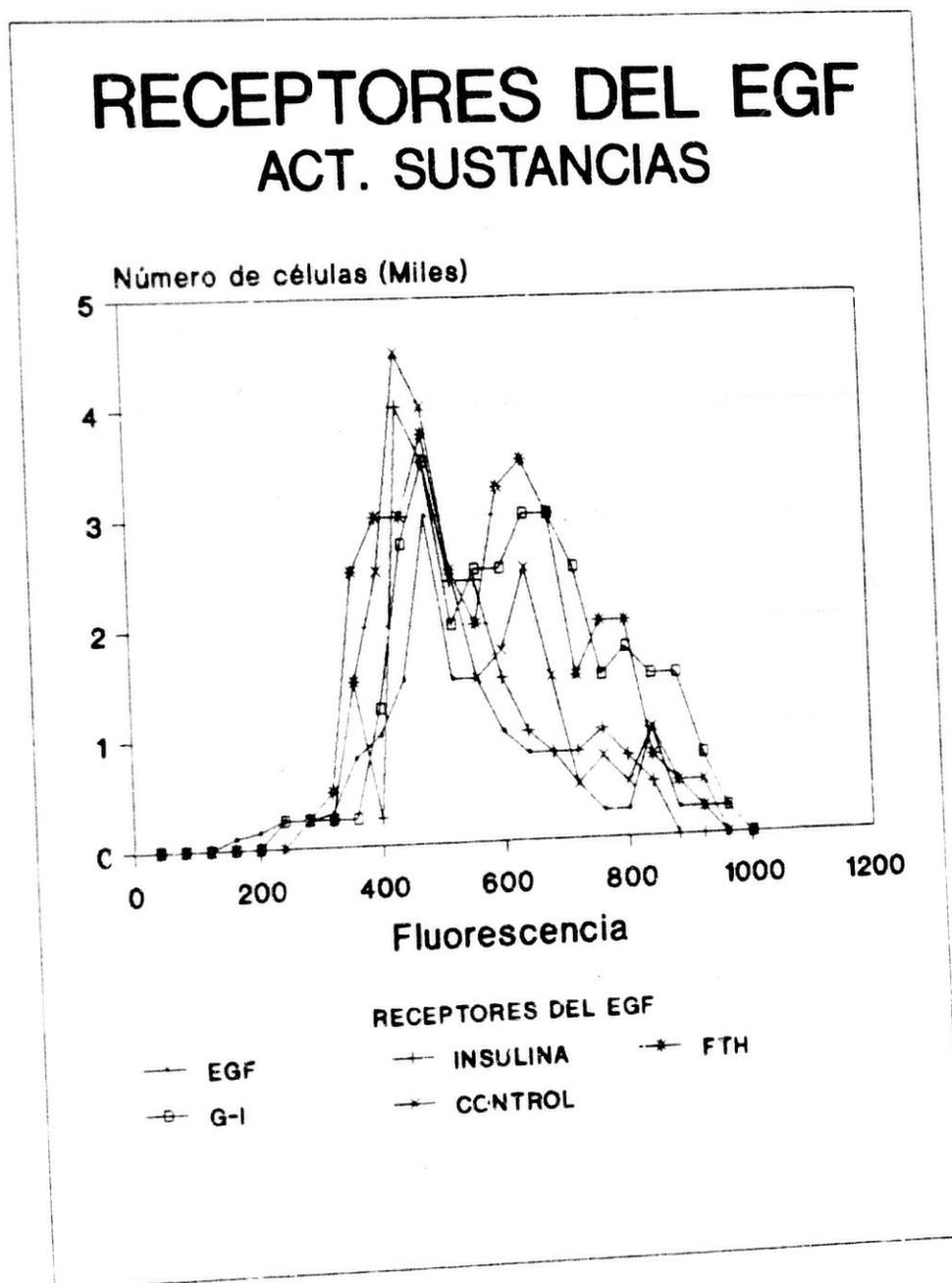
Tabla 6. Puntos de máxima intensidad en cada una de las fases del histograma.

	EGF	INSULINA	PHA	γ -IFN	CONTROL
Go/G1	96	81	92	32	86
S	32	19	21	29	19
G2/M	52	56	53	29	62

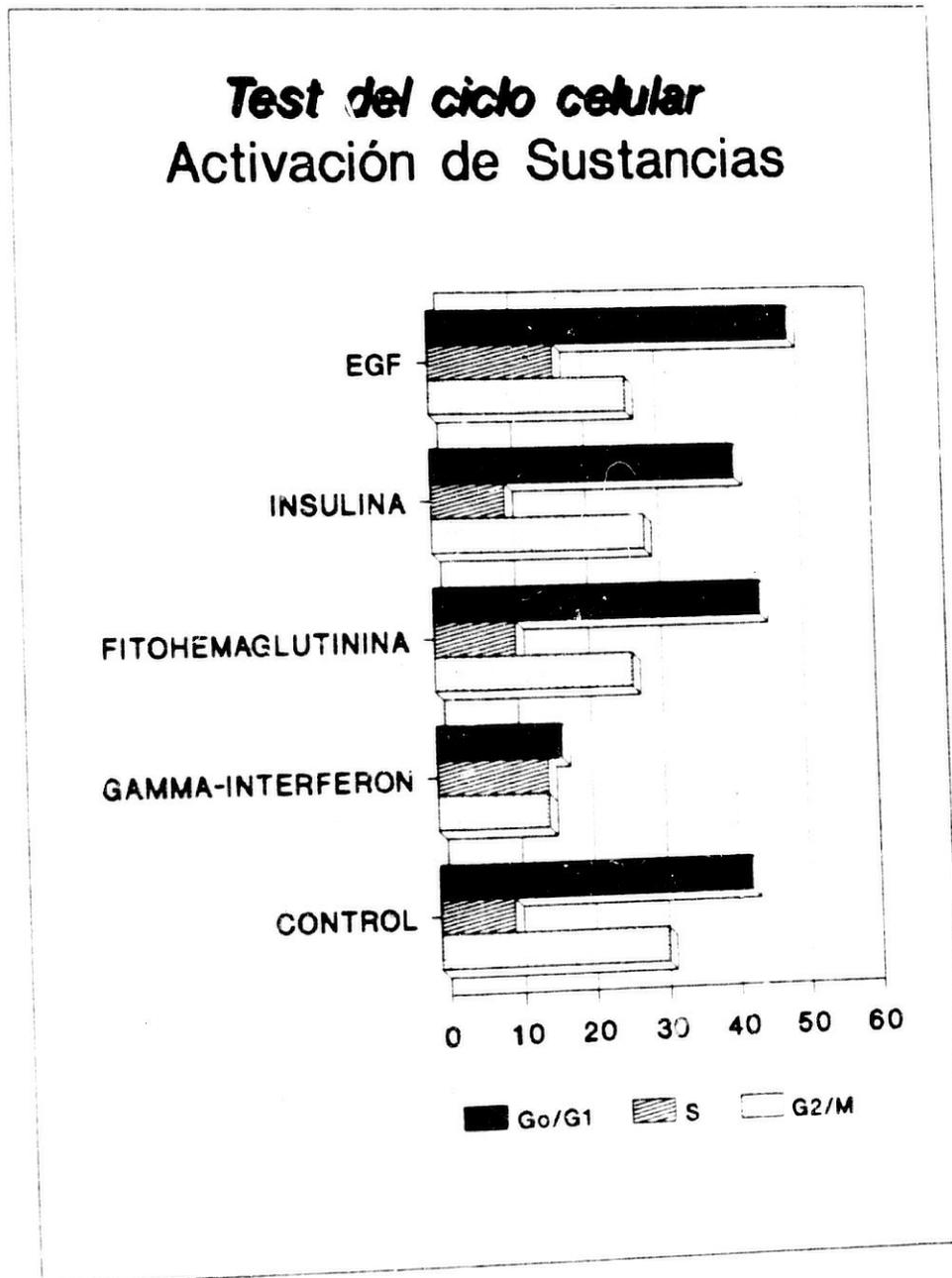
Fluoresc	EGF	INSULINA	PHA	γ -IFN	CONTROL
40	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0
200	100	0	0	0	0
280	100	50	50	50	50
360	150	300	100	50	200
440	350	700	500	300	800
520	350	400	300	400	400
600	250	300	500	300	250
680	150	200	250	500	200
760	50	100	200	300	100
840	150	100	150	250	100
920	100	0	100	50	50
1.000	0	0	0	0	0

Tabla 7. Se expresa la intensidad de fluorescencia (EGFr) de las células tratadas con diversos productos.

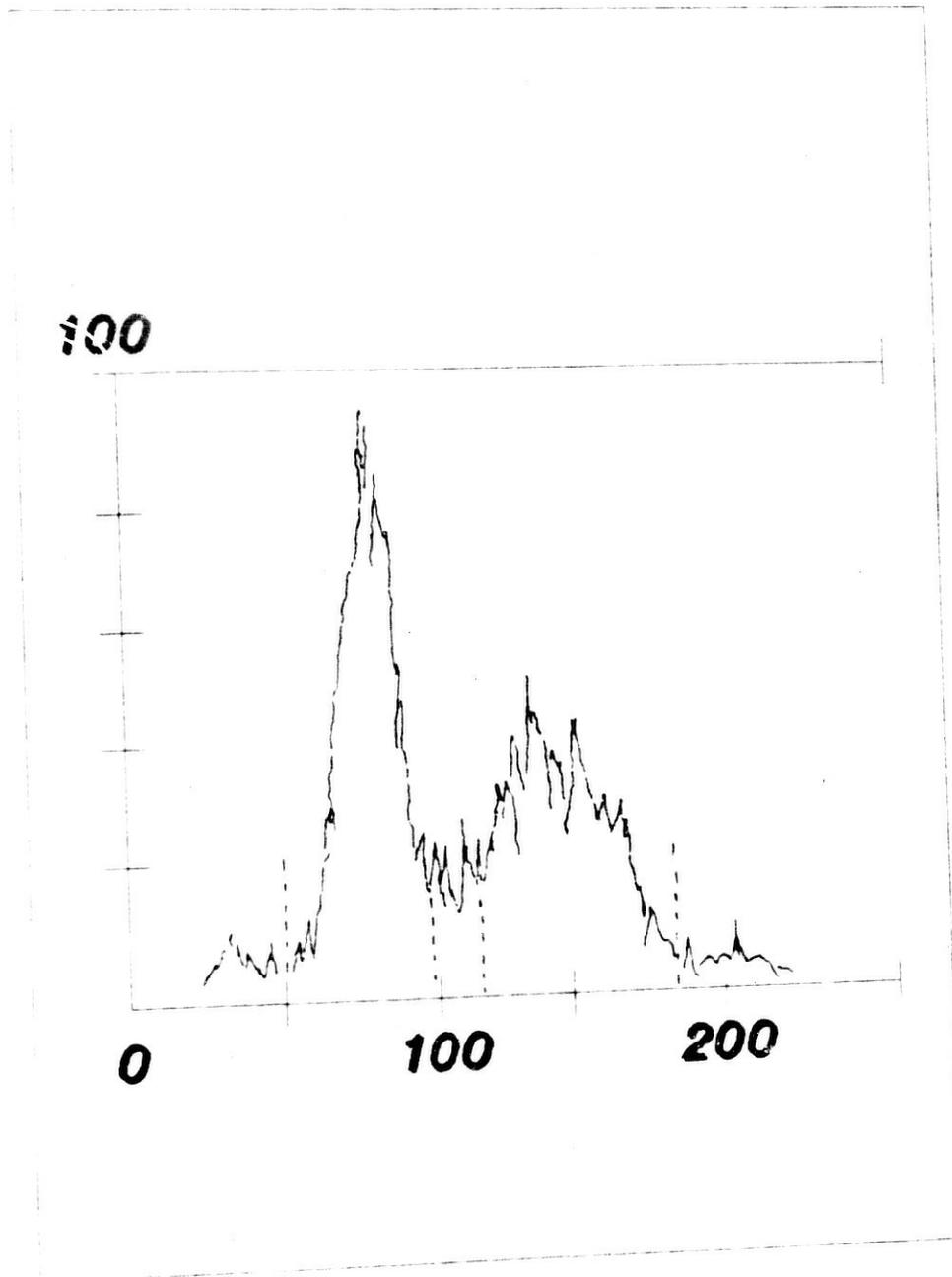
REPRESENTACION GRAFICA DE LA EXPRESION (FACSCAN) DEL EGFr DE LAS CELULAS SOMETIDAS A DIVERSOS FACTORES



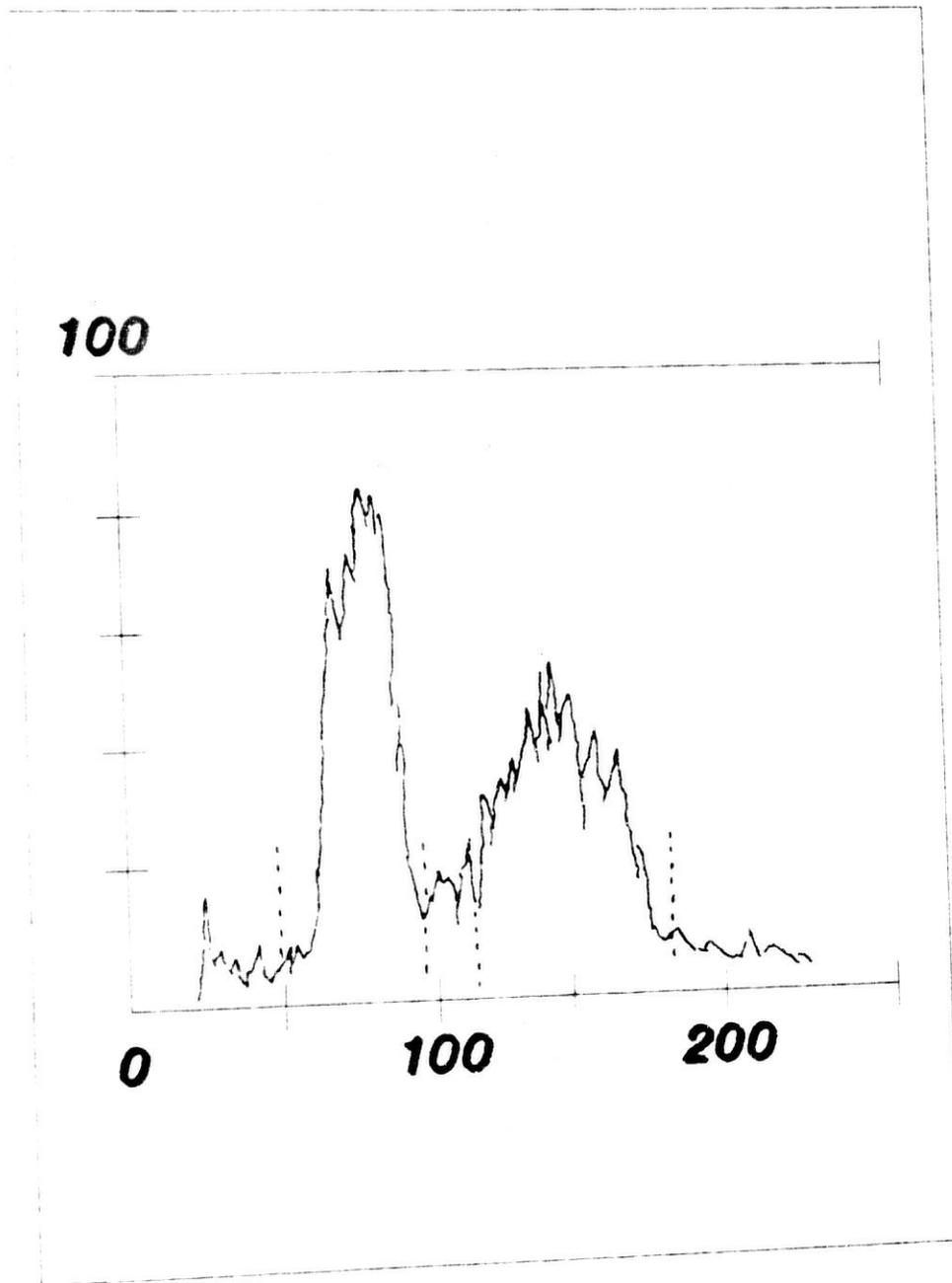
REPRESENTACION GRAFICA DEL TEST DEL CICLO CELULAR
ACTIVADO POR DIVERSAS SUSTANCIAS



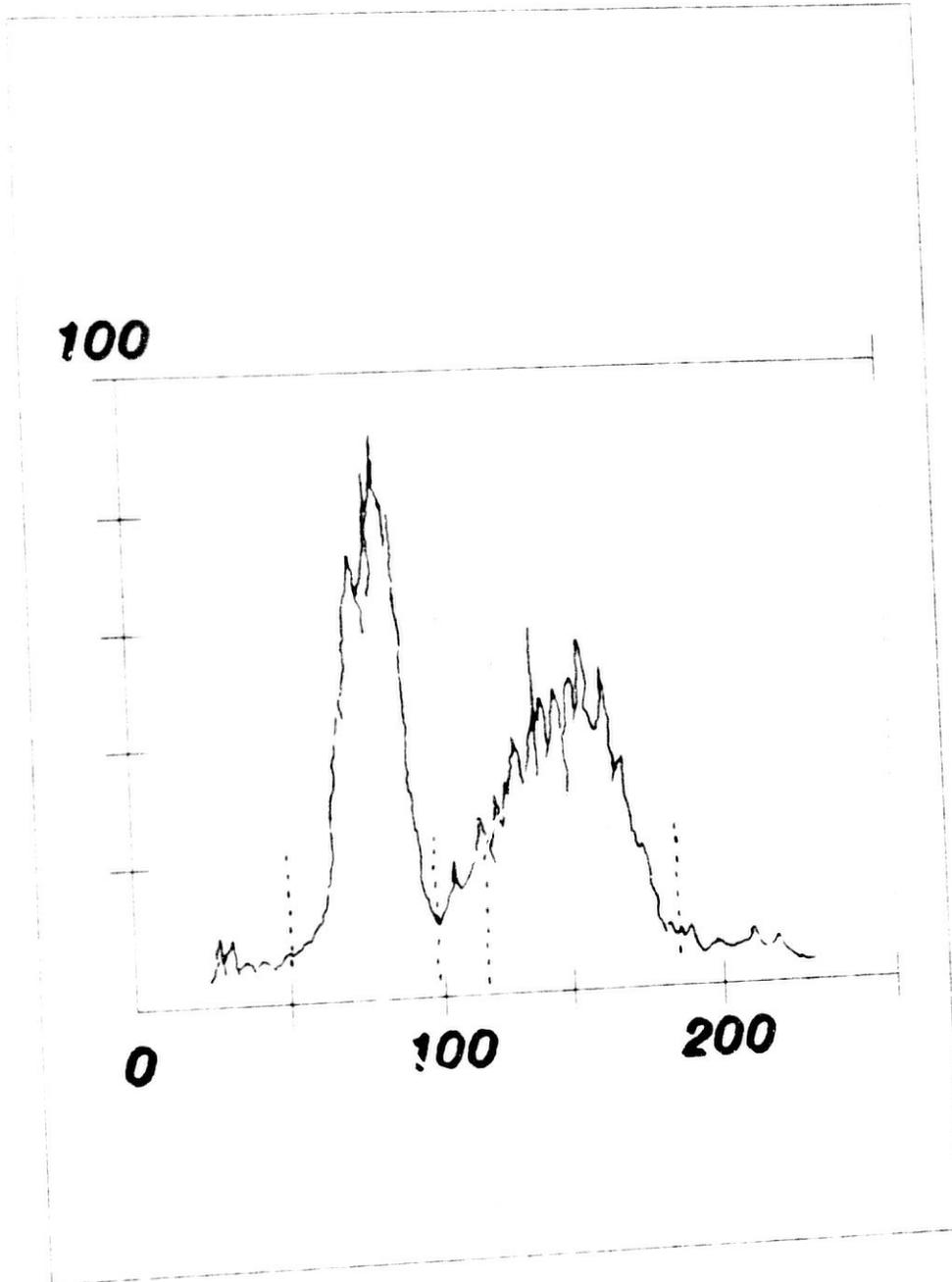
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(CELULAS TRATADAS CON EGF)



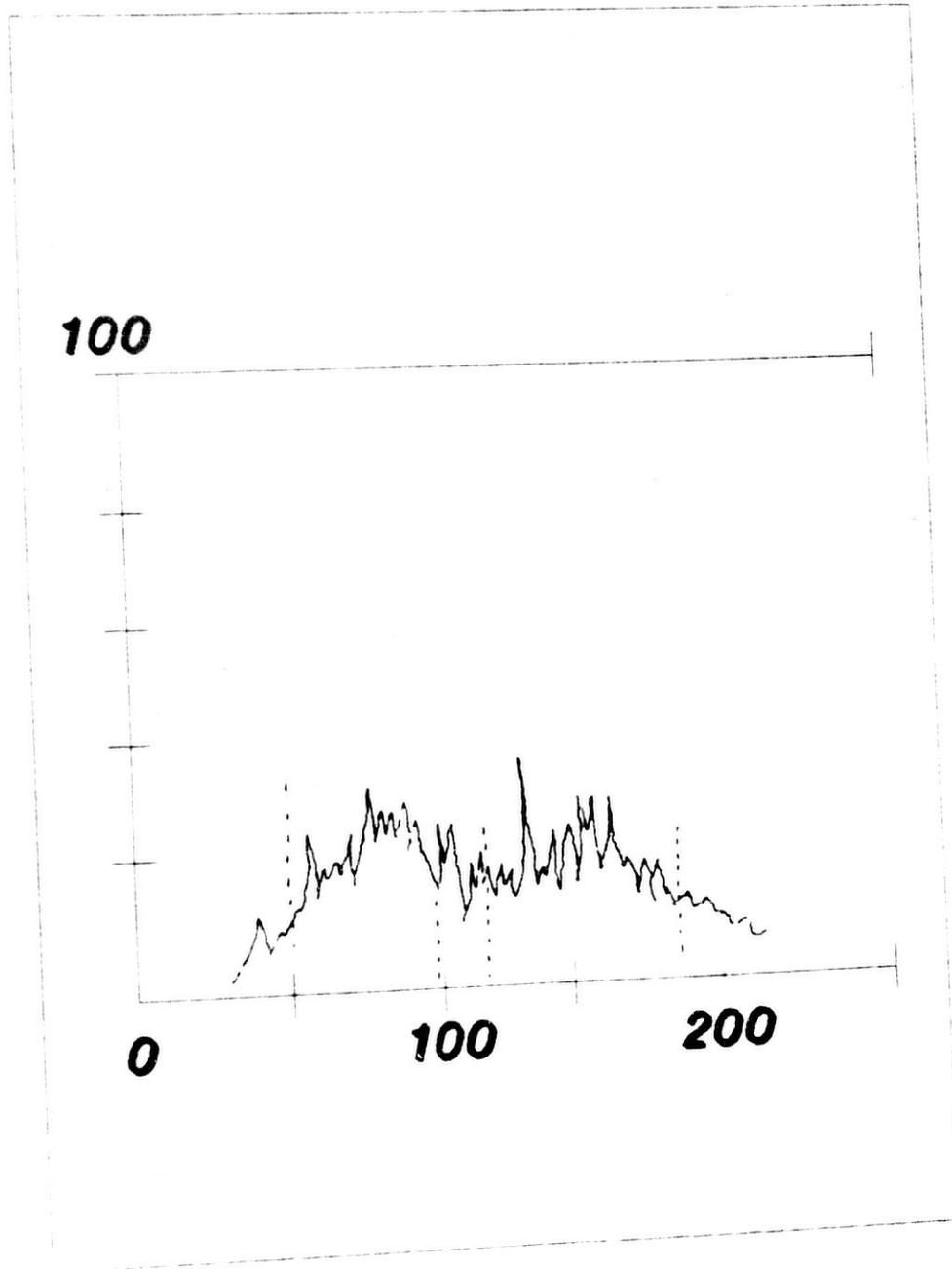
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(CELULAS TRATADAS CON INSULINA)



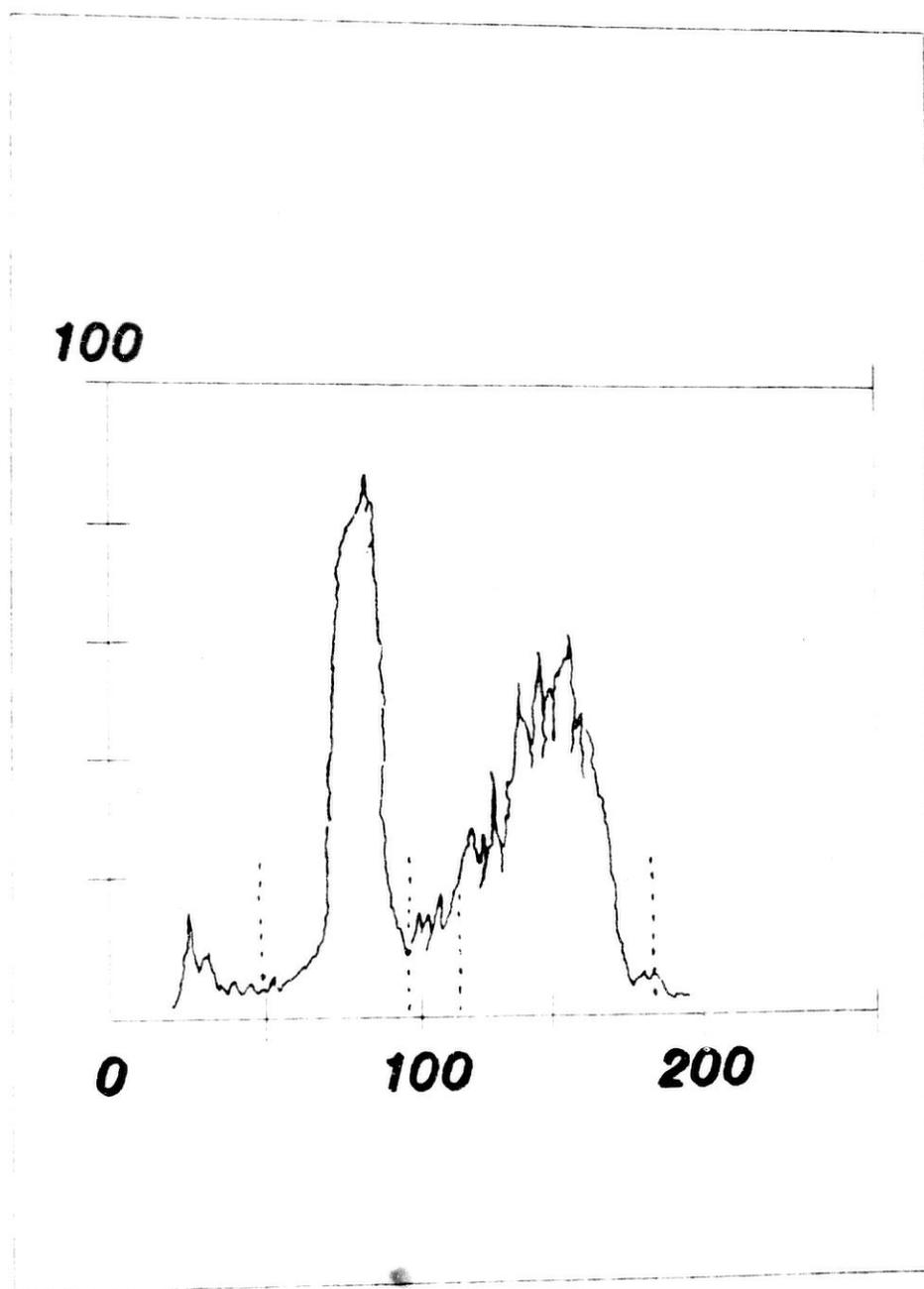
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(CELULAS TRATADAS CON FITOHEMAGLUTININA)



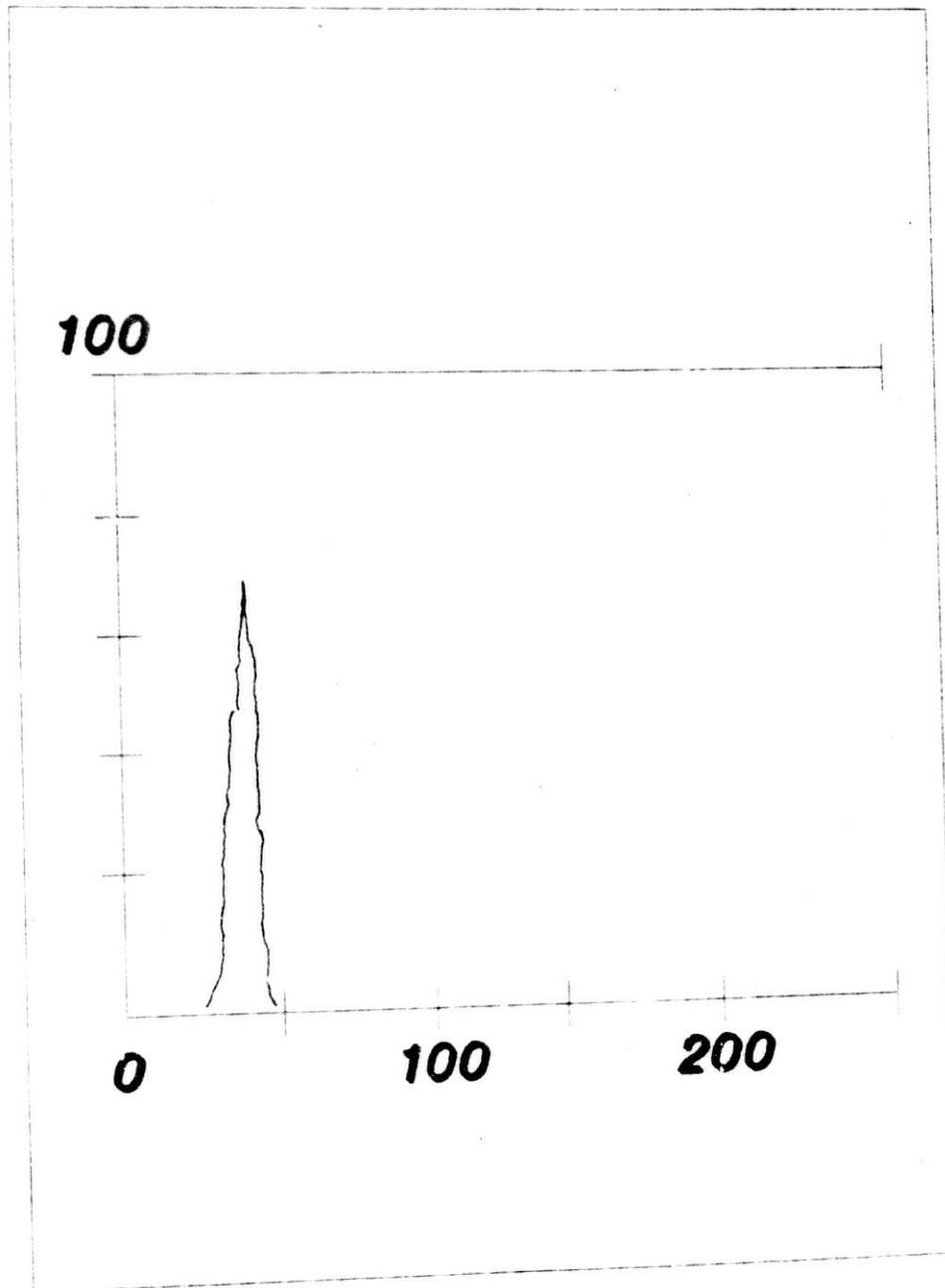
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(CELULAS TRATADAS CON γ - INTERFERON)



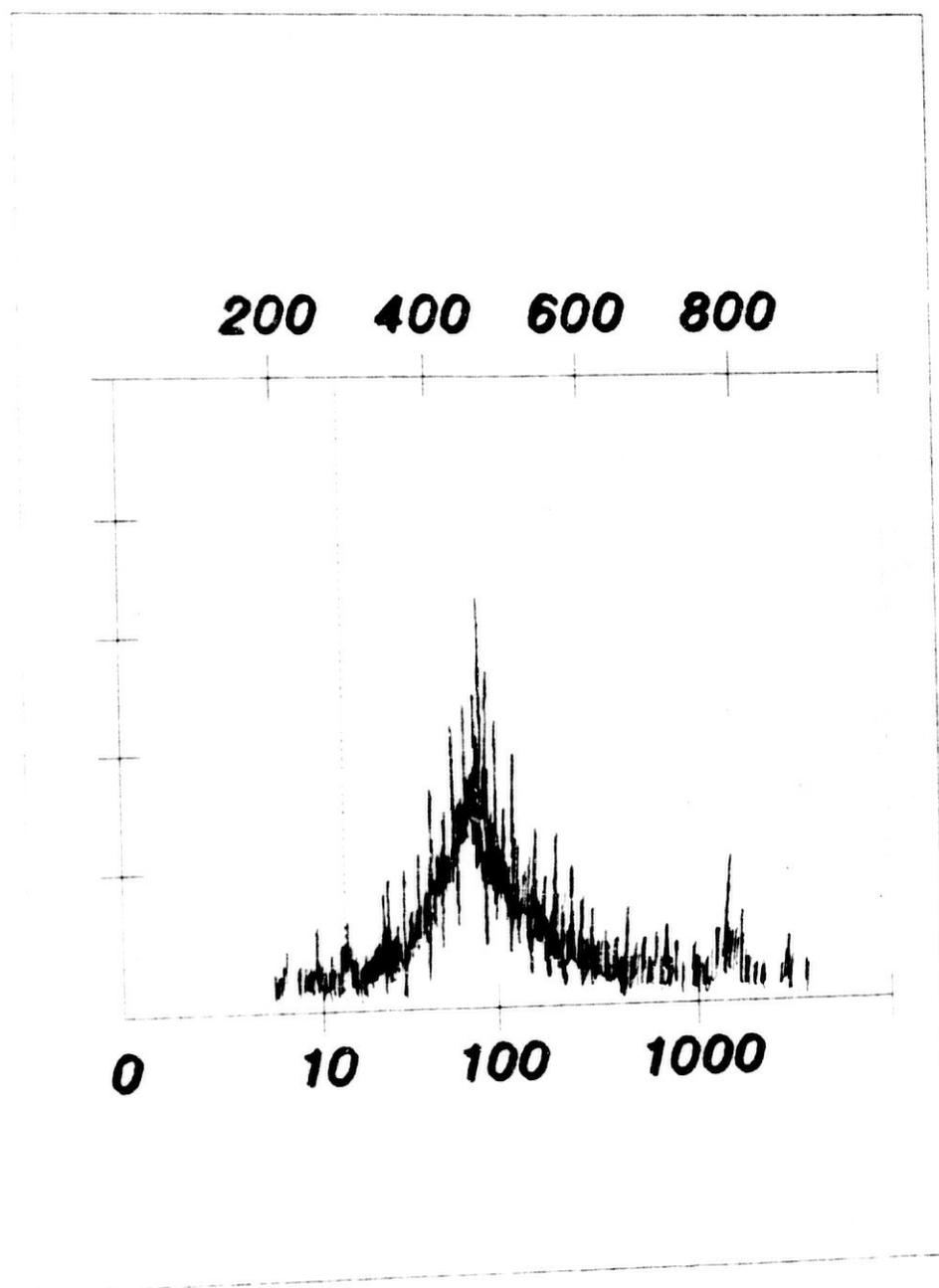
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(CELULAS CONTROL)



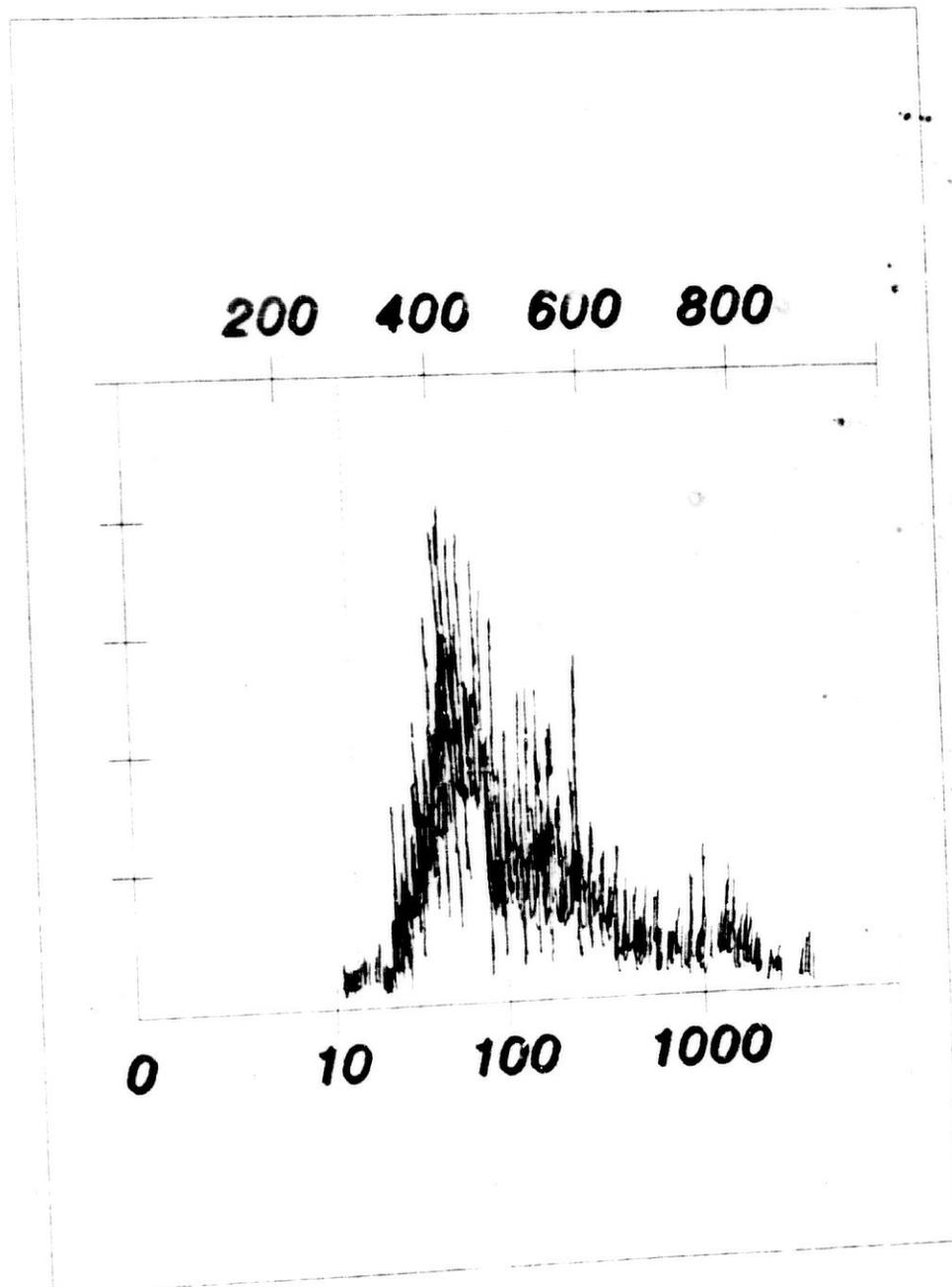
REPRESENTACION GRAFICA DEL CICLO CELULAR
(EJEMPLO DE CELULAS EN Go -Linfocitos-)



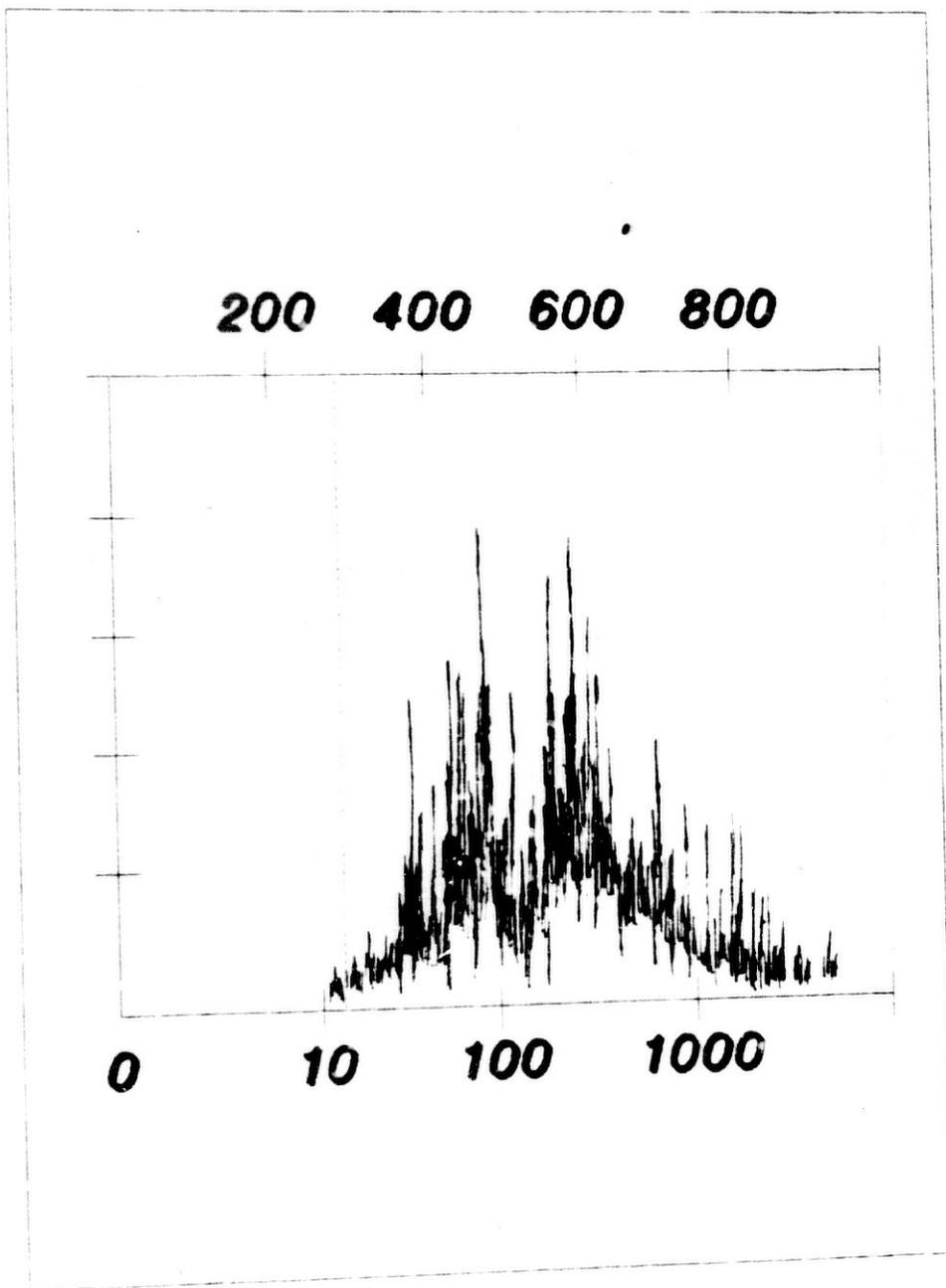
FACSCAN DEL EGFr EN CELULAS TRATADAS CON EGF



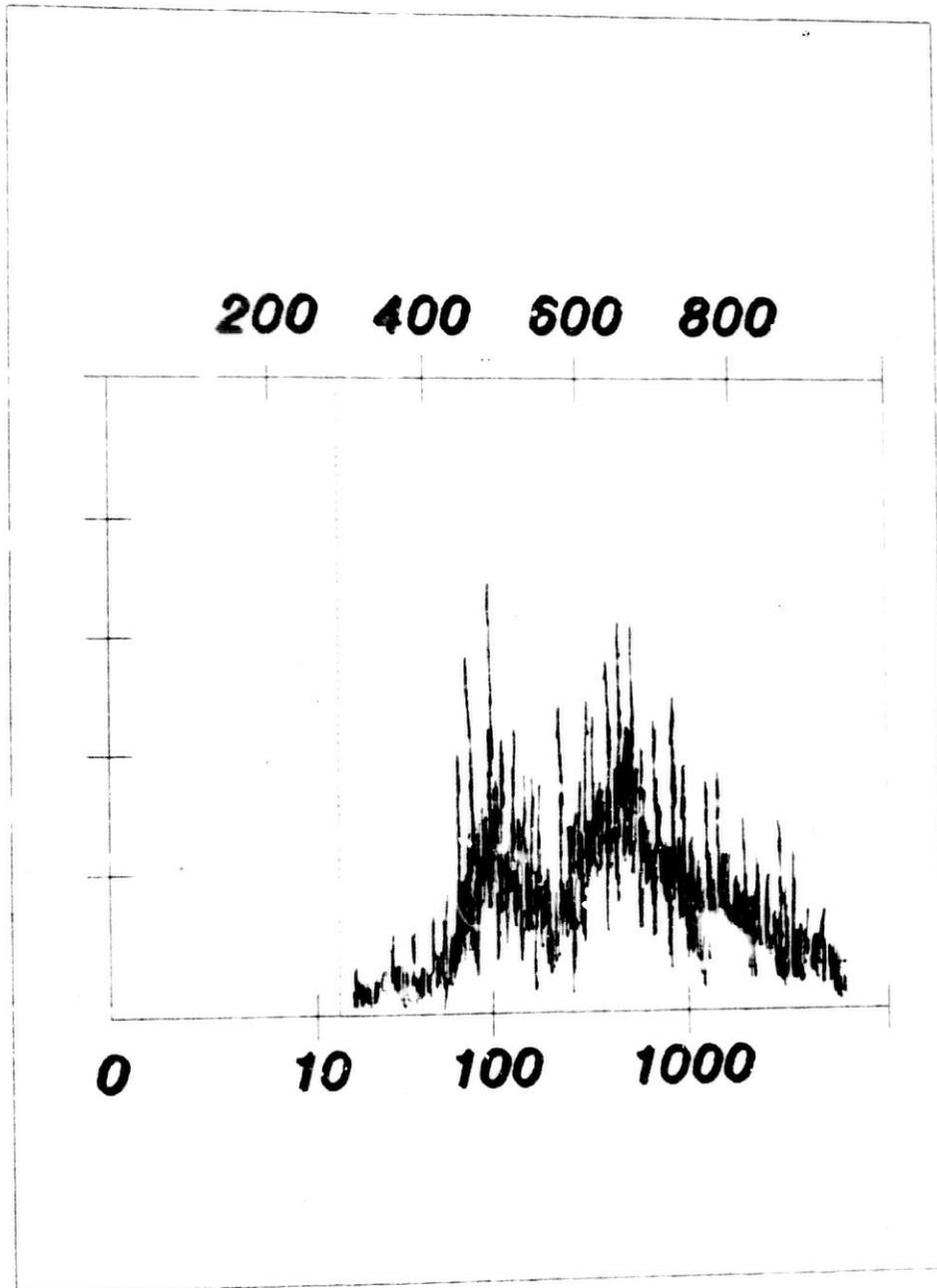
FACSCAN DEL EGFr EN CELULAS TRATADAS CON INSULINA



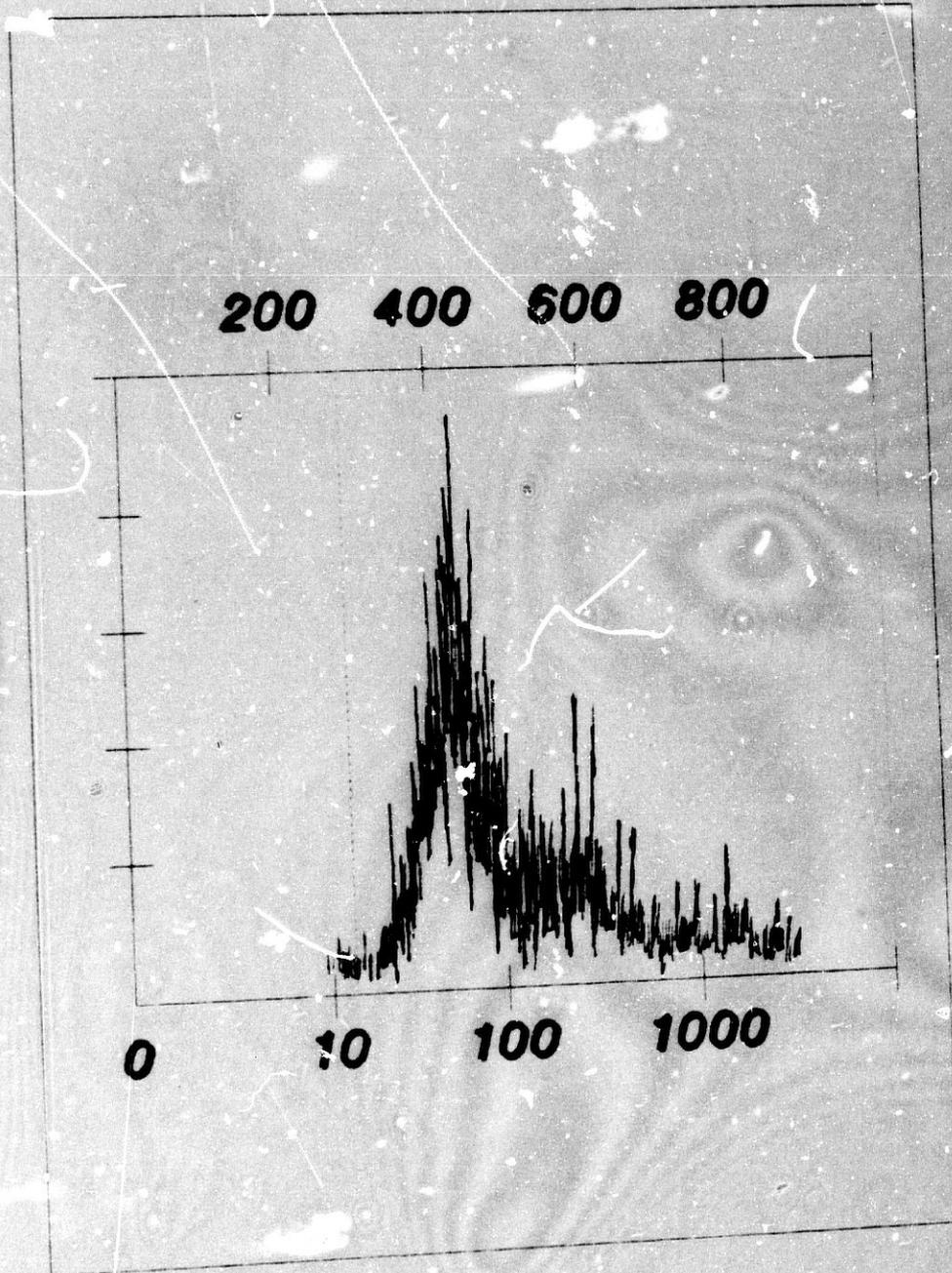
FACSCAN DEL EGFr EN CELULAS TRATADAS CON
FITOHEMAGLUTININA



FACSCAN DEL EGFR EN CELULAS TRATADAS CON γ -INTERFERON



FACS CAN DEL EGFR EN LAS CELULAS CONTROL



DISCUSSION

V.A.- CONSIDERACIONES GENERALES

El receptor del factor de crecimiento epidermal fue aislado por primera vez en 1.980 con la utilización de la afinidad cromatografica [1].

En 1.984, un análisis secuencial del EGFr [9] permitió la clonación del DNA del receptor y la deducción de la secuencia de aminoácidos de la molécula entera [10].

El conocimiento de los factores reguladores de la proliferación celular ha tenido grandes descubrimientos en las dos últimas décadas. Si bien el completo conocimiento de estos procesos queda aún lejano, los mecanismos bioquímicos y las estructuras moleculares han presentado notables avances.

En estos momentos se conocen a fondo unas 20 proteínas que actúan como factor de crecimiento, estimulando la proliferación celular, no conociéndose las modificaciones que estas producen en los receptores después de la estimulación.

No existe una relación clara entre la variación del número de receptores del EGF y la aparición de procesos cancerosos.

Las variaciones que experimenta el EGFr a lo largo del desarrollo embrionario, y la relación entre las células embrionarias más primitivas con las tumorales, son estudios que se encuentran en la actualidad en sus inicios.

De este modo, los objetivos quedaron bien claros, y comenzamos a trabajar sobre ellos, siendo esta Memoria reflejo de los resultados conseguidos.

V.B.- ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) EN CORTES DE BIOPSIAS MUSCULARES HUMANAS.

En esta primera etapa del trabajo se trata de poner de manifiesto la existencia del receptor (EGFr) en diversos tipos de células musculares no cancerosas:

- Musculatura Estriada
- Musc. Lisa
- Musc. Cardíaca

La expresión resultó positiva, no apreciándose variaciones significativas entre los diversos tipos de células musculares entre sí, y demostrándose la presencia del EGFr en la células musculares.

Además, se comprueba la existencia en células no epiteliales y que tampoco son cancerosa. Confirmando la hipótesis existente de que el EGFr es un receptor que existe no sólo en las células epiteliales sino también en otros tejidos.

V.C.- EXPRESION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) EN CELULAS MUSCULARES CULTIVADAS EN "SHELL-VIAL"

Para observar mejor la expresión del EGFr se realizó el cultivo en "shell-vial" de células de rabdomiosarcoma (R.D) y también células cardíacas de embrión de pollo.

Se escogen este tipo de células por presentar gran actividad celular, y suponer que la expresión del EGFr sería mayor.

La expresión en ambos casos resultó muy positiva, confirmando nuestra hipótesis anterior.

V.D.- MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMAL (EGFr) EN CELULAS MUSCULARES (HUMANAS)
TUMORALES Y NO TUMORALES

Existe una mayor expresión del EGFr en las células tumorales (MFi de 740) sobre las no tumorales (MFi de 715), lo cual parece estar en relación con una mayor actividad celular (multiplicación).

Un fenómeno parecido sucede con las células embrionarias más primitivas, donde también se produce un incremento del EGFr.

El desarrollo embrionario temprano muestra semejanzas con la proliferación de algunos tumores. Los marcadores oncogénicos tumorales se expresan normalmente durante la embriogénesis ordenada [30,31].

En la células tumorales se observa una expresión elevada del EGFr en una gran mayoría de los casos [81,104-106]. Para Moller [82] existe una disminución muy marcada del EGFr, la cual relaciona con una desdiferenciación celular con un empobrecimiento de sus estructuras.

En diversos estudios realizados sobre células con diferente grado de expresión del EGFr, se ha observado una amplia variación del potencial tumorigeno.

Las variantes que tienen un elevado número de EGFr son potencialmente más susceptibles de ser tumorales en un período de tiempo menor que aquellas otras con menor número de receptores [15,81,82,104,107,108].

Para Gill y Bertics [15], existe una relación directa entre el crecimiento tumoral y la concentración del EGFr. Sin embargo, el papel del EGFr en la génesis tumoral queda todavía sin aclarar, ya que algunos autores no comparten esta relación entre el receptor del factor de crecimiento epidermal y los tumores (EGFr/Tumor).

Para Ulrich y Meenhard no existe correlación entre la expresión del EGFr y el crecimiento celular [21], opinión compartida por Reifenberger [108].

En conclusión, podemos decir que para una gran mayoría de autores y según nuestras nuestros resultados la expresión del EGFr en las células tumorales es mayor que en las no tumorales.

V.E.- MODULACION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) EN LAS CELULAS CARDIACAS DE EMBRION DE POLLO A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

La expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) parte de niveles muy elevados, para ir decayendo progresivamente conforme avanza el desarrollo (MFi de 491, 471, 431 y 391).

Considerando a la Desmina como un marcador de la diferenciación celular a lo largo del desarrollo, se puede apreciar como la fluorescencia media inducida (MFi) va aumentando progresivamente a lo largo del desarrollo [110].

Estadios (H.H)	DESMINA	EGFr
17	180	491
25	350	471
35	450	431
40	460	391

Los miocardiocitos van incrementando la presencia de Desmina a partir del estadio 25 H.H , siendo éste el que define en el tiempo el comienzo de la expresión del Filamento Intermedio (FI), tan relacionado con la función contráctil.

El aumento de expresión de la Desmina y la disminución del número de EGFr, parece estar relacionado con una mayor diferenciación y una menor multiplicación celular.

Según los estudios realizados por Adamson en embriones de ratón, el número de receptores del EGFr por unidad de tejido va aumentando progresivamente hasta el final de la gestación [111,63].

En el feto humano se ha identificado al EGFr muy al principio del desarrollo en diversos tejidos [64,65].

Existe una notable semejanza entre las células embrionarias primitivas y las células cancerosas en relación al EGFr, pudiéndose apreciar un aumento de expresión en ambas.

V.F.- RELACION ENTRE LAS MODIFICACIONES EN LA EXPRESION DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFr) Y SUS REPERCUSIONES EN EL CICLO CELULAR

Las células tratadas con Insulina han presentado una disminución del número de receptores (EGFr), sin sufrir alteraciones en el ciclo celular.

La estimulación con Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) produce un aumento de los receptores (EGFr), así como modificaciones del ciclo celular donde encontramos un aumento en las fases de crecimiento celular (G1) y de síntesis (S). No se observan variaciones en la fase de multiplicación (G2/M).

Para Ulrich y Meenhard el crecimiento de los cultivos celulares (WM 239-A) es significativamente más alto en aquellos que tenían uno o varios factores de crecimiento, además de no establecerse relación directa entre la expresión del EGFr y la estimulación del crecimiento. Sin embargo, el EGF inhibió el crecimiento de las células (A-431), las cuales presentan un alto número de EGFr en su superficie. La inhibición del crecimiento fue acompañada por alteraciones en la distribución del ciclo celular [21].

Para Werner el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) estimula la síntesis del DNA y la división de la glia normal, inhibiendo el crecimiento en las células carcinomatosas (expresan un número elevado de EGFr). Existiendo la posibilidad de utilización terapéutica [107].

En contra de estas opiniones, otros autores creen como se ha visto anteriormente que existe una relación directa entre el crecimiento celular y su concentración de EGFr.

Los resultados obtenidos con el crecimiento de células A-431 en ratones atímicos, se corresponde con los obtenidos por medio de cultivo celular, en donde la proliferación celular es altamente proporcional a la concentración del EGFr [110].

La Fitoheماغlutinina (PHA) ha aumentado la expresión del EGFr y no se han producido variaciones apreciables del ciclo. En contra de lo que en un principio se podía esperar, no se ha producido un aumento de las mitosis (27% G2/M con la PHA y un 31% G2/M en las células Control).

Los Interferones (α , β y γ) son glucoproteínas que promueven la diferenciación celular e inhiben el crecimiento. Nosotros hemos utilizado el γ -Interferón (γ -IFN), produciéndose las diferencias más significativas con respecto a las células control. Aumenta de forma considerable el número de receptores (EGFr) y se modifica el ciclo. Disminuye la fase de crecimiento (G1) y la multiplicación (G2/M) y aumenta la síntesis (S).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Karasaki y Jaken, para los cuales el tratamiento con γ -Interferón produce una disminución de la expresión del EGFr [109].

En conclusión, podemos decir que no se puede establecer una relación directa entre la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) y el crecimiento celular, ya que como hemos visto el aumento significativo de receptores no ha conllevado un aumento paralelo del crecimiento. En el caso contrario tampoco, es decir, la disminución de receptores (EGFr) no produce una disminución significativa del crecimiento celular.

En las células tumorales y embrionarias más primitivas, además del aumento de la multiplicación, la mayor expresión del EGFr debe estar relacionado también con fenómenos de indiferenciación celular.

CONCLUSIONES

Las Conclusiones a las que se han llegado después de la realización de esta Memoria, son las siguientes;

- 1) Se puede observar el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) en los diversos tipos de células musculares. No apreciándose diferencias entre ellas.
- 2) La expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFr) en las células musculares tumorales y no tumorales, presenta alteraciones significativas. Las células tumorales tienen una expresión mayor del EGFr.
- 3) El receptor del factor de crecimiento epidermal sufre un proceso de modulación a lo largo del desarrollo embrionario. La expresión del EGFr va disminuyendo con la diferenciación celular.
- 4) Existe una relación entre las fases más primitivas del desarrollo embrionario y las células neoplásicas. En ambas se muestra una mayor expresión del EGFr.
- 5) No se puede establecer una relación directa entre la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal y el crecimiento celular.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cohen S, Carpenter G, King L.
Epidermal Growth Factor Receptor Protein Kinase Interactions. *J. Biol. Chem.* 1980;255:4834-42
- 2) Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C.
Proteolytic Cleavage of Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 1982;257:1523-31
- 3) Hock R, Nexø E, Hollenberg M.
Solubilization and Isolation of the Human Placenta Receptor for Epidermal Growth Factor-Urogastrone. *J. Biol. Chem.* 1980;255:10737-43
- 4) Carpenter G, King L, Cohen S.
Rapid Enhancement of Protein Phosphorylation in A-431 Cell Membrane Preparations by Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 1979;254:4884-91
- 5) Carpenter G, King L, Cohen S.
Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 1978;276:409-10.
- 6) Mroczkowski B, Mosig G, Cohen S.
ATP--stimulated interaction between epidermal growth factor receptor and supercoiled DNA. *Nature* 1984;309:270-73.
- 7) Basu M, Frick K, Sen-Majumdar A, Scher CD, Das M.
EGF receptor-associated DNA-nicking activity is due to a Mr-100,000 dissociable protein. *Nature* 1985;316:640-41.

- 8) Thompson D, Cochet C, Chambaz E.
Separation and characterization of Phosphatidylinositol
kinase Activity that Co-purifies with the Epidermal Growth
Factor Receptor.
J. Biol. Chem. 1985;260:8824-30
- 9) Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G et al.
Close similarity of epidermal growth factor receptor and
v-erb-B oncogene protein sequences.
Nature 1984;307:521-27.
- 10) Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ.
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and
aberrant expression of the amplified gene in 431
epidermoid carcinoma cells.
Nature 1984;309:418-25.
- 11) Hunter T, Ling N, Cooper JA.
Protein Kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a
threonine residue close to the cytoplasmic face of the
plasma membrane.
Nature 1984;311:480-83.
- 12) Downward J, Parker P, Waterfield MD.
Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor
receptor.
Nature 1984;311:483-85.
- 13) Carpenter G.
Receptor for Epidermal Growth Factor and other
Polypeptide Mitogens.
Ann. Rev. Biochem 1987;56:881-914

-
- 14) Carpenter G, Cohen S.
Epidermal Growth factor.
Ann Rev Biochem 1979;48:193-216.
- 15) Gill G, Bertics P.
Epidermal growth factor and its receptors.
Molecular and Cellular Endocrinology 1987;51:169-186.
- 16) Gospodarowicz D.
Epidermal and nerve growth factors in mamalian
development.
Ann Rev Physiol 1981;43:251-63.
- 17) Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LD, Todaro GH.
Rat transforming growth factor type I: structure and
relation to epidermal growth factor.
Science 1984;223:1079-82.
- 18) Pike LJ, Kuenzel EA, Casnellie JE.
a comparison of the Insulin and Epidermal Growth Factor-
stimulated Protein Kinase from Human Placenta.
J Biol Chem 1984;259:9913-21.
- 19) Erneaux C, Cohen S, Garbers GL.
Separation and characterization of a
Phosphatidylinositol kinase Activity that Co-purifies
with the Epidermal Growth Factor Receptor.
J Biol Chem 1983;258:4137-42.
- 20) Yarden Y, Harari I, Schlessinger J.
Purification of an Active EGF Receptor Kinase with
Monoclonal Antireceptor Antibodies.
J Biol Chem 1985;260:315-19.
-

-
- 21) Ulrich R. Meenhard H.
Interactions Between Growth Factor Receptor and
Corresponding Monoclonal Antibodies in Human Tumours.
Journal of Cellular Biochemistry 1987;35:315-20
- 22) Sorokin A. Kornilova E.
Recycling of epidermal growth factor-receptor complexos
in A-431 cells.
Biochem Biophys Acta 1989;101(1):88-96
- 23) Yarden Y. Escobedo JA. Kuang W-J.
Structure of receptor for platelet-derived growth factor
helps define a family of closely related growth factor
receptors.
Nature 1986;323:226-32.
- 24) Van Wyck JJ. Underwood LE. D'Ercole AJ.
Role of somatomedin in cellular proliferation.
In: Ritzen M. Aperia A (Eds). Biology of normal human
growth. New-York: Raven Press 1981: 223-39.
- 25) Strain AJ. Hill DJ. Milner RDG.
Divergent action of transforming growth factor β on DNA
synthesis in human foetal liver cells.
Cell Biol Int Resp 1986: 10:855-60.
- 26) Kasselberg AG. Orth DN. Gray ME.
Immunocytochemical localization of human epidermal
growth factor/urogastrone in several human tissues.
J Histochem Cytochem 1985: 33:315-22.
-

-
- 27) Jenniche E. Oliverecraone H.
Transient expression of insulin-like growth factor I immunoreactivity in skeletal muscle cells during postnatal development in rat.
Acta Physiol Scand 1987; 131:619.
- 28) Skinner MK. Keski-Oja J. Osteen KG.
Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth.
Endocrinology 1987; 121:786-92.
- 29) Knecht M. Feng P. Catt K.
Bifunctional role of transforming growth factor- β during granulosa cell development.
Endocrinology 1987; 120:1243-9.
- 30) Mellersh H. Strain AJ. Hill DJ.
Expression of the protooncogenes c-H-ras and N-ras in early second trimester human fetal tissues.
Biochem Biophys Res Comm 1986;141:510-16.
- 31) Pfeifer-Ohlsson S. Rydnert J. Goustin AS.
Cell-type-specific pattern of myc proto-oncogene expression in developing human embryos.
Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:5050-4.
- 32) Gluckman PD. Liggings GC.
Regulation of fetal growth .
In: Beard RW. eds. Fetal physiology and medicine 2nd Edn. New-York: Marcel Dekker Inc. 1984: 511-58.
- 33) Simpsons ER. MacDonald PC.
Endocrine physiology of the placenta.
Ann Rev Physiol 1981;43:163-88.
-

- 34) Birbeck JL.
Fetal growth and endocrinology.
In: Brook CGD, ed. Clinical paediatric endocrinology 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1981:334.
- 35) Polani PE.
Chromosomal and other genetic influences on birth weight variation.
In: Elliot K, eds. Size and birth. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica-North Holland. 1974:127-59.
- 36) Barth EM, Korsching S, Thoenen H.
Regulation of nerve growth factor synthesis and release in organ cultures of rat iris.
J Cell Biol 1984; 99: 839-43.
- 37) Smidt D, Steinbach J, Scheven B.
Die beeinflussung der pra- und postnatalen entwicklung durch grosse und korperge wicht der mutter. largestella an ergebnissen reziproker eitranplantationen zwischen zwergschweinen und grossen haussch weinen.
Monatsschr Kinderheilkd 1967;115:533-45.
- 38) Canfield RE, Morgan FJ.
Studies of human chorionic gonadotropin.
Rec Prog. Horm Res 1971;27:121-64.
- 39) Hennen GP, Freychet P.
Human chorionic thyrotropin.
Its relation to thyroid stimulators from chorionic neoplasma and nonendocrine cancers.
Israel J Med Sci 1974; 10:1332-47.

- 40) Josimovich JB, Levitt MJ.
Human chorionic somatomammotropin (hCS). I. Purification and biochemical characterization. In: Berson SA, Yalow RS, eds. Methods in investigative and diagnostic endocrinology. Vol. 2B. Amsterdam: North Holland, 1973:787.
- 41) Shambaugh G, Kubek M, Wilber JF.
Thyrotropin-releasing hormone activity in the human placenta.
J. Clin Endocr Metab 1979;48:483-6.
- 42) Siler-Khodr TM, Khodr GS.
Luteinizing hormone releasing factor content of human placenta.
Am J Obstet Gynecol 1978; 130:216-19.
- 43) Watkins WB, Yen SC.
Somatostatin in cytotrophoblast of the immature human placenta: localization by immunoperoxidase cytochemistry.
J Clin Endocr Metab 1980;50:969-71.
- 44) Barsh GS, Seeburg PA, Gelinas RE.
The human growth hormone gene family: Structure and evolution of the chromosomal locus.
Nucleic Acid Res 1984;11:3939-58.
- 45) De Noto FM, Moore DD.
Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: Possible alternative splicing.
Nucleic Acid Res 1981;9:3719-30.

-
- 46) Hizuka N. Hendricks CM.
Properties of human growth hormone polypeptides:
purified from pituitary extracts and synthesized in
monkey kidney cells.
J Clin Endocr Metab 1982;55:545-50.
- 47) Grumbach MM, Kaplan SL.
Ontogenesis of growth hormone, insulin, prolactin and
gonadotropin secretion in the human fetus.
In: Comline SR, Cross KW, eds. Foetal and neonatal
physiology. London: Cambridge University Press
1973:462-87.
- 48) Goodman HG, Grumbach MM.
Growth and growth hormone. II. A comparison of isolated
growth hormone deficiency and multiple pituitary hormone
deficiencies in 35 patients with idiopathic
hypopituitary dwarfism.
N Engl J Med 1968;278:57-68.
- 49) Lovinger RD, Kaplan SL.
Congenital hypopituitarism with neonatal hypoglycaemia
and microphallus. 4 cases secondary to hypothalamic
hormone deficiencies.
J Pediat 1975;87:1171-81.
- 50) Underwood LE, D'Ercole AJ.
Insulin and somatomedins/insulin like growth factors in
fetal and neonatal development.
Clin Endocr Metab 1984;13:69-89.
-

- 51) Hoath SB, Lakshmanan J.
Differential hormone response of epidermal growth factor concentration in the developing mouse. synergism of triiodothyronine and dexamethasone in epiderma maturation.
Life Sci 1983;32:2704-16.
- 52) Walker P, Weichsel ME.
Effect of the thyroxine, testosterone, and corticosterone on nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) concentrations in adult female mouse submaxillary gland: dissociation of NGF and EGF responses.
Endocrinology 1981; 109:582-7.
- 53) Walker P, Weichsel ME, Eveleth D.
Ontogenesis of nerve growth factor and epidermal growth factor in submaxillary glands and nerve growth factor in brains of immature male mice: correlation with ontogenesis of serum levels of thyroid hormones.
Ped Res 1982;6:520-4.
- 54) Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME.
Immunocytochemical localization of human epidermal factor/urogastrone in several human tissues.
J Histochem Cytochem 1985;33:315-22.
- 55) Oka Y, Orth DN.
Human plasma epidermal growth factor/ β -urgastrone is associated with blood platelets.
J Clin Invest 1983;72:249-59.

- 56) Cohen S.
Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal.
J Biol Chem 1962; 237:1555-62.
- 57) Al-Nafussi AL, Wright NA.
The effect of epidermal growth factor (EGF) on cell proliferation of the gastrointestinal mucosa rodents.
Virchows Archivs B Cell Pathol 1982;40:63-9.
- 58) Raisz LG, Simmons HA, Sandberg AL.
Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor.
Endocrinology 1980;107:270-3.
- 59) Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R.
Transforming growth factor- α : a more angiogenic mediator than epidermal growth factor.
Science 1986;232:1250-3.
- 60) Ibbotson KJ, Twardzik DR, D'Souza SM.
Stimulation of bone resorption in vitro by synthetic transforming growth factor- α .
Science 1985;228:1007-9.
- 61) De Larco JE, Todaro GJ.
Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells.
Proc Natl Acad Sci USA 1978;75:4001-5.

-
- 62) Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE.
Transf. mig growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.
Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:5258-62.
- 63) Adamson ED, Meek J.
The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development.
Devl Biol 1984;103:62-70.
- 64) O'keefe E, Hollenberg MD, Cuatrecasas P.
Epidermal growth factor: characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta and other tissues.
Arch Biochem Biophys 1974;164:518-27.
- 65) Roa CV, Carman FR, Ghegini N, Schultz GS.
Binding sites for epidermal growth factor in human fetal membranes.
J Endocr Metab 1984;58:1034-42.
- 66) Grove RI, Pratt RM.
Influence of epidermal growth factor and cyclic AMP on growth and differentiation of palatal epithelial cells in culture.
Devl Biol 1984;106:427-37.
- 67) Blakely DM, Brown KD, Carr J.
Stimulation of cell growth by peptide growth factors in human mammary secretions.
J Physiol 1986;371:206.
-

-
- 68) Berdmore JM, Richards RC.
Milk epidermal growth factor concentrations in the mouse throughout lactation.
J Endocr 1983;96:287-92.
- 69) Byyny RL, Orth DN, Cohen S.
Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents.
Endocrinology 1974;95:776-82.
- 70) Hirata Y, Orth DN.
Epidermal growth factor (urogastrone) in human tissues.
J Clin Endocr Metab 1979;48:667-72.
- 71) Read LC, Upton FM, Francis GL.
Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation.
Ped Res 1984;18:133-9.
- 72) Rall LB, Scott J, Bell GI, et al.
Mouse pre-pro-epidermal growth factor synthesis by kidney and other tissues.
Nature, Lond 1985;313:228-31.
- 73) Gresik EW, Van der Noen H, Barka T.
Transport of ¹²⁵I-labelled epidermal growth factor into milk and the effect of sialoadenectomy on milk EGF in mice.
Am J Physiol 1984;247:E349-54.
- 74) Shing YW, Klagsbrun M.
Human and bovine milk contain different sets of growth factors.
Endocrinology 1984;115:273-82.
-

-
- 75) Baxter RC, Zaltsman A, Turtle JR.
Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk.
J Clin Endocr Metab 1984;58:955-59.
- 76) Francis GL, Read LC, Ballard FJ.
Purification and partial sequence analysis of insulin-like growth factor-I from bovine colostrum.
Biochem J 1986;233:207-13.
- 77) Corps AN, Blakely DM, Carr J.
Synergistic stimulation of Swiss mouse 3T3 fibroblasts by epidermal growth factor and other growth factors in human mammary secretions.
J Endocr 1987;112:151-9.
- 78) Hill DJ, Strain AJ.
Growth factor in embriogenesis. In: Clarke J. (ed).
Oxford Reviews of Reproductive Biology. Oxfrd: Oxford University Press. 9;398-455.
- 79) Cowley G, Smith JA, Gusterson B.
The amount of EGF receptor is elevated on squamous cell carcinomas.
Cancer Cells 1984;1:5-10.
- 80) Libermann TA, Nusbaun HR, Razon N.
Amplification, enhanced expression and posible rearrangement of EGF receptorgene in primary human brain tumours of glial origin.
Nature 1985;313:144-47.
-

-
- 81) Veale D, Kerr N.
Characterization of epidermal growth factor receptor in primary human non-small cell lung cancer.
Cancer Res 1989;49(5):1313-17.
- 82) Moller P, Mechtersheimer G.
Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumours of the breast.
Virchows Arch 1989;414(2):157-64.
- 83) Barski G, Sorieul S, Cornefert F.
Production dans les cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de cellules de caractere "hybride".
C R Acad Sci (D) Paris 1960;251:1825.
- 84) Kohler G, Milstein C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 1975;256:495-97.
- 85) Gey GO.
An improved technique for massive tissue culture.
Amer J Cancer 1933;17:752-56.
- 86) Hamburger V, Hamilton HL.
A series of normal stages in the development of the chick embryo.
J Morphol 1951;88:49-92.
- 87) Zaroff L, Sato GH, Mills SE.
Single-cell plating from freshly isolated mammalian tissue.
Exp Cell Res 1961;23:565-75.
-

-
- 88) Gonzalez FJ, Aránega AE, Vélez MC.
Establishing secondary cultures of embryonic myocardial cells.
Eur Arch Biol 1990;101:359-67.
- 89) Moscona A, Moscona H.
The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of early embryo.
J Anat 1952;86:287-301.
- 90) Moscona AA.
Cell suspension from organ rudiments of chick embryos.
Exp Cell Res 1952;3:535-39.
- 91) Murphy RA.
Contraction of muscle cells. In: Berne, R.M. and Levy, M.N. (eds): Physiology. St. Louis, C.V. Mosby 1983, 359-386.
- 92) Murphy E, Aiton JF, Russell C, Lieberman H.
Calcium elevation in cultured heart cells: its role in cell injury.
Am J Physiol 1983;245:3316,321.
- 93) Cole RI, Paul J.
The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells.
J Embryol Exp Morphol 1966;15:245-60.
- 94) Gonzalez FJ, Aránega AE.
Influence of fibric acid derivatives on intermediate filament proteins in myocardiocyte cultures.
Life Science 1991;48(11):1091-99.
-

- 95) Kaltenbach JP, Lyons WB.
Nigrosin as a dye differentiating and dead ascites cells.
Exp Cell Res 1958;15:112-17.
- 96) Sandford KK, Earle WR, Evans VI.
The measurement of proliferation in tissue cultures by
enumeration of cell nuclei.
J Natl Cancer Inst 1951;11:773.
- 97) Claycomb WC, Moses RL.
Culture of atrial and ventricular cardiac muscle cells
from adult squirrel monkey *Saimiri sciureus*.
Exp Cell Res 1985;161:95-100.
- 98) Springhorn JP, Claycomb WC.
Preproenkephalin mRNA expression in developing rat
heart and in cultured ventricular cardiac muscle cells.
Biochem J 1989;258:73-78.
- 99) Mendoza J, Navarro JM.
Evaluation of immunofluorescence, enzyme immunoassays
and the shell-vial assay for detection of two
respiratory syncytial virus.
Evr J Clin Microbiol 1991;10:40-42.
- 100) Claycomb WC, Pallazzo MC.
Cultured of the terminally differentiated adult cardiac
muscle cell: a light and scanning electron microscope
study.
Dev Biol 1980;80:466-82.

- 101) Surgnard-Khaskiye G, Le Dourin G.
Sensitivity of cultured chick embryo heart cells to acetylcholine evidence for nicotinic and muscarinic receptors.
Archiv Anat micr Morphol 1985;74(4):237-45.
- 102) Aránega A, Gonzalez FJ.
Primary cultures of human cardiac cells.
Cell Differentiation and Development 1989;27 (Suppl),597.
- 103) Aránega A, Contreras JA.
An improved method of Serchertis technique for *in vivo* marking of embryonic heart.
Arch Biol 1989;100:247-255.
- 104) Arita N, Ushio Y.
Distribution of epidermal growth factor receptor in glioma.
No to Shinkei 1988;40(6):575-9.
- 105) Kanamori A, Abe Y.
Epidermal growth factor receptors in plasma membranes of normal and diseased human thyroid glands.
J Clin Endocrinol Metab 1989;68(5):899-903.
- 106) Fiorelli G, De Bellis A.
Epidermal growth factor receptors in human hyperplastic prostate tissue and their modulation by chronic treatment with a gonadotropin-releasing hormone analog.
J Clin Endocrinol Metabol 1989;68(4):740-43.

-
- 107) Werner MH, Humphrey PA.
Growth effects of epidermal growth factor (EGF) and a monoclonal antibody against the receptor on four glioma cell lines.
Acta Neuropathol 1988;77(2):196-201.
- 108) Reifenberger G, Prior R.
Epidermal growth factor receptor expression and growth fraction in human tumours of the nervous system.
Virchows Arch 1989;414(2):147-55.
- 109) Karasaki Y, Jaken S.
Phorbol ester and interferon-gamma modulation of epidermal growth factor receptors on human amniotic (WISH) cells.
J Bio Chem 1989;264(11):6158-60.
- 110) Vélez C, Muros MA.
Coexpression of Intermediate Filament Proteins in the Chick Embryo Heart.
Acta Anat 1990;139:226-233.
- 111) Adamson ED, Deller MJ, Warshaw JB.
Functional EGF receptors are present on mouse embryo tissues.
Nature. Lond 1981;291:656-8.