

12/28

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE FACTORES LIPÍDICOS
INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN
CELULAR (FLIPC), DETECTADOS EN UN
LINFOMA T DE RATÓN



RAMÓN BORDÉS GONZÁLEZ

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA
Estante <u>113</u>
Tabla <u>1</u>
Núm. <u>19-6</u>

R. 29.563

T
10
157

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE FACTORES LIPIDICOS INHIBIDORES DE LA
 PROLIFERACION CELULAR (FLIPC), DETECTADOS EN UN
 LINFOMA T DE RATON.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
SALIDA { N.º <u>2.117</u>
{ Fecha <u>30 NOV. 1984</u>

Ramón Bordés González

Granada, Septiembre de 1984.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>61959138x</u>
Nº Copia <u>121168411</u>



Tesis Doctoral, dirigida por el Prof. Dr. D. Carlos Osorio Peláez, Catedrático de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, y por el Prof. Dr. D. Enrique García Olivares, Profesor Titular del mismo Departamento. Fué leída el 16 de Noviembre de 1.984, ante el Tribunal formado por los Profesores: López Aparicio; Osorio Peláez; García Peregrín; Garrido Torres-Puchol; García Olivares. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

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

CERTIFICA: Que D. Ramón Bordés González, Licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Estudio de factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular (FLIPC), detectados en un linfoma T de ratón", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que designe la Facultad de Ciencias de Granada.

R. Bordés

Granada, a 8 de Septiembre de 1984

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

CERTIFICA: Que D. RAMON BORDES GONZALEZ, Licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral titulado "ESTUDIO DE FACTORES LIPI-
DICOS INHIBIDORES DE LA PROLIFERACION CELULAR (FLIPC),
DETECTADOS EN UN LINFOMA T DE RATON", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada por el Tribunal que designe la Facultad de Ciencias de Granada.

Granada a 8 de Septiembre de 1984

E. Garcia Olivares

Mi agradecimiento sincero a:

D. Carlos Osorio Peláez, por la oportunidad que me ha brindado en trabajar en su equipo de investigación y por su orientación en la realización de este trabajo.

Enrique Garcia Olivares, por su inapreciable ayuda y constante estímulo y preocupación para que este trabajo vea la luz.

Araceli Quintana Perez, por su inestimable colaboración en la mecanografía de esta memoria.

Todos aquellos, que con su estímulo o ayuda han facilitado mi labor.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A ISABEL

Las únicas verdades que sirven
son instrumentos que luego hay
que tirar.

Umberto Eco.

INDICE

I) INTRODUCCION

INTRODUCCION.....	1
ANEMIA.....	2
INMUNOSUPRESION.....	5
A) Antígenos tumorales: Aspectos generales.....	5
B) Demostración de los antígenos asociados al tumor.....	10
1) Método "in vivo".....	10
a) Pruebas de transplante.....	10
b) Transferencia adoptiva.....	11
2) Métodos "in vitro".....	12
a) Inmunidad mediada por células... ..	12
b) Técnicas serológicas.....	13
C) Tipos de antígenos tumorales.....	14
1) Neoantígenos.....	14
a) Asociados con tumores indu- cidos por carcinógenos químicos. ..	16
b) Asociados con tumores inducidos por virus.....	17
c) Asociados con tumores espontá- neos.....	19

	Pág.
2) Antígenos asociados a proteínas	
virales.....	20
a) Grupo específicos.....	21
b) Subgrupo específicos.....	21
c) Tipo específicos.....	22
3) Antígenos normales anormalmente	
expresados en las células tumorales..	22
a) Embrionarios.....	23
b) De diferenciación.....	24
c) De histocompatibilidad.....	25
D) Respuesta inmune frente al tumor.....	28
1) Linfocitos T.....	29
2) Anticuerpos y células K.....	32
3) Células NK.....	34
4) Macrófagos.....	36
5) Vigilancia inmune.....	37
E) Mecanismos de escape de células	
tumorales.....	39
1) Antigenicidad de las células	
tumorales.....	40
2) Inmunosupresión inducida por el tumor.	42
a) Liberación de TSTA.....	43
b) Formación de inmunocomplejos...	43
c) Desarrollo de células Ts.....	44
d) Liberación de factores blo-	
queadores.....	45

	Pág.
CRECIMIENTO CELULAR.....	56
A) Tejidos normales.....	57
1) Actividad proliferativa de los tejidos normales.....	57
2) Quiescencia y proliferación celu- lar. ("Stem Cells").....	58
B) Ciclo celular.....	61
1) Fases del ciclo celular.....	61
2) Bioquímica del ciclo celular.....	66
C) Factores reguladores del crecimiento celular.....	79
1) Agotamiento del medio.....	79
2) Inhibición por contacto.....	80
3) Poliaminas.....	81
4) Prostaglandinas.....	83
5) Chalconas.....	84
6) Hormonas y otros factores del crecimiento.. ..	86
7) Factores estimuladores del cre- cimiento.....	87
D) Crecimiento de la célula tumoral.....	95
1) Celulas madre ("Stem Cells") en el cancer.....	96



	Pág.
2) Transformación neoplásica "in vivo".....	96
3) Transformación neoplásica "in vitro".....	98
4) Factores reguladores del crecimiento y células tumorales.....	101
5) Ciclo celular en las células tumorales.....	105
6) Oncogenes.....	106

II) OBJETO DE LA TESIS

OBJETO DE LA TESIS.....	113
-------------------------	-----

III) MATERIAL Y METODOS

MATERIAL.....	114
A) Células y sueros sanguíneos.....	114
1) Animales.....	114
a) Células normales de ratón.....	114
b) Líneas celulares de ratón.....	114
c) Sueros sanguíneos animales.....	115
2) Humanos.....	115
a) Sangre.....	115
b) Células tumorales.....	116
B) Reactivos y disoluciones.....	116

	Pág.
C) Material instrumental.....	119
METODOS.....	121
A) Obtención de las células normales.....	121
1) Ratones.....	121
a) células de médula ósea.....	121
b) células peritoneales.....	122
c) células de bazo.....	122
2) Humanos.....	123
Aislamiento de linfocitos.....	123
B) Obtención de las células tumorales.....	124
1) Ratones.....	124
a) Células tumorales cultivadas.....	124
b) Células tumorales frescas.....	125
2) Humanos.....	126
C) Viabilidad, contaje y ajuste de las células obtenidas.....	126
D) Preparación del extracto crudo de cé- lulas tumorales.....	126
E) Tratamiento posterior del extracto crudo: Caracterización.....	128
1) Precipitación térmica.....	128
2) Diálisis.....	128

	Pág.
3) Determinación del contenido protéico (Método Bradford).....	130
4) Hidrólisis enzimática.....	133
5) Extracción lipídica.....	134
a) Tratamiento con etanol.....	134
b) Tratamiento con cloroformo..	134
6) Determinación del contenido li- pídico.....	135
7) Detección de poliaminas.....	135
8) Cromatografía.....	136
F) Preparación de extracto lipídico de bazo de ratón.....	138
G) Radioensayo.....	139
H) Expresión de la actividad de los extractos.....	140
I) Método estadístico.....	142

IV) RESULTADOS

RESULTADOS.....	143
-----------------	-----

V) DISCUSION

DISCUSION.....	235
- Prólogo.....	235
- Caracterización del factor/es inhibidor del extracto de MCG3.....	238
- Mecanismo de acción. Posible función biológica.....	251

Pág.

VI) CONCLUSIONES

CONCLUSIONES..... 262

VII) BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA..... 263

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Los efectos de la enfermedad neoplásica, en individuos afectados por ésta, son múltiples y polimorfos. Además de los efectos directos del tumor sobre los tejidos que invade y metastatiza, existen una serie de alteraciones determinadas, indirectamente, por las células tumorales y que denominamos genéricamente como síndrome paraneoplásico. Este síndrome incluye una gran variedad de signos y síntomas producidos, en su mayoría, por factores solubles secretados por el tumor que, a través del torrente circulatorio, actúan sobre tejidos lejanos. De entre estos signos y síntomas, nos ocuparemos del estudio de anemias y de inmunosupresión, que aparecen en los estados avanzados de la neoplasia. (PESSINA y Col., 1.982)

Finalmente, se tratará del crecimiento celular normal y neoplásico, así como de los diversos factores relacionados con éstos.

ANEMIA

Es un hecho frecuente en los estados avanzados de cancer y a veces el primer signo que nos indica la posibilidad de una enfermedad neoplásica, el estado anémico de los pacientes.

La mayoría de las veces, la anemia es debida a una invasión o metástasis de la médula ósea por parte de las células tumorales que van a inhibir directamente la eritropoyesis.

En otras ocasiones, las células tumorales actuarán indirectamente, consumiendo excesivamente vitamina B₁₂ y ácido fólico, factores esenciales para el desarrollo de las células hematopoyéticas.

Los macrófagos, crónicamente activados por la enfermedad neoplásica, pueden captar una excesiva cantidad de hierro, determinando una ferropenia que también contribuiría al estado anémico (HAURANI y col., 1.963).

Otros autores han detectado en las neoplasias, niveles séricos descendidos en eritropoyetina (DAINIYAK y col., 1.983) o un defecto de la respuesta de médula ósea a esta sustancia (ZUCKER y col., 1.974).

Es evidente que cuando los pacientes de cancer son tratados con radioterapia y drogas citostáticas, se va a producir una inhibición simultanea de médula ósea y células tumorales.

A pesar de todo, existen situaciones anémicas en enfermos neoplásicos que no pueden ser explicadas por los mecanismos expuestos anteriormente y que probablemente son debidas a factores solubles liberados por el tumor, con capacidad para inhibir la eritropoyesis.

El caso más característico es el timoma, que se asocia frecuentemente a una intensa anemia aunque los factores responsables de la misma no han sido aún determinados (TOMAS, 1.978).

Paralelamente, el embarazo es una situación fisiológica que tiene diversos aspectos comunes con la enfermedad neoplásica; básicamente en ambos casos existe una intensa proliferación celular. También en la embarazada es frecuente un estado anémico, que es parcialmente explicado por el proceso de hemodilución y por el excesivo consumo de hierro que ocurre en el embarazo. Sin embargo estos dos motivos por si solos, no terminan de aclarar el desarrollo de la anemia en la embarazada y menos aún aquellas situaciones, en los que llega a producirse con el embarazo, una anemia

aplásica e incluso una pancitopenia que desaparecen después del parto. (TOMAS, 1.978).

Estas alteraciones también podrían deberse a la liberación de factores solubles inhibidores por las células fetales, semejantes a los difundidos por las células tumorales que podrían afectar a la hematopoyesis.

INMUNOSUPRESION

A) ANTIGENOS TUMORALES: ASPECTOS GENERALES

La idea de que las células tumorales pudieran estar sujetas a control por el sistema inmunitario del huésped comenzó a ganar aceptación hace unos 20 años, después de estudios en animales de experimentación con tumores inducidos por carcinógenos químicos o por virus oncógenos, cuando se hizo evidente que el rechazo inmunológico del tumor transplantado podía inducirse en receptores inmunizados previamente.

El apoyo experimental para este concepto apareció primero en la década de 1.920, con el descubrimiento de que los tumores en ratones eran rechazados cuando se transplantaban a otro ratón y que este rechazo se aceleraba si los ratones receptores eran preinmunizados con tejido tumoral. Sin embargo, estos primeros estudios fueron imperfectos debido a que se hicieron antes de que se formularan los principios del trasplante de tejido y debido a que los experimentos

se realizaron en animales de razas escogidas al azar.

Más tarde se demostró que la inmunización con tejidos normales también producía rechazo del tumor en estos animales de razas mezcladas, y el campo de la inmunología del tumor cayó en el olvido.

En la década de 1.930, cuando se logró disponer de razas de animales consanguíneos (singénicas), en especial tumores, fué posible definir los antígenos de superficie de las células normales que intervienen en la inmunidad del trasplante mediante estudios de rechazo de injertos de piel. De igual forma, se probaron los tumores animales para observar si poseían antígenos de trasplante específicos de tumor, TSTA (Tumor Specific Transplantation Antigens), que pudieran iniciar el rechazo inmunitario (FINK y col., 1.953).

En estudios clásicos realizados a fines de la década de 1.950, se indujeron tumores en animales consanguíneos mediante la inyección subcutánea de un carcinógeno químico, y el tumor fué transplantado a animales de la misma cepa consanguínea. Puesto que los donadores y receptores eran singénicos, no hubo rechazo inmunitario mediado por antígenos del

transplante y los tumores crecieron. No obstante, varias formas de inmunización con células tumorales indujeron una respuesta de rechazo específica contra el desafío subsecuente con células de tumor viables.

La inmunización se consiguió permitiendo a una sección de tumor transplantada subcutáneamente crecer por un tiempo, antes de extirpar quirúrgicamente este crecimiento local.

En otra alternativa, los ratones pudieron inmunizarse con células tumorales atenuadas por aplicación de rayos X o radiaciones gamma o por medicamentos como mitomicina C.

Cualquiera que fuera el procedimiento usado, hubo rechazo del tumor y se dijo que éste portaba TSTA. Aunque desde entonces se han empleado otros métodos para detectar los TSTA, esta prueba funcional se considera todavía el criterio más importante para la inmunogenicidad del tumor.

La protección proporcionada por las respuestas inmunitarias a los antígenos tumorales, depende de la capacidad de éstos para servir como blanco del sistema inmunitario del huésped. Esto es gobernado, en gran parte, por la localización celular del antígeno.

La protección máxima es proporcionada por antígenos tumorales que exponen sus determinantes en forma oportuna al ambiente extracelular, en tanto que los antígenos intracelulares son, probablemente, malos blancos para el ataque inmunológico.

La membrana plasmática es la membrana exterior de la célula y está compuesta de proteínas, oligosacáridos y polisacáridos dispuestos en una conformación de lípidos en doble capa. Embebidas en esta matriz lipídica y algunas veces extendiéndose a través de ella están las denominadas glucoproteínas integrales de la membrana. En algunas ocasiones, están sin acoplar y libres para poder difundir lateralmente en el plano de la membrana. Otras veces pueden estar ancladas o impedidas para moverse. En consecuencia estas proteínas de la membrana celular no se pueden extraer intactas sin desintegrar la estructura de la membrana.

Un segundo grupo de proteínas en la membrana celular, denominadas proteínas periféricas, sólo están debilmente unidas a la superficie celular y pueden ser liberadas con más facilidad al medio.

Los antígenos tumorales que son productos integrales de la membrana, pueden servir como blanco para

anticuerpos o linfocitos, y estas interacciones pueden ocasionar lisis, de la célula. Las proteínas que son periféricas pueden interactuar con anticuerpos y linfocitos, pero no es probable que esto conduzca a lisis celular, puesto que pueden ser fácilmente difundidas al medio exterior. Además, estos antígenos tumorales "difusibles", ya sean libres o como complejos inmunitarios, pueden comportarse como los llamados factores bloqueadores, que impiden el ataque inmunitario de las células tumorales. Los antígenos tumorales intracelulares pueden provocar respuestas inmunitarias después de su liberación de las células destruidas, pero no proporcionan protección. Sin embargo, tanto los antígenos tumorales intracelulares secretados por las células tumorales como las proteínas periféricas de la membrana difundidas de la célula, son valiosos como marcadores tumorales para el diagnóstico inmunitario.

B) DEMOSTRACION DE LOS ANTIGENOS ASOCIADOS AL TUMOR

1) Método in vivo

a) Pruebas de transplante.

Uno de los primeros métodos para inmunizar animales contra tumores fué la extirpación quirúrgica de tumores que se estaban desarrollando subcutáneamente, y luego demostrar que estos "huéspedes inmunizados" rechazaban un segundo desafío con el tumor (FOLEY, 1.953).

La inmunidad tumoral también puede inducirse si se expone el huésped al contacto con células tumorales no proliferativas. Las células tumorales pueden tratarse con rayos X, con radiaciones gamma (10.000-15.000 rads.) o con mitomicina C. Por el contrario, las células metabólicamente inertes (por ejemplo, por calentamiento a 45°C o por tratamiento con inhibidores metabólicos como la yodoacetamida) carecen de inmunidad. Esta puede ser la razón por la cual preparaciones subcelulares, como fracciones de membranas plasmáticas o extractos de células tumorales, obtenidos por la digestión de la membrana celular con papaína, no inducen fácilmente

el rechazo del tumor, aún cuando en estas preparaciones pueda demostrarse desde el punto de vista serológico que retienen los antígenos tumorales. De hecho, se ha comprobado con diversos tumores animales que la inmunización con antígenos tumorales extraídos de las membranas celulares, puede conducir de preferencia al desarrollo de linfocitos T supresores, más bien que a células destructoras, y las células tumorales transplantadas no son rechazadas, (HEBERMAN, 1.977).

b) Transferencia adoptiva

Los experimentos en los cuales la inmunidad es transferida de un donante inmunizado a un receptor normal, a menudo se emplean para caracterizar a las células efectoras que intervienen en el rechazo del tumor.

Una prueba de este tipo, la llamada prueba de WINN (1.959), comprende la inyección de células tumorales mezcladas con células linfoides en animales normales, vigilando a continuación el crecimiento del tumor. Esta prueba ha indicado que en la mayor parte de los sistemas, el linfocito sensibilizado es impor-

tante en la producción del rechazo del tumor. Más recientemente, la prueba se ha usado para demostrar que los linfocitos normales sensibilizados después de su cocultivo con células tumorales o con preparaciones de antígenos tumorales, pueden inhibir el crecimiento del tumor.

En la mayor parte de los casos, la transferencia pasiva de suero inmune no es eficaz para prevenir el crecimiento del tumor, y algunas veces origina su expansión. Sin embargo, se han descrito unos cuantos sistemas en los que el anticuerpo de animales inmunizados al tumor pueden suprimir el crecimiento tumoral; de este modo, el papel de la inmunidad humoral en el rechazo del tumor no puede descartarse por completo.

2) Métodos in vitro

a) Inmunidad mediada por células.

Se han ideado numerosas técnicas in vitro para identificar y medir la reactividad mediada por células a los antígenos tumorales. Básicamente, estas prue-

bas miden la respuesta citolítica o citostática a células efectoras sensibilizadas o la producción de factores solubles como las linfoquinas.

b) Técnicas serológicas.

Los métodos serológicos estudian la posible actividad de un suero inmune frente a determinadas células tumorales.

Estas pruebas pueden ser de "citotoxicidad", cuando se utiliza el complemento junto con el antisue-ro en la detección de los antígenos tumorales o bien de "fijación de anticuerpos", en la que la unión de los anticuerpos con los antígenos tumorales en la célula tumoral, se revela mediante un segundo anticuerpo específico del primero. Este segundo anticuerpo está marcado con fluoresceína, alguna enzima o bien un isótopo radioactivo. La presencia de este marcador sobre la célula estudiada nos indica la positividad de la reacción.

Mediante estas técnicas se han demostrado numerosos antígenos específicos de tumor: TSA (Tumor Specific Antigens), (GARCIA OLIVARES y GARRIDO, 1.978).

C) TIPOS DE ANTIGENOS TUMORALES

Algunos TSA coinciden con los TSTA, pero otros TSA no intervienen en el proceso de rechazo "in vivo" del tumor.

En general, podemos distinguir tres tipos de antígenos en las células tumorales:

- 1) Neoantígenos
- 2) Antígenos asociados a proteínas virales
- 3) Antígenos normales anormalmente expresados por las células tumorales

1) Neoantígenos

Son antígenos tumorales únicos, no detectables en células normales. Gran parte de estos antígenos actúan como TSTA (KLEIN y col., 1.960). Según las características del tumor se han definido tres tipos de neoantígenos:

a) Neoantígenos asociados con tumores inducidos por carcinógenos químicos

La transformación neoplásica por carcinógenos químicos conduce a la manifestación de antígenos que no están presentes en las células normales del huésped. Esto se ha establecido en numerosos experimentos que demuestran que la inmunidad a tumores inducidos por carcinógenos transplantados en huéspedes singénicos, puede ser inducida por el tratamiento previo de los receptores con células tumorales. Una característica importante de estos TSTA es su polimorfismo.

Tumores individuales inducidos por un carcinógeno específico en la misma cepa de animales tienen TSTA únicos, de modo que la inmunidad inducida contra un tumor no confiere resistencia contra un segundo, semejante desde el punto de vista histológico (PREHN y MAIN, 1.957). Los injertos cutáneos y las respuestas negativas a tejidos normales, incluyen la posibilidad de que las diferencias de histocompatibilidad en el huésped original puedan contar para esta variabilidad. Diversos estudios han mostrado que tumores particulares que crecen en un mismo animal, manifiestan diferente TSTA (KLEIN y col., 1.960).

La extensión completa de este polimorfismo no se conoce, pero sólo se ha encontrado un caso de reactividad ~~antigénica~~ cruzada en las pruebas con un grupo de 25 sarcomas murinos (BALDWIN y PRICE, 1.975).

Los TSTA han sido detectados en numerosos tipos de tumores inducidos químicamente, incluyendo los sarcomas inducidos por hidrocarburos policíclicos y los carcinomas hepatocelulares inducidos por colorantes aminoazoados y por nitrosaminas. Las células transformadas "in vitro" por carcinógenos químicos, por ejemplo las células embrionarias murinas transformadas por el 3-metilcolantreno (MCA) también expresan TSTA. Sin embargo, la adquisición de neoantígenos que funcionan como TSTA, no es una respuesta obligatoria de la carcinogénesis química. Por ejemplo, los sarcomas inducidos por MCA en ratas y ratones no siempre son inmunógenos y los carcinomas hepatocelulares inducidos por la N-2-fluorenilacetamida por lo general no expresan TSTA.

Por lo tanto, el proceso de modificación antigénica no está necesariamente relacionada con el cambio inducido por el carcinógeno por un comportamiento normal a uno neoplásico, aunque las dos propiedades parezcan afines cuando ambas aparecen en forma concurrente en el mismo fenotipo.



Los neoantígenos particulares específicos que se localizan sobre los tumores inducidos químicamente, se han identificado como glucoproteínas integrales de la membrana. Esto se basa en la demostración de que el antígeno tumoral se asocia con los componentes de la membrana después del fraccionamiento celular, y que se requiere un tratamiento vigoroso de estas preparaciones de membrana, para liberar productos solubles antigénicamente activos.

Estos tratamientos incluyen digestión de papaína o extracción con cloruro de potasio en solución 3M. Las porciones solubilizadas de antígeno tumorales se han identificado ampliamente con glucoproteínas con pesos moleculares que van de 50.000 a 60.000.

b) Neoantígenos asociados con tumores inducidos por virus.

Se ha observado reacciones cruzadas "in vivo" entre tumores inducidos en distintas cepas por virus pertenecientes a un mismo subgrupo o tipo (GLYNN y col., 1.968). Esto hizo pensar, en un principio, que los TSTA de esta clase de neoplasias estaban codificados por los virus inductores.

Sin embargo, determinadas experiencias parecen indicar que los TSTA de estos tumores no se encuentran asociados a ninguna proteína viral (CHANG y col., 1.975; ROGERS y col., 1.977).

Se ha conseguido solubilizar el TSTA de la leucemia RBL-5, inducida por el virus Rauscher. Se ha observado, que este antígeno no es una proteína viral. Esta molécula aislada, protegió frente a otros tumores inducidos por virus relacionados con el virus Rauscher (LAW y APELLA, 1.973).

A pesar de las reacciones cruzadas entre tumores inducidos por virus relacionados, posiblemente existen determinantes antigénicos tipo específicos dependientes del virus inductor (TING y col., 1.974).

La codificación de estos TSTA es difícil de explicar. En el caso de tumores inducidos por MuLV., parece ser que el virus sólo tiene información para codificar las proteínas específicamente virales y no contiene material genético para más productos. Cabe pensar por tanto, que los TSTA son codificados por el genoma celular derreprimido por el virus.

C) Neoantígenos asociados con tumores espontáneos

En general, ha sido difícil descubrir antígenos tumorales en tumores espontáneos; es decir, tumores que se originan sin inducción deliberada.

Recientemente, las investigaciones con diferentes tipos histológicos de tumores espontáneos han hecho mayor hincapié en las diferencias considerables de inmunogenética entre estos tipos de tumor y los inducidos por agentes químicos, físicos o virales.

Los tumores espontáneos en roedores estudiados incluyen sarcomas, carcinomas de glándula mamaria y tumores de células linfoideas.

Casi en todos los casos, la frecuencia de manifestación de los antígenos tumorales y de la potencia de rechazo inmunitario fue menor que con los tumores experimentalmente inducidos. Por ejemplo, en las ratas, solo 30% de los carcinomas mamarios espontáneos y 60% de los sarcomas tuvieron antígenos de rechazo demostrables, mientras que casi todos los sarcomas inducidos por carcinógenos fueron altamente inmunógenos.

No obstante, en los tumores espontáneos en los que se pudo detectar neoantígenos se observó que éstos presentaban unas características semejantes a los tumores inducidos por carcinógenos químicos. Es decir, que suelen presentarse como antígenos únicos que no dan reacciones cruzadas entre sí.

2) Antígenos asociados a proteínas virales

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

En tumores de origen vírico, lógicamente, se detectan antígenos asociados con proteínas codificadas por el virión oncógeno insertado en el genoma celular. Sin embargo, en los tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos químicos, posiblemente, su aparición sea debida a la infección por un virus ocurrida posteriormente al origen de las células tumorales. Otra posibilidad, es que el genoma de las células normales de ratón contenga material genético viral, normalmente reprimido, que se exprese al producirse la transformación neoplásica (GRANT, 1.974).

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

a) Antígenos grupo específicos (AOKI y col., 1.973)

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

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

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

b) Antígenos subgrupo específico (OLD y col., 1.964)

Se han definido dos VCSA: el FMRGi, común a los virus Friend, Moloney, Rauscher y Graffi y el GCSA(a) característico del virus Gross. Ambos se encuentran ligados a la proteína viral p15.

c) Antígenos tipo específicos (ECKNER-STEEVES, 1.972)

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

Los determinantes asociados a las proteínas virales pueden inducir reacciones inmunes celulares y humorales y ser la causa de reacciones cruzadas "in vivo" e "in vitro" entre los distintos tumores, pero no parecen comportarse como auténticos TSTA (LIU y col., 1.977).

3) Antígenos normales anormalmente expresados en las células tumorales

Son antígenos que no son expresados por las células normales del tejido de origen del tumor o por las células normales del animal del que procede el tumor, pero sí aparecen normalmente en otros tejidos

o en otros animales de la misma especie. Su expresión por parte de las células tumorales, probablemente se debe a un mecanismo de derrepresión genética. Se han observado tres clases de estos antígenos:

a) Antígenos embrionarios (E.A.)

Han sido detectados en tumores de distintas especies, espontáneos e inducidos, antígenos específicos de células embrionarias (BRAWN, 1.970; BARANSKA y col., 1.970). Un caso particular es el antígeno L, descrito en tumores inducidos por Virus de la Leucemia Murina (LECLERQ y col., 1.970).

En tumores humanos hay que destacar la α -feto-proteína (AFP) y el antígeno carcinoembrionario (CEA). La AFP descubierta por ABELEV y col., 1.963, es una α -globulina secretada al suero por células hepáticas embrionarias. Sus niveles séricos declinan rápidamente después del nacimiento, pero aparecen en los casos de carcinomas embrionarios, pancreáticos y hepáticos. El CEA fué descrito por GOLD y FREEDMAN, 1.965, y aparece normalmente en las células fetales del intestino, páncreas e hígado aunque también en los casos de cancer de colon.

Los EA son muy débilmente inmunogénicos, por lo que se piensa que no son los responsables principales del rechazo del tumor (BALDWIN y EMBLENTON, 1.974;

COGGIN y ANDERSON, 1.974).

Su asociación con células de crecimiento rápido (embrionarias y tumorales) hace que se les relacione con los procesos de crecimiento y diferenciación más que con el fenómeno neoplásico en sí (CHISM y col., 1.975).

El origen de los EA es oscuro. Probablemente estos antígenos son codificados normalmente por el genoma de las células embrionarias y en las células diferenciadas son reprimidos. En las tumorales, el proceso neoplásico se acompaña con seguridad de una derrepresión genética que determina la expresión de estos antígenos.

b) Antígenos de diferenciación

Los antígenos de diferenciación (Sistemas TLa y Gix del ratón) expresados en células normales, pueden aparecer anormalmente en las tumorales.

Para explicar el mecanismo de aparición de estos antígenos, se evoca también un fenómeno de derrepresión genética.

Aunque se ha observado que presentan una débil inmunogenicidad, su papel en el rechazo del tumor no parece ser importante.

c) Antígenos de histocompatibilidad

Un tema muy controvertido recientemente, es el de la expresión inapropiada por las células tumorales de antígenos de histocompatibilidad, no presentes en las células normales, a partir de las cuales se ha originado el tumor.

La aparición en las células tumorales de nuevos antígenos de histocompatibilidad ha sido detectada mediante técnicas serológicas (GARRIDO y col., 1.976), técnicas "in vivo" (GARCIA OLIVARES y GARRIDO, 1.980), técnicas celulares (GARCIA OLIVARES y col., 1.982a) e incluso técnicas inmunoquímicas (GARCIA OLIVARES y col., 1.982 b).

Las reacciones cruzadas entre los antígenos de histocompatibilidad extraños y los TSTA, detectadas mediante técnicas "in vivo" (GARCIA OLIVARES y GARRIDO 1.980), así como el gran polimorfismo existente en los antígenos de histocompatibilidad y los TSTA, han hecho sugerir la posible identidad entre unos antígenos y

otros. Incluso, se ha indicado que las células normales pudieran llevar en el genoma, aparte de los genes codificadores de sus antígenos de histocompatibilidad característicos, otros genes también codificadores de antígenos de histocompatibilidad extraños que estarían reprimidos normalmente. En caso de que la célula se transformara neoplásicamente, estos genes se derreprimirían y aparecerían antígenos de histocompatibilidad anómalos sobre las células tumorales, que serían reconocidos como extraños por el sistema inmune del huésped, provocando la eliminación de las células tumorales por este sistema (GARRIDO y col., 1.976).

Para estos autores por tanto, la expresión anómala de antígenos de histocompatibilidad en las células tumorales, supondría un mecanismo de "Vigilancia Inmune" (pg, 37) frente a la aparición de posibles tumores.

Pese a lo sugestivo de esta hipótesis y su confirmación por los datos experimentales llevados a cabo inicialmente, estas ideas han sido muy criticadas. En primer lugar, por la variación en el concepto de lo que se conoce como "Vigilancia Inmune". Cuando se desarrolló este concepto se pensó que la "Vigilancia Inmune" se debía a la actuación específica de células T (BURNET, 1.970) Estas células podrían ser capaces de reconocer antígenos de histocompatibilidad extraños en las membranas de

las células tumorales, sin embargo hoy se sabe que la "Vigilancia Inmune", si es que existe, se debe probablemente a la actuación de las células NK (Natural Killer), (TALMADGE y col., 1.980) que son inespecíficas y no reconocen antígenos de histocompatibilidad ni propios ni extraños.

Por otra parte, distintos autores han podido separar y diferenciar claramente entre antígenos extraños de histocompatibilidad y los TSTA (PARMIANI y col., 1.980; DE LEO y col., 1.977).

A pesar de todo, aunque los antígenos de histocompatibilidad extraños no sean importantes en los posibles mecanismos de defensa frente a la aparición de tumores, es evidente que la afirmación de su existencia real sobre las células tumorales, tendría importantes implicaciones desde el punto de vista de la inmunogenética y en esto la genética molecular dirá la última palabra.

D) RESPUESTA INMUNE FRENTE AL TUMOR

Las respuestas inmunitarias provocadas contra antígenos tumorales son muy complejas; incluyen a las células NK (Natural Killer), la generación de linfocitos sensibilizados, la activación de los macrófagos y la formación de anticuerpos. Estas respuestas son parte de una intrincada red inmunitaria sujeta a una serie de mecanismos de retroacción en los que interviene la generación de células T supresoras y de macrófagos. Además, el propio tumor en desarrollo produce factores solubles específicos y no específicos, incluyendo el antígeno tumoral circulante y los complejos inmunitarios, los cuales impiden la inmunidad mediada por células. Si bien los diversos componentes de la respuesta tumor-huésped pueden ser descritos por separado, es bastante probable que el rechazo del tumor comprenda múltiples mecanismos efectivos.

1) Linfocitos T

Los estudios "in vivo" de la inmunidad frente a tumores han demostrado que ésta puede ser transferida, no mediante el suero de un animal inmune sino a través de sus linfocitos. Así en el test de WINN (1.959), donde las células tumorales se mezclan o bien con suero inmune o linfocitos inmunes antes de ser inyectadas en el animal singénico, es siempre la población de linfocitos T la que confiere inmunidad.

El papel de las células T en el rechazo del tumor fue deducido originalmente de los estudios sobre transplante de tumor que mostraron que las respuestas de rechazo eran abolidas en animales carentes de células T, por ejemplo, después de timectomía, de radiación y de reconstitución con células de médula ósea carentes de células T por haber sido tratadas con antisue-ros anti-Thy y complemento. Además, la sensibilización con células tumorales procedentes de ratones (desnudos) sin timo por nacimiento, en los cuales las células T están ausentes o las hay en cantidad muy pequeña, no lleva a la adquisición de inmunidad tumoral.

Los experimentos de transferencia adoptiva (pasiva) en los cuales se suprimen las células T por

tratamiento con anticuerpos anti-Thy y complemento, se han usado para demostrar el requerimiento de estas células T sensibilizadas en el rechazo de algunos tumores de ratón.

Los linfocitos T representan una población heterogénea de células con funciones diferentes. Estos linfocitos incluyen a las células T helper (Th), cuya función es potenciar la respuesta inmune específica y a las células T supresoras (Ts) que actúan de modo antagónico al suprimir las respuestas inmunitarias. Estos dos subconjuntos pueden observarse como componentes de un mecanismo homeostático que controla las respuestas inmunitarias. De particular importancia en la inmunidad al tumor es la población de células T citotóxicas (Tc), que intervienen en el reconocimiento específico y la lisis de las células neoplásicas.

Estas subpoblaciones de células T han sido estudiadas mejor en el ratón, dado que pueden ser clasificadas por su expresión de los antígenos de diferenciación Lyt. La tipificación de las células T periféricas empleando antisueros preparados contra estos antígenos Lyt, ha identificado tres subconjuntos separados de células T: Lyt-1,2,3, Lyt-1 y Lyt-2,3+.

Los linfocitos portadores de Lyt-1 (Th) están programados genéticamente para auxiliar o amplificar la actividad de otras células después de la estimulación antigénica. Inducen a las células B a secretar anticuerpos, inducen a macrófagos y monocitos y a otros leucocitos inflamatorios a desencadenar la hipersensibilidad de tipo retardado, e inducen a los precursores a diferenciarse en células citotóxicas.

Las células Lyt-2,3+ están preparadas para evolucionar a células citotóxicas aloreactivas (células T_c).

Las células Lyt-1,2,3 no están bien caracterizadas, pero algunas cuando menos representan un almacén de células intermediarias receptoras-positivas que regulan el suministro y la función de células Lyt-1 y Lyt-1,2,3 más maduras.

Los linfocitos T, al menos en situaciones experimentales, reconocerían los antígenos específicos de tumor y a través de estos desarrollarían una respuesta inmune, lisando las células tumorales (HELLSTRÖM y HELLSSTRÖM, 1.974; NELSON y col., 1.978; CALDERWOOD y col., 1.981).

Por lo general, las células T reconocen antígenos en asociación con el determinante MHC singénico apropiado, y esta combinación es la que induce la respuesta de células helper, supresoras o citotóxicas. Por ejemplo, en el ratón, las células T_h reconocen el antígeno en el contexto de los antígenos I_a ; las células T_c normalmente reconocen determinantes relacionados con moléculas H-2K o D (ZINKERNAGEL y DOTHERTY, 1.979).

Las células T_h También pueden intervenir liberando linfoquinas que activarían a los macrófagos, siendo estos los que actuarían sobre las células tumorales (NELSON y col., 1.979).

2) Anticuerpos y células K (Killer)

El anticuerpo específico del tumor puede causar destrucción de las células tumorales a través de dos vías en las que intervienen mecanismos dependientes del complemento y dependientes de las células. La citotoxicidad que depende del complemento, comprende la activación clásica de las vías de este mecanismo,

después que ha tenido lugar la interacción del anticuerpo con el antígeno tumoral expresado en la superficie de las células. La citotoxicidad dependiente de anticuerpos y mediada por células (ADCC) comprende el reconocimiento del anticuerpo unido a la célula por otra célula efectora positiva al receptor Fc.

La naturaleza de la célula K (Killer) no se conoce bien, pero es un linfocito con receptores Fc para la porción Fc correspondiente de la molécula de IgG unida al antígeno, y estos receptores sirven como la estructura de fijación para las células blanco sensibilizadas por el anticuerpo (TROYE y col., 1.980).

Se han detectado anticuerpos específicos al tumor en numerosos tumores de animales experimentales, y por lo menos pueden mediar "in vitro", la lisis de la célula tumoral por cualquiera de los dos mecanismos mencionados. El papel de los anticuerpos en el rechazo del tumor todavía es dudoso, excepto para las leucemias murinas y linfomas (ESSEX, 1.977).

3) Células NK (Natural Killer)

Las células NK constituyen una subpoblación de células distinta dentro del sistema inmunitario, la cual fue descubierta como consecuencia de estudios que mostraron que los linfocitos de la sangre periférica de individuos normales, a quienes no se consideraba que hubieran estado expuestos a antígenos asociados al tumor, eran altamente citotóxicos "in vitro" para las células tumorales cultivadas.

Por lo general, se reconocen a las células NK como linfocitos no adherentes, y originalmente se les denominó "células nulas", ya que carecían de los marcadores característicos de las células B o las T.

Estudios más recientes sugieren que las células NK del ratón y del hombre puedan ser de la clase de células T. Por ejemplo, se ha demostrado que las células NK humanas tienen afinidad (aunque baja) por los eritrocitos, y en condiciones óptimas pueden formar rosetas E. En forma semejante, las células NK de los ratones atímicos tienen una concentración baja de antígeno Thy-1 y por lo tanto pueden ser precursoras de las células T.



Puesto que las células NK muestran una amplia variación de reactividad para las células tumorales, se ha especulado que pueden ser un componente importante en el mecanismo de defensa del huésped contra las células neoplásicas (WARNER y DENNERT, 1.982). A este respecto, hay varias correlaciones entre la resistencia "in vivo" a los tumores y la actividad de las células NK (TALMADGE y col., 1.980). Por ejemplo, la capacidad de los ratones timectomizados por radiación para rechazar las células tumorales está en correlación con la actividad de las células NK de la población de células de la médula ósea empleadas para reconstitución.

De particular importancia en la manipulación de las respuestas inmunitarias a los tumores, es el gran incremento en la actividad de las células NK que sigue al tratamiento con vacunas bacterianas, como la BCG y "Corynebacterium parvum" (FLEXMAN y SHELLAM, 1.980). Esto se considera actualmente como uno de los componentes importantes del tratamiento de los enfermos con estos agentes.

4) Macrófagos

Los macrófagos estimulados "in vivo" o "in vitro" con varios agentes, se vuelven citotóxicos y pueden destruir a las células tumorales o inhibir su multiplicación.

Los agentes que ejercen este efecto sobre los macrófagos son diversos e incluyen preparaciones bacterianas, en especial el BCG y "C.parvum", y también productos subcelulares, como las preparaciones de paredes bacterianas. Otros agentes no específicos incluyen compuestos polianiónicos como el copolímero de pirano y el sulfato de dextrano (HIBBS, 1.974). Además de los agentes inespecíficos, la activación de los macrófagos también es producida por productos (linfoquinas) liberados de las células T sensibilizadas que reaccionan con el antígeno específico (NELSON y col., 1.979).

Se considera que los macrófagos activados son importantes en el rechazo del tumor, y junto con las células NK, se observan como células efectoras que median la supresión del tumor después del tratamiento con los componentes bacterianos. Esta conclusión se apoya en numerosos estudios que muestran que los macrófagos activados son fuertemente citotóxicos para las células

tumorales "in vitro". Originalmente se postuló que sólo las células tumorales eran susceptibles a los macrófagos activados, pero ahora se reconoce que son atacadas ambas células, las normales y las neoplásicas.

El papel "in vivo" de los macrófagos en la mediación del rechazo del tumor no se conoce bien, aunque se ha demostrado que suprimen el crecimiento de algunos tumores animales, cuando son transferidos en forma adoptiva junto con células tumorales. Aquí debe anotarse que muchos autores muestran considerable infiltración de macrófagos del huésped, y uno de los planteamientos actuales en inmunoterapia (inmunoterapia regional) es inducir agentes al interior del tumor, de modo que activen a estos macrófagos infiltrantes.

5) Vigilancia inmune

De lo dicho anteriormente, se deduce que el sistema inmune, al menos en situaciones experimentales, es capaz de reaccionar frente a las células tumorales. Lo que queda por determinar, es si el sistema inmune "in vivo" espontáneamente impide el desarrollo ocasional

de células tumorales. Dicho de otra forma, si existe una "Vigilancia Inmune" frente a las células tumorales, equivalente a la existente frente a la invasión de gérmenes en el organismo.

Según WOODRUFF (1.982), la cantidad de mutaciones ocurridas a lo largo de la vida en un organismo, es tan elevada que cabría esperar una mayor frecuencia en la aparición de neoplasias. Si esta frecuencia no es tan elevada, probablemente, se deba a que existe un mecanismo activo que impide el desarrollo tumoral.

El primero en señalar el concepto de "Vigilancia Inmune" fue THOMAS (1.959), siendo más tarde, desarrollado por BURNET (1.970). Según BURNET, la "Vigilancia Inmune" se basaría en la actuación específica de linfocitos T que reconociendo los TSTA en las células tumorales provocarían su rechazo. Sin embargo, esta idea ha sido intensamente criticada ante la evidencia de que los pacientes y animales carentes de células T (RYGAARD y POULSON, 1974), no presentaban mayor incidencia de tumores que los individuos normales.

El concepto actual de "Vigilancia Inmune", se fundamenta principalmente en la actuación de células inespecíficas: células K, macrófagos y sobre todo en células NK, aunque la participación real de estas células en los mecanismos "in vivo" de la "Vigilancia Inmune" no ha sido aún totalmente demostrada.

E) MECANISMOS DE ESCAPE DE LAS CELULAS TUMORALES

Aunque el huésped esté capacitado para provocar las respuestas inmunitarias encaminadas al control de la destrucción de las células tumorales, el curso natural de los hechos, en muchos casos, puede ser el desarrollo progresivo del tumor a pesar de la respuesta combinada de rechazo. Se han propuesto varias hipótesis para explicar este fracaso de la inmunidad en el huésped portador de tumores, incluyendo las respuestas inmunitarias tumorales inadecuadas y la interferencia con la inmunidad tumoral por los factores del huésped.

1) Antigenicidad de las células tumorales

Los tumores debilmente antigénicos escapan fácilmente a la actividad del sistema inmune (WEISS, 1.977).

Al principio, un tumor puede no proporcionar un estímulo suficiente para inducir una respuesta inmunitaria eficaz, y para cuando las defensas del huésped ya se encuentren finalmente activadas, el tumor será demasiado grande para estar sujeto a control inmunitario. Hay, por ejemplo, numerosos tumores muy antigénicos (v.g. el linfoma de la rata inducido por el virus Gross) que normalmente regresan cuando son transplantados a huéspedes singénicos. Esta regresión está mediada por respuestas inmunitarias, ya que la inmunosupresión elimina el efecto.

Por otra parte, otros tumores como los sarcomas químicamente inducidos rara vez regresan al ser transplantados a huéspedes singénicos. Por lo regular es necesario inmunizar previamente a los receptores con el fin de estimular la inmunidad tumoral. Por lo tanto, con estos tumores el estímulo inmunitario inicial no es suficiente en el animal receptor del tumor para que se produzca un rechazo inmunológico. En estos casos, es necesario proporcionar un estímulo inmunitario adicional

como la inyección de células tumorales junto con algún adyuvante bacteriano, de tal manera que pueda inducirse el rechazo del tumor.

La modulación antigénica negativa de los TSTA, puede ser un mecanismo a través del cual las células tumorales escapan a la actividad del sistema inmune (JOSEPH y OLDSTONE, 1.974). Parece ser que la actuación de anticuerpos no fijadores de complemento frente a los TSTA, puede producir la inhibición en la expresión de estos antígenos.

Por otro lado, se ha observado que las células tumorales tienen la capacidad de cambiar sus antígenos durante la progresión neoplásica, lo que determinaría que la situación inmune, desarrollada ante el tumor original, no sirviera para las células con una nueva antigenicidad. Se ha indicado que este mecanismo de cambio antigénico es importante en el desarrollo de metástasis (ALBINO y col., 1.981).

Las respuestas inmunitarias débiles han demostrado experimentalmente que pueden estimular, en vez de inhibir, el crecimiento de los tumores (PREHN, 1.976). Por ejemplo, la inyección de células tumorales, mezcladas con cantidades pequeñas de células de bazo específicamente inmunizadas, en el interior de ratones con inmuno-

depresión producía un mejor crecimiento tumoral que cantidades semejantes de células esplénicas normales sensibilizadas para algún tumor no relacionado. También se han obtenido efectos semejantes empleando anticuerpos específicos (KALISS, 1.958) en vez de células linfoides, de manera que la inmunoestimulación por respuesta inmunitaria débil debe reconocerse como una verdadera posibilidad. Esto explicaría el denominado fenómeno "sneaking Through" (deslizamiento), en el que grandes dosis de tumor, inoculadas en el animal singénico, son rechazadas por éste, mientras que pequeñas dosis son aceptadas y el tumor progresa (HUMPHREYS y col., 1.962). Probablemente, altas dosis de tumor inducen una respuesta protectora mientras que dosis bajas dan lugar a una respuesta débil, estimuladora del crecimiento celular.

2) Inmunosupresión inducida por el tumor

Los mecanismos por los que el tumor puede inducir inmunosupresión en el huésped, son muy diversos:

- a) Liberación de TSTA
- b) Formación de inmunocomplejos
- c) Desarrollo de células T_s
- d) Liberación de factores bloqueadores

a) Liberación de TSTA

Ha sido descrita en diversos sistemas tumorales (CURRIE y BASHAM, 1.972). Estos antígenos se unirían a las células inmunes específicas, impidiendo que éstas puedan atacar a las células tumorales. CURRIE y ALEXANDER (1.974), han demostrado con tumores de rata que aquéllos que tienen la capacidad de liberar antígenos son más susceptibles de metastatizar.

b) Formación de inmunocomplejos

En otras ocasiones, los antígenos liberados por el tumor tienen la capacidad de formar inmunocomplejos (BALDWIN y col., 1.973). Estos inmunocomplejos interfieren con las células T_c y células K que podrían atacar a las células tumorales; así como estimular el desarrollo de células T_s aumentando, de esta forma, el estado de inmunosupresión.

C) Desarrollo de células Ts

Las células tumorales no sólo tienen la capacidad de bloquear la actuación del sistema inmune como ya se ha indicado anteriormente, sino que además, potencia activamente la inmunosupresión mediante el desarrollo de células Ts.

Existen diversas evidencias que demuestran cómo la eliminación de células Ts, en animales portadores de un tumor, retarda el crecimiento de éste (FUJIMOTO y col., 1.976; PERRY y col., 1.978).

Por otra parte, células supresoras procedentes de un ratón portador de un tumor junto con células de ese tumor inyectadas en un receptor singénico, potencian intensamente el crecimiento tumoral (PERRY y col., 1.981).

Numerosos trabajos señalan que en pacientes avanzados de neoplasias, aumenta la proporción de células Ts aunque el mecanismo que determina este incremento no es bien conocido (McCLUSKEY y col., 1.983).

Según ya se ha indicado, los inmunocomplejos, formados por los antígenos liberados por el tumor, tienen la capacidad de estimular el desarrollo de células Ts, pero probablemente existan otra serie de factores

secretados por el tumor, aún mal definidos, que tengan esta misma función.

d) Liberación de factores bloqueadores

En el suero o fluidos orgánicos de los pacientes avanzados de un tumor, encontramos una serie de factores con actividad inmunosupresora. Estos factores también se detectan en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales o en los extractos directos de los tumores. Junto con los otros factores estudiados en los anteriores apartados, son los responsables de la inmunosupresión asociada a la enfermedad neoplásica, y su relación con ésta se observa al realizar una plasmaféresis en enfermos de diversos tumores; el estado de inmunosupresión desaparece, probablemente, porque se han eliminado dichos factores (MICKSHE y col., 1.982).

Los factores bloqueadores son muy polimorfos, dependiendo del tipo de tumor estudiado y de la técnica utilizada. Sus características suelen variar de un tumor a otro, aunque hay autores que han encontrado factores bloqueantes de características semejantes estudiando

tumores de distinto tipo (ROTH y col., 1.982; ROTH y col., 1.983). Sin embargo, esto no es lo normal y cada autor suele presentarnos un factor bloqueante con propiedades específicas distintas, lo que hace prácticamente imposible una clasificación de los mismos. No obstante, vamos a exponer una serie de propiedades, algunas de ellas comunes a todos los factores bloqueantes descritos.

- Inespecificidad

Es la característica más frecuente dentro de todos los factores bloqueantes ya que la inmunosupresión inducida por estos, no está relacionada únicamente con la respuesta específica a las células tumorales sino que suele ser un estado de inmunosupresión generalizado e inespecífico. A pesar de todo, se han detectado factores bloqueantes específicos (KOPPI y HALLIDAY, 1.983) pero estos factores, no parecen estar relacionados directamente con el tumor sino que son secretados por células Ts específicas.

La mayor parte de los factores bloqueantes estudiados experimentalmente, han mostrado su capacidad para inhibir la estimulación de los linfocitos periféricos

con mitógenos, en cultivo mixto de linfocitos (MLR) o la síntesis de inmunoglobulinas por linfocitos estimulados por PWM (GREEN y WISTAR, Jr., 1.976; REMACLE-BONNET y col., 1.976; SALINAS CARMONA y col., 1.982). Existen una serie de trabajos que señalan que los factores bloqueantes, actúan también sobre otras funciones del sistema inmune, produciendo inhibición de: formación de rosetas por linfocitos T humanos (SAIZ GARCIA y RODRIGUEZ VALVERDE, 1.981; OH y MOOLTEN; 1.981a), liberación de H_2O_2 y O_2^- por macrófagos (SZURO-SUDOL y NATHANS, 1.982), síntesis de anticuerpos (KAMO y col., 1.975; OH y MOOLTEN, 1.981a, 1.981b; MAROTTI y col., 1.982), actividad de células NK (OH y MOLTEN, 1.981a; ALLAVENA y col., 1.981), reacción de injerto contra el huésped (DE LUSTRO y ARGYRIS, 1.976a), inducción de la citotoxicidad celulomediada aloespecífica (ROTH y col., 1.982), proporción de receptores Fc en la membrana del neutrófilo (PATRONE y col., 1.981).

Como vemos, la actividad supresora de los factores bloqueantes afecta a casi todas las facetas de la inmunidad de una forma inespecífica, por lo que probablemente sean los agentes más importantes de la inmunosupresión. Además, se ha observado que no sólo tienen

actividad inmunosupresora sino que también poseen capacidad de inhibir las células hematopoyéticas (PESSINA y col., 1.982; TRUCCO y col., 1.984), lo que puede explicar los estados de anemia, según se comentó al principio de la introducción.

-Secreción por células tumorales

Algunos autores sugieren que los tejidos normales, bajo la acción del proceso neoplásico, pudieran sintetizar moléculas que en una excesiva concentración producirían inmunosupresión. Este sería el caso del seromucoide, proteína plasmática normal sintetizada principalmente por el hígado, que se ha encontrado en elevadas concentraciones en pacientes de cáncer de mama (CHERESH y col., 1.982). Sin embargo, se piensa que la mayor parte de los factores bloqueantes son producidos por las propias células tumorales ya que los mismos factores que son detectados en el suero de los pacientes con neoplasia, se encuentran también en los extractos del propio tumor (KUMAR y col., 1.981). Es por lo que, para el estudio de estos factores se ha empleado indistintamente suero (SIMON y col., 1.983), fluido ascítico maligno (OH y MOOLTEN, 1.981b), extractos de células tu-



morales (MOHAGHEGHPOUR y col., 1.979) o sobrenadante del cultivo de células tumorales (DE LUSTRO y ARGYRIS, 1.976b).

- Carácter protéico

La mayoría de los factores bloqueantes definidos son proteínas; característica que viene determinada por su sensibilidad a las enzimas proteolíticas (GREEN y WISTAR, 1.976; DE LUSTRO y ARGYRIS, 1.976a). No son dializables (GREEN y WISTAR, 1.976; DE LUSTRO y ARGYRIS, 1.976b; WILKINS y col., 1.983b). Sus pesos moleculares oscilan de 40.000 a 100.000 Daltons, pero hemos observado que la mayor parte de ellos se aproximan a un peso molecular de 70.000 (MOHAGHEGHPOUR y col., 1.979; POMMIER y col., 1.981; ROTH y col., 1.983). En cuanto a su termoestabilidad, presentan distinto comportamiento, pues mientras determinados factores son claramente termoestables (WALSH y GECZY, 1.982), otros son termolábiles (WILKINS y col., 1.983a).

También se ha encontrado que algunos de los antígenos embrionarios (EA) secretados por los tumores, tienen actividad inmunosupresora (HOOPER y MURGITA, 1.981;

EVANS y col., 1.981; REES y col., 1.974). La α -feto-proteína pudiera ser un regulador fisiológico de la respuesta de las células T (HOOPER y MURGITA), pero secretada en exceso por determinados tumores, induciría un estado de inmunosupresión.

En algunos trabajos, se demuestra que los virus pueden inhibir la proliferación de los linfocitos inducida por mitógenos (KATELEY y col., 1.974), no obstante, las técnicas utilizadas en el estudio de un gran número de factores bloqueantes, permiten excluir esta posibilidad.

A pesar de que, según acabamos de indicar, la mayoría de los factores bloqueantes son de carácter protéico, un reducido número de autores han encontrado factores con carácter lipídico (BROWM y col., 1.983; WOLF y col., 1.983; KRISHNARAJ y col., 1.982). Esto ha sido también, el hallazgo de esta tesis.

De lo dicho hasta ahora, deducimos que probablemente, existan diversos tipos bloqueantes, que deben

inhibir la actividad del sistema inmune siguiendo diferentes vías de actuación. Es por esto que no podemos generalizar al hablar de su mecanismo de acción.

Ya se ha comentado que los factores bloqueadores tienen la capacidad de inhibir, de una forma indiscriminada, diversos aspectos funcionales del sistema inmune. Sin embargo, podemos distinguir entre los factores que actúan solamente sobre células inmunes (SIMON y col., 1.983; WILKINS y col., 1.983a; WILKINS y col., 1.983b) y los que ejercen su acción tanto sobre células inmunes como no inmunes (REMACLE-BONNET y col., 1.976). Los primeros, podrían considerarse como moléculas fisiológicas secretadas, a unas determinadas concentraciones, por las células inmunes que al transformarse en neoplásicas se secretarían en altas concentraciones, produciendo un efecto inmunosupresor. Un ejemplo claro, lo tenemos en los factores secretados por el linfoma histiocítico humano U937. Este linfoma, bajo la estimulación de células Ts secreta una sustancia que inhibe la proliferación de los linfocitos periféricos estimulados por mitógenos (WILKINS y col., 1.983b). Otro ejemplo es el apar-

tado por TRUCCO y col., 1.984, que han caracterizado un factor secretado por un linfoma T, que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas progenitoras.

Los factores no inmunoespecíficos, probablemente, tengan la capacidad de inhibir la síntesis de DNA en cualquier tipo de célula, inmunológica o no. No sabemos si en este caso, los factores bloqueantes son también el resultado de la magnificación de un proceso fisiológico por parte de las células tumorales. En algunos trabajos donde se ha encontrado un factor bloqueante en un determinado tumor, no se ha podido encontrar en el tejido normal correspondiente (REMACLE-BONNET y col., 1.976; ROTH y col., 1.982). Sin embargo, en otros trabajos (GREEN y col., 1.976; MOHAGHEGHPOUR y col., 1.979) el factor bloqueante ha sido hallado en tejido normal aunque en menor concentración. Esto último, sugeriría que el factor pudiera ser una molécula fisiológica.

Otro aspecto funcional de los factores bloqueantes, es su capacidad para actuar sobre células de animales de distinta especie.

Existen factores especie específicos (KUMAR y col., 1.981; SIMON y col., 1.983; WILKINS y col., 1.983a) y otros que no lo son (REMACLE-BONNET y col., 1.976; OH y MOOLTEN 1.981a y 1.981b). Parece haber una cierta relación entre la inmunoespecificidad y especieespecificidad ya que aquellos factores que son específicos de células inmunes son también específicos de especie (SIMON y col., 1.983; WILKINS y col., 1.983a) mientras que si no son inmunoespecíficos tampoco son especieespecíficos (REMACLE-BONNET y col., 1.976 y 1.978). Esto confirma en estos últimos, su capacidad para inhibir indiscriminadamente al DNA, sugiriendo que sean factores reguladores del crecimiento celular.

Son muy pocos los factores bloqueantes cuyo mecanismo íntimo de actuación se ha estudiado. En este aspecto, la mayor parte de los autores han investigado únicamente la reversibilidad de la actividad inhibidora sobre las células tratadas, una vez eliminado del medio los factores bloqueantes. En algunos casos, el

efecto fué reversible y la función celular quedó restaurada totalmente (KUMAR y col., 1.981; ROTH y col., 1.982; WILKINS y col., 1.983; WALSH y GECZY, 1.982), sin embargo en otros, la actividad celular fué bloqueada irreversiblemente (REMACLE-BONNET y col., 1.978 KAMO y col., 1.975).

La reversibilidad indicaría una unión lábil del factor con un posible recptor celular y/o un efecto reversible sobre el metabolismo celular.

Quizá, el factor mejor estudiado en relación con su actuación inhibidora, haya sido el SCE (Soluble colonic carcinoma extract), obtenido de carcinoma humano de colon (REMACLE-BONNET y col., 1.976 y 1.978; POMMIER y col., 1.981). Se ha observado que este factor, al inhibir la mitogénesis de los linfocitos humanos, no interfiere directamente con el receptor de los linfocitos para el mitógeno sino que produce una inhibición de ATPasa- Na^+ , K^+ y una estimulación de las ATPasas dependientes de Ca^{+2} y de Mg^{+2} .

Se sabe que la coordinación entre las actividades de las diferentes ATPasas, puede ser de importancia en

la regulación del proceso que lleva a la activación celular. Posiblemente, la interrelación existente entre el transporte activo de K^+ y Ca^{+2} y las actividades de las ATPasas pudieran estar implicadas. Las funciones reguladoras del AMPc que actúa antagónicamente al GMPc (WATSON, 1.975; WEINSTEIN y col., 1.976; DIAMANTSTEIN y ULMER, 1.975), necesitando ambas iones calcio (DIAMANTSTEIN y ULMER, 1.975; SCHULTZ y col., 1.973; SMITH e IGNARRO 1.975), podría representar un punto vital en la secuencia de modulaciones metabólicas intracelulares, relacionadas con la interacción de un ligando extracelular sobre la superficie celular.

Sólamamente en un trabajo (BROWN y col., 1.983), de la bibliografía consultada por nosotros, se ha determinado el efecto de los factores bloqueantes sobre el ciclo celular, evidenciándose que los linfocitos estimulados por mitógenos en presencia de suero de pacientes de una leucemia, eran inhibidos en la fase G_1 . La importancia que esto pueda tener en cuanto a la regulación del crecimiento celular será comentada en el siguiente apartado.

CRECIMIENTO CELULAR

El conocimiento de la cinética y ciclo de replicación celular es un prerrequisito para poder llevar a cabo estudios sobre el crecimiento y maduración de tejidos normales, respuesta de los tejidos normales a los agentes citotóxicos, crecimiento de tejidos malignos y estrategias de tratamiento de las enfermedades malignas. Un tumor maligno puede ser considerado como una población celular en incremento constante. Este incremento puede no ser regular, rápido o eficiente, pero ocurre hasta la muerte del huésped. En contraste, las células de muchos tejidos normales proliferan hasta obtener y mantener un tamaño de población que es fisiológicamente útil.

Tanto en los tumores como en los tejidos normales existirán nacimiento y muerte celulares. Sin embargo, en los tejidos normales en situación estable el nacimiento de nuevas células iguala la muerte celular. A medida que los tumores crecen, el nacimiento de células

debe sobrepasar el grado de muerte celular.

El control de los tejidos normales en situación estable no es bien conocido, pero tal control puede ser positivo (estimulador) o negativo (inhibidor); humoral y efectivo a gran distancia (hormonas); por sustancias liberadas localmente (chalonas) o relacionado con el contacto (inhibición por contacto con células similares o estimulación por la matriz producida por las células).

A) TEJIDOS NORMALES

1) Actividad proliferativa de los tejidos normales

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

- Tejidos con recambio celular o de renovación.

En estos tejidos hay una proliferación para reemplazar a las células con una vida de duración limitada. Hay un alto índice de nacimiento y muerte celular. Ejemplos de éstos, los encontramos en la piel,

mucosa, sangre y células germinales.

- Tejidos no proliferativos o estáticos.

Constituyen ejemplos de estos tejidos las células neuronales y el músculo estriado.

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

Incluye ejemplos como el músculo liso, tejido glandular, tejido conectivo, parénquima hepático y riñón.

2) Quiescencia y proliferación celular. "Stem cells"

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

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

La quiescencia es un estado especial denominado Go que es diferente de cualquier estado de las células en crecimiento (EPIFANOVA, 1.977).

Las células madre se encuentran en situación activa, al menos en los tejidos de renovación y expansión. En los tejidos estáticos es poco probable que existan células madre y si es así, permanecen inactivas.

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

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

La proliferación de las células madre, como acabamos de decir, va dirigida en el sentido de autoperpetuarse y de diferenciarse. En el primer caso, la célula madre entra en el ciclo de replicación celular, reproduciéndose a sí misma, para mantener un estado de reserva constante. En el segundo caso, proliferaría

hacia una célula diferenciada (adulta) con el fin de reponer a otra que ya ha muerto o como respuesta a una necesidad fisiológica (proliferación de fibroblastos después de una herida, aumento del número de eritrocitos bajo una disminución de la presión de O_2 en los ascensos o altitudes, etc).

Evidentemente, un mecanismo regulador finamente ajustado está involucrado en el mantenimiento de este balance (McCULLOCH, 1.975; HELLMAN y col., 1.978).

Cuando las células madre evolucionan para diferenciarse, lo hacen siguiendo una serie de etapas. Partiendo de un estado elemental (inmaduro) con baja actividad proliferativa y en el cual la célula madre se autoperpetua, se llega a un primer estado de diferenciación en el que se le denomina "célula madre comprometida" de gran proliferación, para ir a una nueva etapa de mayor proliferación. Finalmente, continúa su maduración, a través de una serie de etapas sucesivas, hasta que se produce una célula adulta funcionante. Esta célula, que desarrollará su función hasta que muera, no suele dividirse. Sin embargo, éste no es el caso de las células inmunes específicas, que una

hasta el final de la siguiente. Fue descrita por primera

vez que han madurado, al conectar con el antígeno, proliferan de nuevo alcanzando estadios posteriores de diferenciación celular.

B) CICLO CELULAR

1) Fases del ciclo celular

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

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

El ciclo celular, que puede ser definido como el periodo que transcurre desde que termina una mitosis hasta el final de la siguiente, fue descrito por primera

vez por HOWARD y PELC en 1.951 usando ^{32}P como marcador de las células que sintetizaban DNA. La timidina tritiada ha reemplazado, posteriormente, a este marcador.

Clásicamente el ciclo celular se divide en cuatro fases separadas. Cuando finaliza la mitosis, las células pasan a través de las fases G_1 (presíntesis), S (síntesis), G_2 y M (mitosis). La fase mitótica puede ser identificada con el microscopio óptico, mientras que la fase de síntesis puede ser determinada por la incorporación de timidina tritiada. Las fases G_1 y G_2 constituyen los dos periodos entre estos acontecimientos identificables.

El tiempo invertido por las células en recorrer el ciclo replicativo, varía considerablemente de un tipo de células a otras. En general, la duración de las fases S, G_2 y M es bastante constante; sin embargo, la duración de G_1 es muy variable. En las células de mamíferos la fase M muestra constantemente una corta duración (0'5-1'5 horas), la fase S de 8 a 30 horas tanto en tejidos normales como malignos; la duración de la fase G_2 ha sido determinada con menor precisión, pero es bastante corta (probablemente alrededor de 1 hora).



La gran variabilidad está en G_1 (BASERGA, 1965). Es por esto que los cambios en la duración total del ciclo dependen en gran medida de G_1 , que está sometida a un control específico del crecimiento. Es primariamente en esta fase, donde las condiciones externas determinan si las células se mantendrán en el ciclo replicativo, se diferenciarán o entrarán en reposo.

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

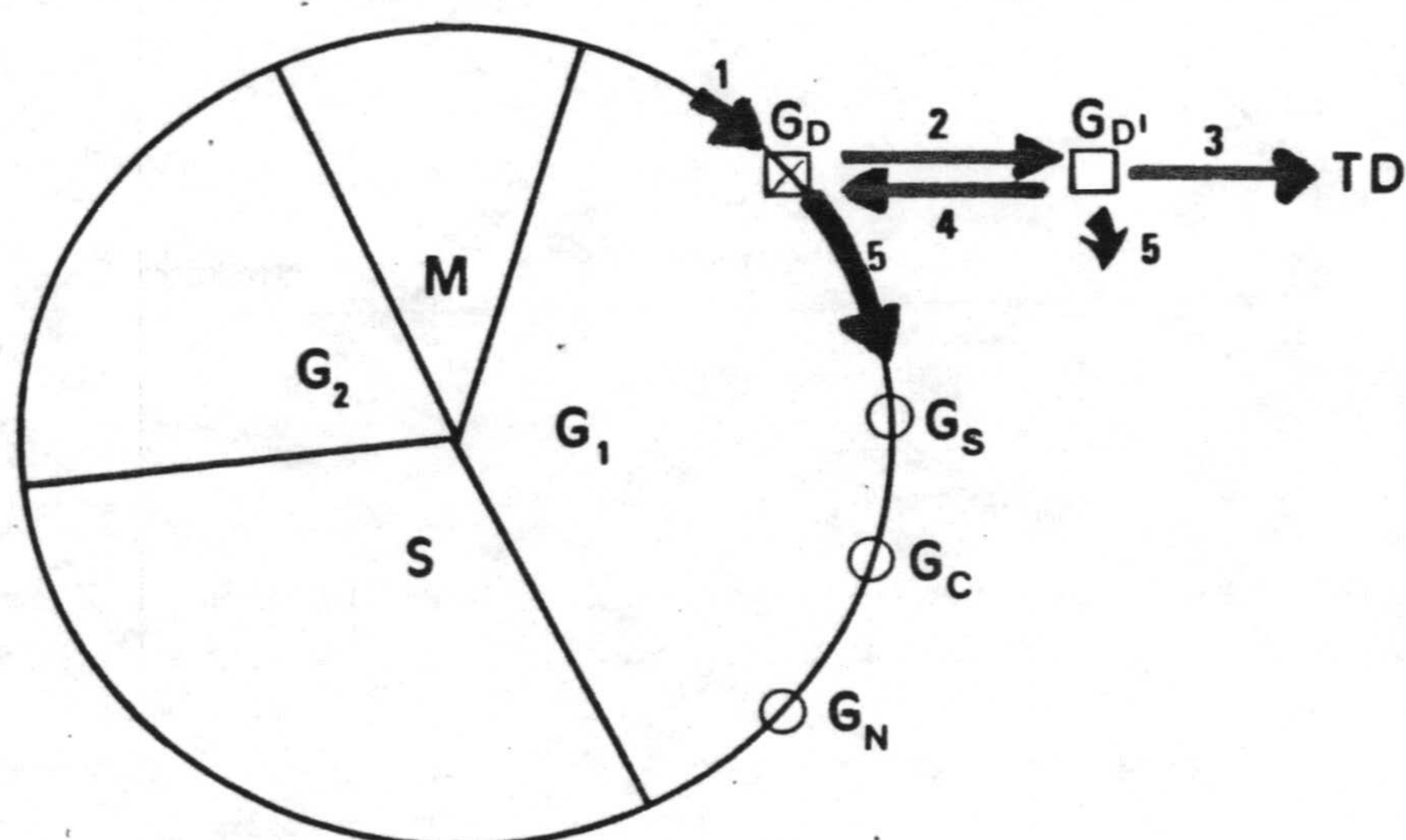
Recientemente, SCOTT y col., (1982a; 1984) trabajando con el sistema de proadipocitos 3T3 T, han definido una serie de etapas dentro de la fase G_1 que han sido designadas sucesivamente como G_D , G_S , G_C y G_N .

G_D es la primera etapa de G_1 donde se regula el control de la proliferación y diferenciación celular; es aquí cuando la célula tiene la posibilidad de permanecer

quiescente, reiniciar la proliferación o diferenciarse. Después vienen G_S y G_C , estados en los que la célula se muestra susceptible a la regulación por factores de crecimiento. Finalmente se encuentra la etapa G_N , donde la célula presenta sensibilidad a determinados nutrientes, especialmente el amino-ácido isoleucina.

FIGURA 1

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



El estado G_D consta a su vez de varias subetapas (Figura 1; según SCOTT y col., 1984). Las células, primeramente, muestran una parada cuando llegan al estado G_D (flecha 1). En G_D , las células pueden permanecer en reposo, reiniciar la proliferación (flecha larga, 5) o diferenciarse (flechas 2 y 3). Si es inducida la diferenciación, las células salen del ciclo pasando a un

estado denominado G_D , (flecha 2) en el que las células están diferenciadas pero no de una manera total. G_D es otro nuevo punto de control de la proliferación y diferenciación, donde las células pueden seguir varios caminos: diferenciarse totalmente hasta el estado TD (flecha 3), reiniciar la proliferación mientras permanecen semidiferenciadas (flecha corta 5), desdiferenciarse volviendo al estado G_D (flecha 4) o bien permanecer quiescentes.

Existen factores fisiológicos y farmacológicos que regulan la proliferación y diferenciación a nivel G_D (SCOTT y col., 1982b; WIER y col., 1983). Determinados factores del crecimiento pueden estimular la proliferación de células en G_D ó G_D , en reposo. Además, se ha encontrado que ciertas vitaminas y drogas pueden inducir a que las células en G_D , pierdan su diferenciación regresando a G_D (SCOTT y col., 1982b; WIER y col., 1983). Se ha observado también, que la síntesis de DNA no es necesaria para que ocurra la diferenciación (YUN y col., 1983).

Estos autores terminan sugiriendo que los controles del crecimiento a nivel de G_S , G_C ó G_N , son como procesos salvavidas que previenen a los proadipocitos para crecer en condiciones adversas (masificación ó

medio ambiente deficiente, en factores de crecimiento o nutrientes).

2) Bioquímica del ciclo celular

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

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

importante papel en la estructura y función de la cromatina cuando la célula progresa a través del ciclo proliferativo, (RATTLE y col., 1.978).

La síntesis de DNA, al igual que las histonas, ocurre solamente durante la fase S. Una rápida incorporación de timidina tritiada es detectada generalmente en el punto inicial de la fase S. Durante esta etapa, el DNA replica toda su masa. Sin embargo, la síntesis de DNA no comienza en todas las partes de los cromosomas al inicio de la fase S (HAMLIN y PARDEE, 1.978) Los cromosomas contendrían unidades de replicación (replicones) que se duplicarían en diferentes momentos de la fase S. Deben por tanto, existir señales secuenciales que marquen el inicio de grupos de replicones, aunque no se sabe cuales son estas señales.

Por otra parte, la formación de RNA mensajero, transferente y ribosómico tiene lugar a lo largo de toda la interfase, mientras que en la mitosis cesa la síntesis de RNA. Las células quiescentes producen RNA de forma menos rápida que las células en crecimiento, y cuando aquéllas son activadas para crecer, el transporte de pre-

cursores de RNA y la síntesis de RNA aumenta en pocas horas (BASERGA, 1.976). Una fuerte inhibición de la síntesis de RNA bloquea la entrada de estas células estimuladas en la fase S (BASERGA, 1.976), aunque algunos datos indican que no es esencial la presencia de nuevo RNA ribosómico (KLEIN, 1.982).

Se han llevado a cabo una serie de experimentos con la finalidad de detectar aquellas sustancias bioquímicas que pudieran regular las distintas fases del ciclo celular, particularmente G_1 .

El crecimiento de la célula normal "in vivo" y en cultivo depende, principalmente, de factores externos (SATO y ROSS, 1.979; GOSPODAROWICZ y col., 1.978). Estos factores deben, primeramente, entrar en contacto con la membrana y, alterándola de alguna manera o bien atravesándola, ejercer sus efectos en el interior de la célula. Existen numerosos factores externos reguladores del crecimiento celular como veremos más adelante, pero ahora sólo nos ocuparemos de estudiar aquellos procesos bioquímicos que ocurren en el interior de la célula cuando moléculas activadoras como mitógenos o antígenos, se unen a la superficie celular es-

timulando la mitosis.

KLEIN (1.982), resume las secuencias bioquímicas de los linfocitos T estimulados por mitógenos o antígenos, en las siguientes etapas: recepción de la señal, alteración de la membrana plasmática, transmisión de la señal de la membrana al núcleo y cambios en el núcleo.

a) Recepción de la señal

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

Parece ser, que la molécula activadora debe de permanecer conectada al receptor durante un cierto tiempo, para que se produzca la señal iniciadora del crecimiento celular, pero no es necesaria su presencia cuando comienza la síntesis de DNA, incluso puede ser quitada varias horas antes de que ésta ocurra.

b) Alteración de la membrana plasmática.

- Entrada de compuestos al interior celular.

Al poco tiempo, unos veinte minutos, de la conexión de la molécula activadora al receptor de membrana,

se intensifica la penetración en la célula de nucleósidos, azúcares, aminoácidos, fosfato, colina y Ca^{+2} ; también aumenta la actividad de la bomba $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$.

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

-Cambios en los lípidos de membrana

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

-Interpretación de los cambios en la membrana

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

Cuando se activa PMT I metila a PE y la convierte en fosfatidil-N-monometil-etanolamina (PME). PME es ca-

talizado ahora por PMT II que lo transforma, por adición de dos grupos metilos, en PC. Los fosfolípidos metilados son translocados por tanto, desde la parte interna de la membrana a la externa, siguiendo el mecanismo "flip-flop". Esta translocación disminuye la viscosidad lipídica y por lo tanto aumenta la fluidez de la membrana, facilitando los movimientos laterales de los receptores u otras moléculas de membrana (HIRATA y AXELROD, 1980).

Se cree que el aumento de la fluidez afecta al menos, a tres importantes procesos. Primero, la ATPasa dependiente de Ca^{+2} , enzima que regula el flujo de Ca^{+2} al interior celular, se altera de tal forma que permite la entrada de Ca^{+2} a la célula. Segundo, se afecta la ATPasa- Na^+ , K^+ , intensificándose el transporte de estos dos iones. Y tercero, la adenil-ciclasa resulta también afectada, influyendo en los niveles de AMPc en el citoplasma.

c) Transferencia de la señal de la membrana al núcleo

Esta fase es la menos conocida de los procesos activadores de la célula. La transmisión de la señal es, al parecer, mediada por un hipotético segundo mensajero

(el primer mensajero, sería la molécula externa estimuladora).

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

Se ha intentado relacionar los nucleótidos cíclicos, AMPc y GPMc, con la regulación del crecimiento celular (PASTAN y JOHSON, 1.974). Así, si se aumentaba la cantidad de AMPc intracelular añadiendo dibutiril-AMPc o prostaglandina E_1 en el medio, generalmente se inhibía el crecimiento de fibroblastos no transformados y las células se acumulaban en G_0 o G_1 . ABELL y MONAHAN (1.973), indicaron también que altas concentraciones de AMPc, suprimen la proliferación celular y en algunas células, los niveles de AMPc son mínimos durante la mitosis. Se pensó así, que un intenso descenso en el AMPc podría ser la señal iniciadora de la división celular.

HADDEN y HADDEN (1.972), estudiando la transfor-

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

Algunos datos sugieren relaciones reciprocas entre el AMPc y el GMPc. Por ejemplo, la estimulación de la división celular se relaciona con el aumento del GMPc y la disminución de AMPc intracelular, mientras que el detenimiento de la proliferación se acompaña del fenómeno

opuesto. Probablemente, estas variaciones sean las que regulen la proliferación celular.

Estas generalizaciones, sin embargo, son un tanto prematuras ya que existen experiencias que las contradicen. Los fibroblastos no transformados en cultivo, cuando se hacen confluyentes dejan de dividirse. No se ha encontrado incrementos de AMPc en los fibroblastos confluyentes. También se ha observado que en células proliferantes, la variación de GMPc no variaba, incluso descendía.

Como vemos, no existe un acuerdo con respecto a un único papel del AMPc o GMPc en el control del crecimiento, lo que produce datos conflictivos (REBHUN, 1.977). Con respecto a los linfocitos, KLEIN (1.982) señala igualmente, que las experiencias son contradictorias en cuanto a la concentración y actuación precisa que estos metabolitos pudieran tener en la proliferación celular.

Es conveniente indicar por último, en relación con estos nucleótidos cíclicos, que una de sus principales funciones es activar a las proteínas-quinasas, enzimas que fosforilan una serie de proteínas y de esta forma

aumentan o disminuyen sus actividades (GREENGARD, 1.978). Constituyen indicios de que las proteínas-quinasa AMPc-dependientes están implicadas en el control del crecimiento, en primer lugar, que las células mutantes defectivas en una proteína-quinasa no pueden ser detenidas en la fase G_1 del ciclo celular (COFFINO y col., 1.976) en segundo lugar, dos proteínas-quinasa AMPc-dependientes son sintetizadas en estadios específicos del ciclo celular, en forma que se correlacionan con los acontecimientos del crecimiento celular (HADDOX y col., 1.980).

Otros candidatos para segundos mensajeros son los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ y K^+ . Las concentraciones intracelulares de estos iones dependen de sistemas de transporte (NAIDITCH y CUNNINGHAM, 1.977) y su captación es estimulada por suero y factores de crecimiento (McKEEHAN y McKEEHAN, 1.980). Los iones activan varias enzimas y procesos metabólicos incluyendo las proteínas-quinasa y ATPasas, y estimulando la síntesis de proteínas y la producción de energía por el sistema glucolítico. Las funciones del Ca^{+2} son mediadas por la calmodulina, una proteína ligadora específica para este ión (CHEUNG, 1.980 MEANS y DEDMAN, 1.980). El Ca^{+2} y el AMPc están interrelacionados con sus efectos sobre varios importantes pro-

cesos, como la actividad de las proteínas-quinazas y la formación de microtúbulos (WHITFIELD y col., 1.980).

d) Cambios en el núcleo

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

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

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

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

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

C) FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO CELULAR

Son muchos los factores que se sospecha pudieran tener un efecto regulador sobre el crecimiento celular. Se han encontrado numerosas sustancias capaces de estimular la proliferación celular y en menor proporción sustancias para inhibirla. No sabemos si todas ellas tienen un efecto regulador "in vivo" o son artefactos detectados "in vitro". Comentamos seguidamente, algunos de estos factores.

1) Agotamiento del medio

El mecanismo más simple que determina la inhibición del crecimiento celular es el agotamiento del medio, en el que se desarrolla la célula (HOLLEY, 1.972). La depleción de nutrientes, y principalmente de factores de crecimiento (STOKER, 1.973), así como la acumulación de productos de desecho y variaciones del pH, son factores por sí solos, con capacidad de inhibir la proliferación celular. No obstante, pensamos que la inhibición celular, no depende únicamente de estas situaciones aleatorias, sino que hay una serie de factores y

sistemas que contribuyen activamente a esta inhibición.

2) Inhibición por contacto

ABERCROMBIE y HEAYSMAN (1.964), definieron la inhibición por contacto como el fenómeno ocurrido en los cultivos de células normales mediante el cual, al producirse el contacto entre las células, cesa la proliferación y la motilidad de las mismas, así como la irregularidad de sus membranas.

La causa de este fenómeno se debe, probablemente al paso de sustancias químicas de bajo peso molecular de una célula a otra.

BURTON (1.975), denomina a esta/s hipotética sustancia: "sustancia clave", que tendría la particularidad de inhibir el ciclo celular en G_1 ; cuando a nivel intracelular alcanzase un determinado umbral, esta sustancia pasaría por simple difusión, de una célula a otra actuando sobre células en asincronía. Según BURTON esta/s sustancia podría ser H^+ ó OH^- ; más claramente, variaciones en el PH que se transmitirían de unas células a otras. Sin embargo, considera también que otros posibles candidatos podrían ser los iones Na^+ y K^+ ó incluso poliaminas y prostaglandinas.

3) Poliaminas

La 1,4-butanodiamina (putrescina) y dos de sus poliaminas derivadas, espermidina (una triamina) y espermina (una tetramina), son compuestos básicos que se hallan en todas las células vivientes. Se encuentran en concentraciones muy diversas en los tejidos, plantas, animales, bacterias y hongos, pero en general su concentración es baja en las células de crecimiento lento o inactivas, y altas en las células de crecimiento rápido.

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

Se ha demostrado que los cultivos celulares depletados de poliaminas, no pueden sobrevivir más de una generación (HEBY y col., 1.978) y que su presencia es esencial para un óptimo crecimiento celular, de tal forma que las sustancias inhibidoras de la biosíntesis de poliaminas, provocan una parada de las células en la fase G_1 . Se ha evidenciado igualmente, su papel es-

timulador de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (TABOR y TABOR, 1.976).

Sin embargo, paradójicamente, las poliaminas pueden actuar como potentes inhibidores de la proliferación celular. El mecanismo para ejercer esta actuación depende de un enzima, la poliaminaoxidasa, que desamina los grupos aminos terminales de la espermidina y espermina, convirtiéndolas en aminoaldehidos, los cuales serían los auténticos responsables de la inhibición del crecimiento celular (SMITH y col., 1.983).

Por otro lado, el proceso de síntesis de las poliaminas, a partir de la ornitina, se realiza a través de un sistema de descarboxilación y reacciones de transferasas. La velocidad de la biosíntesis parece ser controlada por la primera enzima del sendero, la ornitina descarboxilasa, que elimina el grupo carboxilo de la ornitina para producir putrescina. Se ha comprobado que este enzima presenta unos niveles bajos durante el estado de reposo celular, pero que se incrementa rápidamente durante la proliferación celular (HEBY, 1.983).

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

4) Prostaglandinas

Ciertas prostaglandinas (PG) como la PGE_1 y PGE_2 estimulan la formación del AMPc en determinados tejidos y células (SAMUELSSON y col., 1.979) y ya se ha visto que este nucleótido cíclico parece tener un papel importante en la regulación del crecimiento celular (ABELL y MONAHAN, 1.973; PASTAN y JOHSON, 1.974). Se ha observado también, que tanto la PGA como la PGE, tienen capacidad para inhibir la proliferación de una serie de células tumorales (TURNER y col., 1.982; MAYSCHAK y col., 1.982), así como células normales (PELUS, 1.982).

La amplia difusión de las prostaglandinas en todo nuestro organismo, sugiere la posibilidad de que pudieran ser factores de crecimiento, probablemente implicados como antes indicábamos, en la inhibición por contacto. Dado su carácter lipídico, penetrarían fácil-



mente en la célula desarrollando dentro de ésta su función inhibidora.

Se ha observado que diversos factores del crecimiento, parte de los cuales se estudiarán después, estimulan la producción de PG, especialmente la PGE_2 (LEVINE, 1.982), por lo que podemos pensar que los factores del crecimiento al estimular a las células a proliferar, éstas determinarían la producción de PGE_2 y éste a su vez, mediante un mecanismo feed-back, inhibiría el crecimiento celular; de esta manera y por este sistema de efectos opuestos, la proliferación celular queda regulada.

Por el contrario, la $PGF_{2\alpha}$ se muestra como un factor estimulador del crecimiento celular; el efecto de esta prostaglandina parece estar modulado por hormonas como la insulina e hidrocortisona (JIMENEZ DE ASUA y col., 1.982).

5) Chalonas

La actividad mitótica es superior durante el sueño y menos intensa durante el ejercicio o stress. Esto es debido a ciertas hormonas liberadas durante el stress, principalmente adrenalina y glucocorticoides,

que inhiben la mitosis en todo el organismo. Sin embargo, estas hormonas son sólo una parte del mecanismo regulador de la mitosis. Existen otras sustancias, que actúan como inhibidores mitóticos, llamadas chalonas ("frenadoras") y que probablemente sean liberadas o activadas por las hormonas del stress. Las chalonas son tejido-específicas pero no especieespecíficas. Por ejemplo, las chalonas de la piel de conejo inhibirán la mitosis de las células epidérmicas de conejo o ratón, pero no inhibirán la mitosis de cualquier otro tejido.

La primera idea de chalonas la apuntó BULLOUGH, (1.962), considerándolas como reguladoras de la proliferación celular, mediante un mecanismo feedback. Las chalonas se han descubierto en numerosos tejidos y células, y aunque no están definidas bioquímicamente de forma exacta, parecen ser polipéptidos o proteínas de bajo peso molecular. Son capaces de inhibir de forma específica, pero reversible, la mitosis de tejidos diferenciales.

En la epidermis y otros tejidos de mamíferos, se producen dos tipos chalonas. Una de ellas, la chalona G₁, bloquea el paso de la fase G₁ a la fase S y es una

sustancia termoestable de bajo peso molecular (2.000 a 10.000 Daltons). Sustancias con propiedades semejantes a la chalona G1, han sido detectadas también, en la glándula mamaria (GONZALEZ y VERLY, 1.978), y en el hígado (SEKAS y COOK, 1.976).

La chalona del tipo G2, impide la entrada de la célula en mitosis y tiene un peso molecular entre 25.000 y 50.000 Daltons. Se ha detectado en linfocitos humanos y fibroblastos (HOUCK y ATTALAH, 1.975).

No se sabe el mecanismo a través del cual actúan las chalonas, aunque algunos autores piensan que se localiza en la membrana celular, impidiendo el paso de nutrientes, especialmente el Ca^{+2} , al interior de la célula.

6) Hormonas y otros factores del crecimiento.

La insulina ejerce múltiples acciones sobre un gran número de tejidos. Además de incidir sobre diversos sistemas enzimáticos, promueve la entrada de metabolitos en la célula. De manera muy especial, la insulina intensifica el transporte de glucosa al interior celular; también eleva la permeabilidad de la célula a lípidos, aminoácidos y K^{+} . Este incrementado transporte de nutrientes

al interior de la célula, inducido por la insulina, justificaría la actividad mitogénica de la hormona. Por otro lado, se ha señalado que algunos factores estimuladores del crecimiento (como veremos después) podrían conectar con el receptor de la insulina, en la superficie de la célula, ejerciendo su actividad mitótica sobre ésta.

La hormona del crecimiento, en conjunción con las somatomedinas, también tiene capacidad de activar la proliferación celular.

El cortisol y la hidrocortisona, en determinadas concentraciones, estimulan el crecimiento celular aunque también pueden inhibirlo, dependiendo de la concentración.

Otros factores con características hormonales son la eritropoyetina, que estimula la proliferación de hematíes por la médula ósea; las interleuquinas (de forma inespecífica) y los antígenos (de manera específica) inducen la proliferación de los linfocitos.

7) Factores estimuladores del crecimiento

Además de aquellas sustancias, indicadas hasta

aquí, con efecto regulador (negativo o positivo) sobre el crecimiento celular, se han descubierto otra serie de factores adicionales, que extraídos de diversos tejidos, han demostrado su capacidad de estimular la proliferación celular. Algunos de éstos serán estudiados a continuación.

. Factor del crecimiento epidérmico, EGF (Epidermal growth factor).

La existencia de EGF se detectó hace unos 20 años en la glándula submaxilar de ratón, cuyo extracto, inyectado en ratones recién nacidos, indujo una apertura precoz del párpado y la salida prematura de los incisivos (COHEN, 1.962). La apertura precoz del párpado fue debida a una estimulación del crecimiento epidérmico y queratinización. El factor responsable de este efecto fue aislado, encontrándose que era un polipéptido de bajo peso molecular (5.700), termoestable y no dializable (SAVAGE y COHEN, 1.972). El EGF humano, homólogo al de ratón, fue igualmente aislado e identificado en la orina normal (COHEN y CARPENTER, 1.975.).

GREGORY (1.975), sugiere que la urogastrona, hormona antisecretoria gástrica, aislada de la orina normal

humana es probablemente idéntica al EGF.

Los efectos mitogénicos del EGF han sido estudiados sobre una gran variedad de células, observándose que provoca una serie de acontecimientos celulares tales como: estimulación del transporte, incremento del recambio del fosfatidil inositol, aparición de irregularidades morfológicas en la membrana, estímulo de endocitosis, inducción de la ornitina descarboxilasa, activación de la síntesis de RNA y proteínas, activación de la síntesis de macromoléculas extracelulares e iniciación de la síntesis de DNA y replicación celular (CARPENTER y COHEN, 1.979).

Se ha indicado, que en los fibroblastos humanos pueden haber de 40.000 a 100.000 receptores de membrana, por célula, para el EGF (HOLLENBERG y CUATRECASAS, 1.975). Parece ser, que diversas células de distinto tipo, presentan receptores para este factor, por lo que se piensa que tiene actividad sobre distintos tejidos.

El receptor, probablemente una glucoproteína, tiene un peso molecular de 170.000. Cuando el EGF conecta con el receptor, éste desarrolla la actividad enzimática

de tirosín-quinasa, es decir el receptor activado, actúa como enzima y sustrato al mismo tiempo, siendo el resultado final la fosforilación de sus residuos de tirosina. No se sabe qué relación puede tener la fosforilación del receptor con la estimulación celular; no obstante, se ha observado que otros factores del crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF: Platelet derived growth factor) y la insulina, producen también una fosforilación de los restos de tirosina (EK y col., 1982).

• Factor del crecimiento fibroblástico, FGF
(Fibroblast growth factor).

Fue aislado por GOSPODAROWICZ (1975), de la hipófisis bovina. Aunque su nombre se debe al hecho de que en principio estimulaba la proliferación de fibroblastos más tarde se comprobó que también estimulaba otra serie de células de origen mesodérmico (GOSPODAROWICZ y HANDLEY, 1976).

Su posible función biológica estaría relacionada con la regeneración de las heridas. Se trata de un **peptido**

termolábil, de un peso molecular próximo a los 13.000 daltons. Parece ser independiente del factor de crecimiento nervioso (NGF: Nerve Growth Factor) y del EGF, pues en este último caso, se observa que no se unen al mismo receptor.

El FGF induce la proliferación en células que han sido inhibidas por contacto

1. Factor de crecimiento nervioso, NGF (Nerve Growth Factor).

Descrito por LEVI-MONTALCINI (1964) como un polipéptido capaz de estimular las células de origen nervioso, se obtiene de la glándula submaxilar de ratón.

SCHUBERT (1984) lo describe como un conjunto de tres subunidades protéicas, denominadas: α_2 , γ_2 y β que retienen uno o dos iones Zn^{++} . Parece ser que la actividad sobre las células nerviosas, se encuentra en la fracción β . Esta fracción tiene cierta semejanza con las cadenas de la insulina.

Determinados órganos que van a ser inervados, sintetizan NGF para mantener las interacciones sinápticas.

Ratones que fueron tratados con anticuerpos dirigidos contra NGF, sufrieron una destrucción de los gán-

glios simpáticos, probablemente por degeneración de las neuritas distales.

SCHUBERT (1984), detalla cada una de las etapas que transcurren desde que este factor se une a un receptor de membrana, de alta afinidad, hasta que es internalizado por la célula y degradado por los lisosomas. Baste indicar que, de nuevo, aparecen implicados en estos mecanismos los niveles de AMPc, y de Ca^{+2} , así como una serie de reacciones de metilación de fosfolípidos de membrana y reacciones de fosforilación.

. Factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

Es liberado al suero, durante los procesos de coagulación, por los gránulos alfa de las plaquetas. Estimula la proliferación de las células inhibidas por contacto (PLEDGER y col., 1977). Parece ser que el PDGF predispone a la célula en una situación tal, que ésta se muestra sensible a otros factores del crecimiento. Es un polipéptido termoestable, con un peso molecular de 32.000.

Se han caracterizado aquellos factores del crecimiento, presentes en el plasma, que estimulan la proliferación de las células previamente preparadas

por el PDGF. Un grupo de estos factores son las somatomedinas, polipéptidos que tienen una gran semejanza con la secuencia de aminoácidos de la proinsulina. Las somatomedinas, cuya concentración plasmática está controlada por la hormona del crecimiento, parecen regular el crecimiento del cartílago y la talla y peso corporal de los mamíferos (VAN WYK y UNDERWOOD, 1978). Células tratadas con PDGF proliferan muy poco cuando el medio se suplementa con suero de ratas hipofisectomizadas. Si a este suero se le añade somatomedina, se inicia la proliferación celular (STILES y col., 1979). Elevadas concentraciones de insulina pueden reemplazar a la somatomedina en el papel del crecimiento celular.

Otro factor que actúa activando las células preparadas por el PDGF, es el EGF. Una elevada concentración de PDGF, EGF y somatomedina, por si solos independientemente, estimulan muy débilmente la proliferación celular, pero en combinación, actúan eficazmente induciendo la replicación celular incluso en medios libres de suero (SCHER y col., 1982).

Cada uno de estos tres factores actúa sobre distintos receptores de membrana, pero la conexión del PDGF con su receptor específico, durante un breve periodo

de tiempo, parece regular a los receptores para EGF y somatomedina, los cuales necesitan estar conectados más tiempo para producir una activación del crecimiento celular.

La forma en que actúa PDGF no es bien conocida, pero se ha señalado que tras conectar con el receptor, induce la síntesis de una familia de proteínas citoplasmáticas, con pesos moleculares entre 29.000 y 70.000 (PLEDGER y col., 1981; SCHER y col., 1981). Una de estas proteínas (pI, 29.000) aparece a los 40 minutos después de haber añadido el PDGF, y la otra (pII, 35.000) a los 60 minutos. No se sabe que efecto pueden tener estas proteínas sobre la funcionalidad descrita para el PDGF.

D) CRECIMIENTO DE LA CÉLULA TUMORAL

La característica fundamental de cualquier célula tumoral es la de presentar una disregulación de su proliferación. Con esto no queremos decir que la tasa de proliferación en la célula tumoral sea muy superior a la de los tejidos normales, ya que se ha observado que la proliferación de las células tumorales nunca excede a la tasa de crecimiento máximo de sus tejidos normales homólogos, e incluso es inferior a la de los tejidos embrionarios, hígado en regeneración o epitelio de la mucosa intestinal (SHAPOT, 1980).

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

A pesar de todo, como más tarde comentaremos, hay autores que piensan que la autonomía del tumor no es total y bajo determinadas condiciones, su crecimiento puede ser controlado.

1) Células madre (stem cells) en el cáncer

Desde el punto de vista de los patólogos, el concepto de malignidad va íntimamente unido al de indiferenciación celular. Hasta hace poco, se ha venido pensando que cualquier célula del organismo diferenciada o no diferenciada, era posible transformarse renoplásicamente. Para el caso de transformación de una célula diferenciada, se suponía que esta sufría un proceso de dediferenciación. Actualmente, este punto de vista está desechado y se sabe, hoy en día, que las auténticas diana de la carcinogénesis son las células madre. Estas células madre transformadas pueden a su vez diferenciarse, más o menos, siguiendo los pasos fisiológicos de la diferenciación normal, aunque manteniendo su estado de transformación maligna (PIERCE, 1982).

2) Transformación neoplásica "in vivo"

La carcinogénesis en humanos y animales, resulta del desarrollo de una serie de defectos en la célula madre que es la diana de este proceso (PIERCE y col., 1978). En este proceso se han establecido 2 pasos: iniciación y promoción (BERENBLUM, 1982).

Para el desarrollo de la carcinogénesis, la célula madre primeramente, debe de ser iniciada por carcinógenos químicos o físicos o por ciertos virus; después, para que la transformación neoplásica sea completa, tales células deben ser expuestas a un agente promotor.

La iniciación es un corto intervalo, durante el cual un agente carcinogénico puede inducir un cambio en una célula que quedã predispuesta a la transformación maligna.

La promoción consiste en un periodo más prolongado, en el que repetidas exposiciones a un agente activo, puede determinar dicha transformación.

La iniciación es aceptada, generalmente como un proceso en el que se induce una lesión irreversible en el DNA de la célula madre, que la hace susceptible a la acción de un agente promotor. A nivel clínico, se conoce esta situación como un estado preneoplásico: displasia severa o carcinoma "in situ"; alteraciones que pueden persistir durante muchos años antes de convertirse en tumores.

Por lo común, los agentes promotores no son mutagénicos y no inducen tumores por sí mismos, sin em-

bargo, son mitogénicos (COLBURN, 1980), pudiendo producir hiperplasias y tumores benignos (BOUTWELL y col., 1982). Los efectos del promotor sobre células no iniciadas suelen ser reversibles, y para actuar sobre células iniciadas deben superar determinados umbrales de dosis. Los promotores incluyen diversos compuestos entre los que se encuentran, la sacarina y el fenobarbital. En algunos casos, se ha observado que los factores del crecimiento también pueden actuar como agentes promotores.

3) Transformación neoplásica "in vitro"

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

El concepto de malignidad "in vivo" o desde un punto de vista clínico está, mas o menos delimitado; depende de la capacidad invasiva o metastatizante del tumor. Sin embargo, es difícil equiparar ese concepto "in vitro".



Los investigadores continuamente están buscando una característica que al aparecer en una célula estudiada "in vitro", la puede definir indiscutiblemente como maligna, sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado una característica claramente diferenciadora. No obstante, existen una serie de propiedades que, por sí solas, no definen a una célula como tumoral, pero que en conjunto nos permiten, muy aproximadamente, definirla como tal.

Al realizar un cultivo de un tejido normal cualquiera, se observan las siguientes características:

- Las células se dividen durante un cierto tiempo, transcurrido el cual dejan de hacerlo (C.L.⁺: Crecimiento limitado).

- Cuando las células se hacen confluyentes dejan de dividirse, debido a la inhibición por contacto (I.C.⁺: Inhibición por contacto).

- A excepción de las células hematopoyéticas normales, que suelen crecer en suspensión, el resto de los tejidos lo hacen en monocapa (A.D.⁺: Anclaje dependientes).

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

- Cuando las células cultivadas son inoculadas en el animal de origen, su proliferación es controlada por los mecanismos homeostáticos del organismo (T^- : No tumorogénicas).

Los fibroblastos humanos, por ejemplo, pueden permanecer dividiéndose durante 50 generaciones y después dejan de hacerlo, pero al final, conservan las características que acabamos de enunciar (HAYFLICK y MOORHEAD, 1961).

Al mantener un cultivo de células normales, algunas células pueden pasar a un estadio de inmortalización, adquiriendo la capacidad de multiplicarse en cultivo indefinidamente ($C.L.^-$). Estas células son $A.D.^+$; pueden ser también aneuploides ($2N^-$); mantienen la capacidad de inhibirse por contacto ($I.C.^+$) y son incapaces de producir tumores "in vivo" (T^-). Pueden considerarse como células iniciadas. Los fibroblastos de ratón, con frecuencia, tienen la facilidad de inmortalizarse en cultivo (TODARO y GREEN, 1963).

Las células con crecimiento limitado o células inmortalizadas, mediante tratamiento con ciertas sustancias químicas, virus o bien espontáneamente, pueden perder la capacidad de inhibirse por contacto ($I.C.^-$); crecen ilimitadamente ($C.L.^-$), se vuelven $A.D.^+$ y además

son aneuploides ($2N^-$), sin embargo no tienen la capacidad de producir tumores. Podemos considerar este estadio como una situación avanzada de la célula iniciada (STILES y col., 1976).

El siguiente estadio es la transformación neoplásica que ocurre de forma espontánea, mediante virus o carcinógenos químicos. Las células transformadas crecen ilimitadamente ($C.L.^-$), no se inhiben por contacto ($I.C.^-$), suelen ser aneuploides ($2N^-$) pero tienen la propiedad de producir tumores "in vivo" al inocularlas en el receptor apropiado (PASTAN, 1979). Aunque hay células transformadas que mantienen un relativo anclaje ($A.D.^+$), una característica importante de la transformación es la pérdida de la dependencia al anclaje ($A.D.^-$). Todas estas características pueden identificar a una célula como tumoral.

A pesar de todo, no podemos asegurar que los pasos que llevan a la transformación, sean idénticos a los pasos que conducen a la carcinogénesis.

4) Factores reguladores del crecimiento y células tumorales

Las variaciones de las propiedades y factores bioquímicos de las células tumorales en relación con las

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

TGF.- Se ha observado que las células neoplásicas tienen una menor necesidad de nutrientes y factores del crecimiento cuando son cultivadas (EAGLE y col., 1970). Una posible explicación para este fenómeno es que las células tumorales secreten sus propios factores del crecimiento (TGF: Transforming Growth Factors). (TODARO y DE LARCO, 1978).

Los TGF están relacionados de alguna forma con los EGF ya que aquellos tumores con capacidad de producir TGF presentan menor número de receptores para EGF; por ello se supone que los factores sintetizados por el tumor pueden sustituir la posible actividad estimuladora de los EGF. Los TGF son polipéptidos funcionalmente relacionados con los EGF pero al contrario que éstos, inducen una transformación en las células normales en cultivo; principalmente, determinan la pérdida de anclaje característico de las células no transformadas, aunque este efecto es reversible, pues desaparece cuando se eliminan del medio los TGF (TODARO y col., 1982).

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

Los TGF son una familia de péptidos termoes-
tables, con un peso molecular alrededor de 7.400. A pe-
sar de competir con EGF por el mismo receptor y de
tener algunas características fisico-químicas comunes,
no son la misma molécula ya que presentan diferencias
en su composición de aminoácidos y los anticuerpos diri-
gidos frente a EGF no reconocen a TGF (TODARO y col.,
1982).

Estos factores del crecimiento sintetizados
por las células tumorales, permitirían que estas se vol-
vieran autónomas, en relación con su crecimiento celular,
al no depender de la presencia de factores de crecimen-
to exógenos.

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

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

Prostaglandinas.- Las células tumorales aumentan la síntesis de prostaglandinas (PG), sobre todo la PGE. Ya se ha visto que la PGE y la PGA, son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales y normales (TURNER y col., 1982; MAYSCHAK y col., 1982; PELUS, 1982).

Sin embargo, se ha observado que las células de médula ósea de pacientes con leucemia monocítica crónica, son menos sensibles a la inhibición por PGE que las células de médula ósea de individuos normales (PELUS, 1982). Estos resultados podían sugerir que las células tumorales o incluso las células en un estadio anterior al desarrollo del tumor, serían menos susceptibles a la regulación por PGE que las células normales (AGLIETTA y col., 1983).

Poliaminas.- Algunos, pero no todos, de los tumores humanos y animales contienen altos niveles de

ornitina descarboxilasa y elevadas concentraciones de poliaminas. De todas formas, no hay una razón para concluir que un incremento de poliaminas pudiera estar relacionado con el proceso neoplásico, simplemente puede reflejar la variación normal del metabolismo de una célula proliferante (RUSSELL, 1973).

Tampoco se sabe mucho sobre la relación del efecto inhibitor de las poliaminas sobre las células tumorales, quizá estas pudieran ser menos sensibles a la acción inhibitor de las poliaminas, de forma análoga a como ocurre en la PGE (QUASH y col., 1979).

5) Ciclo celular en las células tumorales

SCOTT y col., (1984), han encontrado en el sistema de proadipocitos 3T3 T (ver apartado B.1 de introducción) que mientras las células 3T3 T normales tenían capacidad de parar en el estadio G_D , diferenciarse, así como detenerse en los estadios G_C , G_S y G_N ; las 3T3 T transformadas no podían parar en G_D , diferenciarse, ni detenerse en G_C pero sí podían efectuar parada en G_S y G_N .

Observaron que ciertos clones de estas células, que tenían solamente un defecto en el paro en

G_D y diferenciación, no eran células transformadas o tumorígenas, pero tampoco eran células tumorales aquellos clones de 3T3 T en las que presentado capacidad de paro en G_D y diferenciación tenían, sin embargo, algun defecto en algunos de los otros estadios de G_1 .

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

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

6) Oncogenes

Las primeras experiencias más o menos relacionadas con los oncogenes fueron llevadas a cabo hace unos veinte años, al observar que el virus del polioma podia transformar células fibroblásticas "in vitro". Esta transformación se atribuyó a una inserción del genoma viral en el genoma celular. Si durante la proli-

feración de las células cancerosas obtenidas, los genes víricos insertados se perdían o inactivaban experimentalmente, las células revestían a su estado normal. Por tanto, no sólo se requerían genes víricos para iniciar la transformación, sino que era necesaria su presencia y continua actividad para mantener el fenotipo canceroso.

Desde esa fecha hasta ahora, son numerosas las experiencias realizadas, habiendo quedado claro el concepto de oncogén como porción del DNA relacionada con el proceso neoplásico.

Se han detectado ciertos virus que son portadores de oncogenes (ERICKSON y col., 1980), pero se ha observado también que el genoma de numerosos animales, contiene genes casi idénticos a los oncogenes virales (ROHRSCHEIDER y col., 1979), de tal forma que para distinguir los oncogenes virales de los celulares, han sido denominados respectivamente como vOnc y cOnc .

La detección de cOnc en animales tan inferiores como la drosophila, indica que los cOnc deben de tener una función biológica lo suficientemente importante como para quedar preservados por la evolución de más de 600 millones de años.

Recientes experiencias han definido distintos tipos de v Onc y c Onc, formando dos grupos relativamente amplios, pero en general el producto de codificación de todos estos genes suelen ser proteínas quinasas, principalmente tirosinas quinasas, con la capacidad de fosforilar residuos de determinados aminoácidos componentes de ciertas proteínas del citoplasma y la membrana (CHENG y CHEN, 1981).

En sucesivas ocasiones se ha indicado que la fosforilación de proteínas es un fenómeno relacionado con la proliferación celular. El hecho de que factores del crecimiento como EGF, PDGF y la insulina al conectar con el receptor específico, estimulan tirosinas quinasas (EK y col., 1982; COHEN, 1983) como paso previo al inicio de la proliferación celular, confirman esta relación.

Los productos de los oncogenes en las células normales se encuentran normalmente expresados, aunque en concentraciones muy inferiores a las células tumorales. Parece ser por tanto, que en la célula tumoral se produce una disrregulación de oncogenes normales, con la síntesis de gran cantidad de productos implicados en la estimulación celular; todo ello determinaría que esta función ocurra en exceso (LAND y col., 1983).

Hemos visto que existen grupos de oncogenes v Onc y c Onc. El proceso neoplásico puede estar relacionado independientemente con cada uno de ellos, incluso se han observado situaciones en que varios de ellos se han activado en una única célula (LAND y col., 1983).

Al ser la transformación neoplásica una serie de etapas ordenadas, es probable que haya una activación sucesiva de las oncogenes a lo largo de las distintas etapas. No obstante, los oncogenes por sí mismos no determinan la transformación neoplásica, es necesario la acción conjunta de determinados factores iniciadores (virus, carcinógenos, radiaciones, etc.) y promotores (factores del crecimiento, ciertas drogas, etc.) que influyen en la activación de los oncogenes.

Recientemente está cobrando importancia la idea de unos posibles genes reguladores que controlarían la expresión de los oncogenes (BISHOP, 1982). En nuestra opinión, si aceptamos la existencia de estos genes reguladores, podríamos explicar los diversos mecanismos de la activación de los oncogenes que determinan la transformación neoplásica.

Existen determinados virus oncogénicos que no poseen oncogen (Ejemplo: el virus de la leucemia aviar),

pero cuando se inoculan en ave dan lugar a un linfoma. Este linfoma expresa con gran intensidad el oncogén c Myc. Se ha demostrado que el virus se integra en el genoma celular en un lugar proximo a la localización del c Myc (HAYWARD y col., 1982). Es probable que este virus se integre en un lugar ocupado o relacionado con la actividad de un posible gen regulador del oncogen c Myc, bloqueando su actividad y derreprimiendo el gen c Myc, cuyos productos sintetizados en gran cantidad provocarían la transformación celular.

Otro ejemplo de bloqueo del posible gen regulador ocurriría en las translocaciones cromosómicas, evidenciadas en numerosas células tumorales. Se ha observado que los cromosomas translocados contiene determinados oncogenes (TAUB y col., 1982), los cuales podrían haberse librado de la actuación represora de los genes reguladores.

El caso de los tumores inducidos por virus portadores de oncogenes (ERIKSON y col., 1980), podría explicarse suponiendo que el virus al insertarse en el genoma lo hace en un lugar libre, no próximo a genes reguladores, por lo que el oncogen viral podría expresarse.

Los carcinógenos químicos, radiaciones e incluso determinados virus pueden provocar mutaciones que

podrían afectar al gen regulador o bien directamente al propio oncogén celular (REDDY y col., 1982). Tanto en un caso como en otro, el oncogén celular podría activarse y determinar la formación de la neoplasia.

Vemos por tanto como la existencia de un hipotético gen regulador unificaría los distintos mecanismos conocidos de la oncogénesis, siendo su estudio de gran utilidad para un mejor conocimiento de la misma.

Entendemos el proceso neoplásico como una alteración celular cuya consecuencia principal es una disregulación del crecimiento. Es un proceso que consta de distintas etapas, activadas por una serie de agentes exógenos (carcinógenos, virus, drogas, radiaciones, etc.). Durante estas etapas se produce la activación de uno o más oncogenes. Los oncogenes, que en condiciones normales están, probablemente, controlados por genes reguladores, sintetizan proteínas quinasas reguladoras del crecimiento celular. Al activarse los oncogenes en el proceso neoplásico, codifican un exceso de sus productos (proteínas quinasas), lo que determina una intensa actividad de la proliferación celular.

La célula ya transformada, desarrolla la capacidad de sintetizar TGF lo que potencia su proliferación. Por otra, se vuelve mas insensible a los factores inhibidores del crecimiento como es la prostaglandina E; está desviación en favor de las fuerzas estimuladoras del crecimiento celular, conjuntamente con el debilitamiento de los procesos inhibidores, constituiria la base de la disrregulación del crecimiento de la célula tumoral.

OBJETO DE LA TESIS

OBJETO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis es el estudio y caracterización de factores bloqueadores sintetizados por el linfoma T MCG3. Se estudiará la actividad del extracto de MCG3 sobre la proliferación de células inmunes y no inmunes, para determinar si su actuación es específica de células inmunes; sobre células de ratón y humanos, para evidenciar su especie-especificidad y sobre células normales y tumorales, para detectar cualquier efecto diferencial en uno u otro tipo de células. Así mismo, determinaremos las características fisico-químicas de estos factores bloqueadores.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Todo el material biológico empleado, así como reactivos y disoluciones, se ha sometido a un proceso de esterilización.

A) CELULAS Y SUEROS SANGUINEOS

1) ANIMALES

Se han utilizado ratones de las siguientes cepas endogámicas:

- BALB/C (H-2^d)
- DBA/2 (H-2^d)
- B10 (H-2^b)
- C57 BL/6 (H-2^b)

Criados en el criadero de animales del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina, procedentes de padres donados por Charles River (Francia).

a) Células normales de ratón

De ratones de la cepa endogámica BALB/C (H-2^d), hemos obtenido las células normales siguientes:

- Células de médula ósea (C.M.O.)
- Células de exudado peritoneal (C.E.P.)
- Células de bazo (C.B.)

b) Líneas celulares de ratón

Han sido empleadas nueve líneas celulares de distinto origen, procedentes de diversas cepas endogámicas de ratones:



<u>Cepas</u>	<u>Líneas celulares</u>	<u>Agente inductor</u>
BALB/C (H-2 ^d)	Fibrosarcoma MCG4	3-metilcolantreno
"	Plasmocitoma NS1	Aceite mineral
"	" A1	Choque alogénico
DBA/2 (H-2 ^d)	Leucemia SL2	Espontáneo
"	Mastocitoma P815X2	3-metilcolantreno
"	" P815Y	"
B10 (H-2 ^b)	Linfoma MCG3	"
C57 BL/6 (H-2 ^b)	" TLX9	Rayos X
Swiss-Albino	Carcinoma EHRLICH	3-metilcolantreno

Todas las células tumorales se conservan congeladas en un contenedor de nitrógeno líquido.

c) Sueros sanguíneos animales

- Suero fetal de ternera (Flow, Inglaterra), que se descomplementa a 56°C durante 30 minutos en baño termostatzado y se distribuye en botes estériles para congelarlos hasta el momento de su uso.

- Suero de caballo (Llorente, España), que sigue el mismo proceso de descomplementación.

2) HUMANOS

a) Sangre

Sangre venosa periférica de individuos adultos normales es utilizada para obtener:

- Linfocitos

- Suero AB. Recogido por centrifugación de sangre humana de este tipo, previamente coagulada, se descomplementa y congela de igual forma que los sueros animales.

b) Células tumorales

La línea celular RAJI procedente de un linfoma Burkitt de maxila, fué obtenida de los laboratorios Flow y conservada en contenedor de nitrógeno líquido hasta su uso.

B) REACTIVOS Y DISOLUCIONES

1) PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se disuelven en 800 ml de agua bidestilada y estéril:

- . NaCl (Merck, R.F. Alemania) ... 8'00 g
- . K Cl (" ") ... 0'20 g
- . Na₂HPO (" ") ... 1'15 g
- . K H₂PO (" ") ... 0'20 g

Esta disolución se ajusta a pH fisiológico (7'2) y se completa con agua bidestilada y estéril hasta un volumen de 1.000 ml. Se esteriliza en autoclave, siendo filtrada en el momento de su utilización por filtro Millipore (Ø de poro, 0'22 µ, U.S.A.)

2) Medio de cultivo R.P.M.I.

A 900 ml de agua bidestilada y estéril, se añaden :

- . R.P.M.I.-1640, sin L-glutamina y sin bicarbonato sódico (Flow, Inglaterra) - 10'000 g
- . Penicilina G sódica (Antibióticos S.A., España) - 100.000 U.I.
- . Gentamicina (Antibióticos S.A., España) - 0'050 g

- . Fungizona squibb (Flow) - - - - - 0'250 g
- . L-glutamina (") - - - - - 0'300 g
- . Bicarbonato sódico (Merck, R.F. Alemania) -2'000g

Esta mezcla, tras agitación y ajuste a pH=7'2, se lleva a un volumen de 1.000 ml con agua bidestilada y estéril. Posteriormente se extraen 100 ml de la disolución y se adicionan 100 ml de suero fetal de ternera descomplementando. Finalmente, para su uso, se pasa por filtro Millipore (\emptyset de poro, 0'22 μ).

3) Medio de separación de linfocitos (Linfocoll, España). Se mantiene a temperatura ambiente.

4) Fitoheماغlutinina, PHA (Wellcome, Inglaterra). En forma liofilizada, se diluye en PBS estéril a la concentración de 0'5 μ g/ μ l, congelándose a -20°C.

5) Reactivo de Bradford (Bio-Rad, U.S.A.).

Solución concentrada de azul brillante Coomassie G-250. ácido fosfórico y etanol. En el momento de hacer la determinación, se diluye un volumen de reactivo concentrado en cuatro volúmenes de agua bidestilada y desionizada.

6) Albúmina bovina (Sigma, U.S.A.). Se disuelve, para su uso, en PBS a la concentración deseada.

7) Enzimas:

- Proteasa insoluble, de streptomyces griseus, unida a carboximetil celulosa, 160 unidades/g (Sigma).

- Tripsina insoluble, de páncreas bovino, unida a poliacrilamida, 250 unidades/g (Sigma).

- 8) Etanol absoluto (Merck).
- 9) Cloroformo (Merck).
- 10) Metanol (Merck).
- 11) Prostaglandinas: PGE_1 , PGE_2 , PGA_1 y $PGF_{2\alpha}$ (Sigma). Se disuelven en etanol puro cuando van a ser utilizadas.
- 12) Standar de colesterol (Sigma).
- 13) Cortisona (Merck).
- 14) Aldosterona (Sigma).
- 15) Isótopos:
 - Timidina tritiada ($T-^3H$) con una concentración radioactiva de 1 mCi/ml (Amersham, Inglaterra).
 - Uridina tritiada ($U-^3H$) con una concentración radioactiva de 1 mCi/ml (Amersham).
- 16) Líquido de centelleo.

Se prepara disolviendo 5 g de PPO, (2,5 difeniloxazol, Merck) y 0'500 g de POPOP, (p-bis [2-(5 feniloxazol)] - benceno, Merck) en tolueno (Merck) hasta obtener 1 litro de solución.

C) MATERIAL INSTRUMENTAL

- 1) Autoclave (Hirayama, Japón).
- 2) Estufa Pasteur (Comercial Técnica Hospitalaria S.A., España).
- 3) Contenedor de nitrógeno líquido, DX 55 AT (L'air liquide, Francia).
- 4) Cámara estéril por flujo laminar, Gelaire (Flow, Inglaterra).
- 5) Centrífugas:
 - Centrífuga, Macrotomic (Selecta, España).
 - Centrífuga refrigerada, IEC B-20 A (Damon).
 - Ultracentrífuga, TGA-65 (Kontron, Suiza).
- 6) Microscopio óptico de contraste de fase (Zeiss, R.F. Alemania).
- 7) Cámara de recuento microscópico celular Neubauer (Saaringia, R.F. Alemania).
- 8) Incubador de CO₂ (5%), 3028 (Forma Scientific U.S.A.). Es una estufa, regulada a 37°C, con una atmósfera humedificada y rica en CO₂ (5% de CO₂ y 95% de aire).
- 9) Recolector semiautomático de células, Titerkek (Skatron, U.S.A.).
- 10) Contador de radioactividad β , Betamatic (Kontron).
- 11) Sonicador, 30 micrones (Ataio, España).

- 12) PHmetro, 601 A/digital (Orion Research, U.S.A.).
- 13) Espectrofotómetro, Spectronic 740 (Bausch and Lomb, U.S.A.).
- 14) Balanza de precisión, H16 (Mettler, Suiza).
- 15) Placas de microcultivo de fondo plano (Sterilin, Inglaterra).
- 16) Pipetas automáticas, Hamilton (Hamilton Bonaduz AG, Suiza).
- 17) Papel de filtro, GF/A (Whatman, Inglaterra).
- 18) Filtros estériles, 0'22 μ de diámetro de poro (Millipore, U.S.A.).
- 19) Tripa de diálisis, 12.000 Daltons de \emptyset de poro, Visking (Serva, R.F. Alemania).
- 20) Frascos de cultivo celular, 25 cm² de superficie, Falcon (Flow, Inglaterra).
- 21) Tubos de ensayo universales (Labclinics, España).
- 22) Placas de Petri (Sterilin, Inglaterra).
- 23) Placas cromatográficas: cromatoplacas de silicagel 60, 20 x 20 cm y 0'25 mm de espesor (Merck, R.F. Alemania).
- 24) Cubeta cromatográfica (Shandon).

METODOS

- El material de vidrio se esteriliza con calor seco, obtenido mediante estufa Pasteur a una temperatura de 160 °C, durante 1 h.

- El material líquido termoestable se esteriliza con calor húmedo, obtenido por autoclave a una presión de 1'5 atmósferas, durante 30 minutos. Los líquidos termolábiles se harán pasar por filtros estériles Millipore (ϕ , 0'22 μ).

A) OBTENCION DE CELULAS NORMALES

1) RATONES

Ratones normales de la cepa BALB/C (H-2^d) son sacrificados, por dislocación cervical, para obtener las siguientes células:

a) Células de médula ósea (C.M.O.)

Se obtienen a partir del fémur y tibia de ratones jóvenes.

Mediante jeringa de insulina se perfunde, con solución de PBS, el canal medular del hueso recogiendo, en tubo de ensayo, la suspensión celular. Tras dejarla en reposo unos minutos con objeto de que se depositen restos tisulares de

gran tamaño extraemos, con pipeta Pasteur, la suspensión de células que se lleva a un tubo de ensayo de fondo en V. Se centrifuga a 500 g durante 10 minutos y se decanta el sobrenadante. Se vuelve a lavar en PBS y se repite la centrifugación. Desechado de nuevo el sobrenadante, el sedimento celular está listo para las operaciones subsiguientes de viabilidad, contaje y ajuste.

b) Células peritoneales (C.E.P.: células de exudado peritoneal, que en su mayoría son macrófagos).

Una vez sacrificado el ratón se inyectan 3 ml de PBS en la cavidad peritoneal manteniendo la aguja dentro de la cavidad y con ayuda de unas pinzas, se golpea ligeramente el peritoneo con el fin de facilitar la suspensión de las células en PBS. Transcurridos 5 minutos se aspira, con la misma jeringa, el PBS rico en macrófagos, siguiéndose después el mismo protocolo que para las células de médula ósea.

c) Células de bazo (C.B.)

La obtención de estas células se realiza a partir del bazo de ratón.

Se extrae el bazo que se coloca en una placa de Petri con PBS, donde se homogeniza con pinzas y tijeras. Las células liberadas en PBS se lavan y resuspenden en este buffer. Para separar las células nucleadas de los eritrocitos, según el

método usado por BØYUM (1.968), 4 ml de la suspensión se hacen resbalar lentamente sobre la pared de un tubo de ensayo, conteniendo 6 ml de medio de separación de linfocitos. Después de centrifugar a 1.000 g durante 20 minutos, aparece una corona blanca entre el PBS y el medio de separación, formada principalmente por linfocitos. Los hematies, al ser más densos, se depositan en el fondo del tubo.

Se extraen dichas coronas con pipeta Pasteur y se lavan dos veces en PBS a 500 g durante 10 minutos, para eliminar los restos de medio de separación. Finalmente obtenemos el sedimento celular que, a partir de ahora, sigue los mismos procesos que las demás células.

2) HUMANOS

Aislamiento de linfocitos

Se extraen 20-30 ml de sangre de las venas periféricas de individuos adultos normales. Depositada en matraz Erlemmeyer que contiene bolas de vidrio, se agita suavemente hasta que dejan de sonar, para conseguir la defibrinización.

A estos ml de sangre venosa defibrinizada, se añade el mismo volumen de PBS. A continuación se procede a separar los linfocitos del resto celular, según el método utilizado en el apartado anterior.

B) OBTENCION DE LAS CELULAS TUMORALES

1) RATONES

Las células tumorales (C.T.) se encuentran congeladas y clasificadas en un contenedor de nitrógeno líquido. Tras extraer de este la línea celular a estudiar, se procede a su descongelación y lavado.

Con pipeta Pasteur se va añadiendo, suavemente, solución tamponada de PBS a la línea celular congelada. Una vez descongelada, se recoge el contenido que se suspende en exceso de PBS en un tubo de ensayo universal. Se agita y se centrifuga a 500 g durante 10 minutos. Esta operación se repite por segunda vez. De esta forma las células tumorales son lavadas de los restos de medio de congelación.

El sedimento celular obtenido, se procesa por dos vías distintas, en función de que las células se expandan directamente en medio de cultivo R.P.M.I. (cultivadas) o en el ratón (frescas).

a) Células tumorales cultivadas

El sedimento de células tumorales se resuspende en medio de cultivo y observada su viabilidad, se llevan a una concentración de 2 a $3 \cdot 10^5$ células/ml. Depositadas en frascos Falcon, se cultivan en incubador de CO_2 (5%) a 37°C en atmósfera humidificada. Una vez que se han adaptado al medio de cultivo y alcanzado una intensa capacidad proli-

ferativa, las células se separan del medio tras centrifugación a 500 g durante 10 minutos. Están ya preparadas para contaje, ajuste y posterior utilización.

b) Células tumorales frescas

Se añade PBS al sedimento celular y previo estudio de su viabilidad, se ajustan a una concentración de $4 \cdot 10^6$ células/ml. 0'5 ml de la suspensión de células tumorales ($2 \cdot 10^6$ células) se inoculan, intraperitonealmente, al correspondiente ratón, donde se desarrollan en forma ascítica.

Cuando el abdomen del animal alcanza un tamaño considerable (8-10 días), se sacrifica y a través de una pequeña incisión en la cavidad peritoneal, se extrae el tumor con pipeta Pasteur.

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

2) HUMANOS

Las células tumorales RAJI, almacenadas en contenedor de nitrógeno líquido, se usan siguiendo la misma metódica que las células tumorales cultivadas de ratón.

Todas las células descritas en los apartados anteriores, fueron aisladas en condiciones estériles usando para ello una cámara de flujo laminar y material estéril.

C) VIABILIDAD, CONTAJE y AJUSTE DE LAS CELULAS OBTENIDAS

El sedimento de las diferentes células obtenidas se suspende en 2 ml de medio de cultivo RPMI. La viabilidad y recuento celular se efectúa en una cámara Neubauer, mediante microscopio de contraste de fase. Finalmente las distintas suspensiones celulares se ajustan a las respectivas concentraciones en que se utilizan para el radioensayo:

- Células tumorales y células de bazo (ratón) - 1.10^6 cél/ml
- Células de médula ósea y peritoneales (") - 8.10^6 "
- Linfocitos humanos - 1.10^6 "

D) PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO DE CELULAS TUMORALES

Descrita la forma general de obtener las células tumorales frescas (apartado B.1.a., de métodos), procedemos a preparar el extracto tumoral.

La mayor parte de este trabajo se ha realizado con el extracto de la línea celular MCG3, no obstante,

se han utilizado también extractos de otros tumores (A1 y P815Y); en cualquier caso, los procesos preparativos son idénticos.

Células tumorales MCG3 se inocularon, intraperitonealmente, en ratones de su cepa de origen. Una vez que los ratones desarrollaron la ascítis tumoral, las células tumorales son extraídas, suspendidas y lavadas, por dos veces, en PBS. Ajustadas en esta solución tampon, a una concentración de $125 \cdot 10^6$ células/ml, se guardan a -20°C durante 24 h. Pasado este tiempo, se llevan a un baño María a 37°C hasta descongelación, para recogerlas después en un recipiente enfriado en baño de hielo. La lisis celular se completa mediante sonicación (30 micrones) alterna de 30 segundos durante tres veces. A continuación se sometió a centrifugación a 25.000 g, durante 30 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C . Desechado el precipitado, el sobrenadante se ultracentrifuga a 100.000 g durante 60 minutos. Finalmente el sobrenadante decantado y filtrado en Millipore (0.22μ de ϕ), fué usado como extracto crudo de MCG3 (E), en las operaciones subsiguientes.

Los extractos crudos de otros tumores, obtenidos de igual forma, se les designa anteponiendo la letra E al nombre del tumor, (Ej.: E P815Y).

E) TRATAMIENTO POSTERIOR DEL EXTRACTO CRUDO:
CARACTERIZACION

El extracto crudo de MCG3 (E), fué sometido a diferentes tratamientos para caracterizar fisicoquímicamente el factor/es activo.

1) PRECIPITACION TERMICA

Extracto crudo de MCG3 (E) es llevado a un tubo de ensayo, sometiéndolo a una precipitación térmica a 70°C durante 30 minutos en baño Maria. Pasado este tiempo, el tubo se introdujo en un baño de hielo. Cuando la temperatura del extracto bajó a 4°C se procedió a centrifugar a 8.000 g durante 10 minutos.

Con este tratamiento floclula abundante material protéico. Desechado éste, el sobrenadante se hace pasar, en condiciones estériles, por filtro Millipore (0'22 μ , \emptyset de poro). Esta fracción de extracto de MCG3 termoestable a 70°C la llamaremos abreviadamente E70.

Cuando son extractos de otros tumores los que se someten a este tratamiento térmico, se nombran anteponiendo E70 al nombre del tumor (Ej.: E70P815Y).

2) DIALISIS

a) Una alícuota (1 ml) de E70 se dializó frente a 1.000 ml de buffer PBS, PH=7'2, durante

48 h a 4°C, en tripa de diálisis (\emptyset de poro, 12.000 Daltons). Una vez dializada, la fracción interna es recogida y congelada hasta el momento de su uso. El extracto así obtenido, recibe la nomenclatura de E70D (extracto de MCG3 calentado a 70°C y dializado).

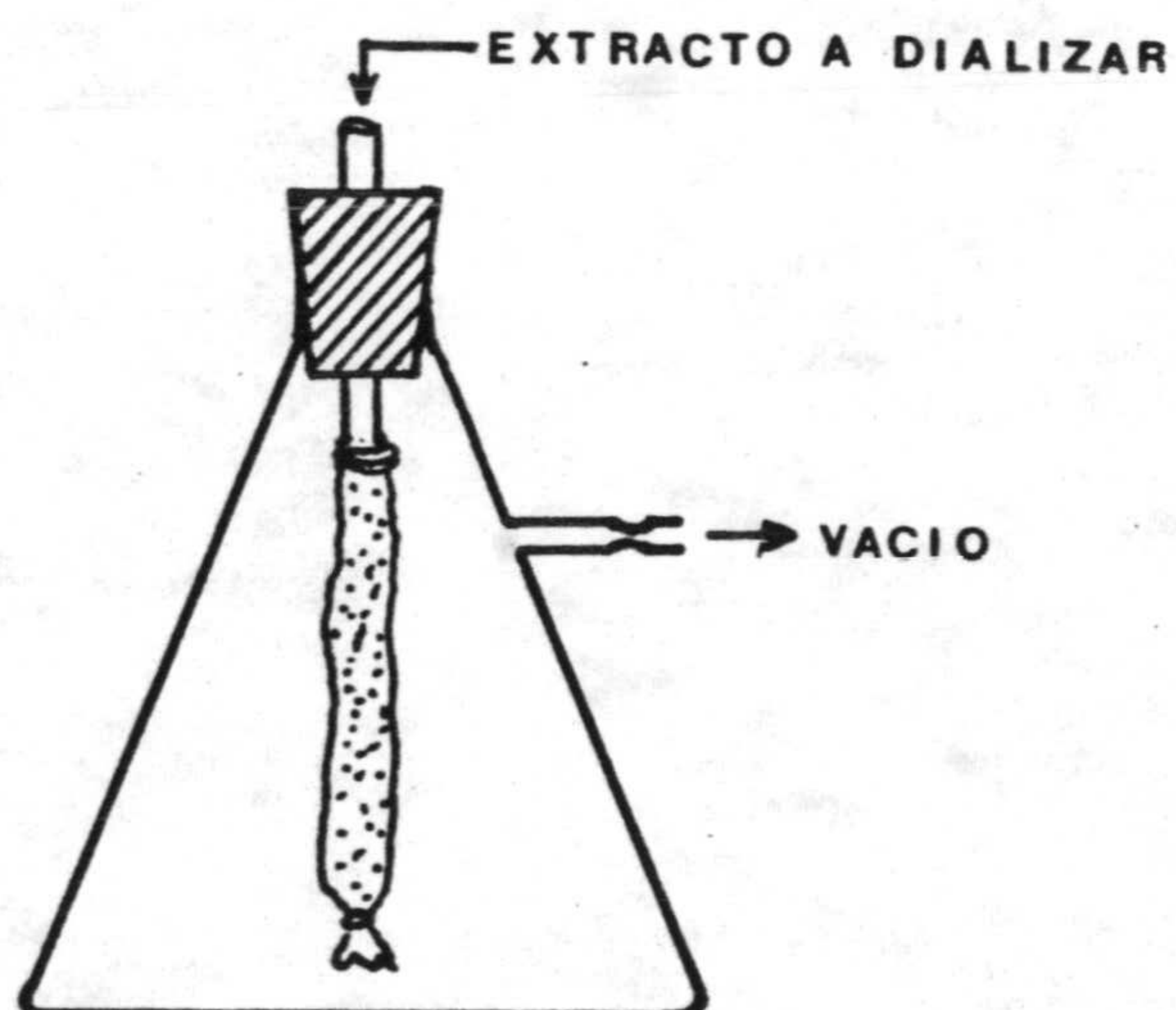
b) En otros casos, la diálisis se realizó a vacío. Para ello se dispuso un kitasato herméticamente cerrado con un tapón de goma que es atravesado verticalmente por un tubo hueco de plástico. Previamente se conectó, bien atada, la tripa de diálisis en el extremo del tubo que va a quedar en el interior del matraz, (Figura 2).

Se adiciona por el extremo superior del tubo, hasta llenado de la tripa, la solución de extracto a dializar. Al conectar el kitasato a una bomba de vacío, comienza a salir solución a través de la membrana dialítica. Finalmente, cuando la diálisis ha terminado (se observa porque el volumen del extracto en el interior de la tripa permanece constante), se desconecta la bomba.

De esta forma se separan dos fracciones de E70, una que queda retenida en la membrana dialítica y la otra que atraviesa sus poros. Esta última que contendrá en solución moléculas de $P_m < 12.000$ se llamó E70DV (extracto de MCG3 tratado a 70°C y dializable a vacío) mientras que la fracción interna, integrada por sustancias de $P_m > 12.000$, se nombró como E70NDV (extracto

de MCG3 tratado a 70°C y no dializable a vacío). Ambas fracciones se congelaron hasta posterior utilización.

FIGURA 2



3) DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO: METODO BRADFORD

A lo largo de todo el proceso de caracterización se ha determinado el contenido protéico de los distintos extractos obtenidos empleando el método BRADFORD (1.976).

Este método se basa en el diferente cambio de color experimentado por un reactivo, como respuesta a varias concentraciones de proteínas. El máximo de absorbancia de una solución ácida de azul brillante

Coomassie G-250, varia de 465 a 595 nm, cuando se une a la proteína. La utilidad de este principio ha sido puesta de manifiesto por diversos autores, siendo Bradford el primero en demostrarla.

- Metódica

Se prepara, primeramente, una disolución patrón de proteína. Para ello, se disuelven 300 mg de albúmina bovina en PBS hasta obtener 100 ml de solución ($3\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

En tubos de ensayo añadimos respectivamente, por duplicado, las siguientes dosis de solución standar: 5, 10, 15, 20, y 30 μl . Por lo que el rango, en μg , de albúmina será de 15 a 90 μg . Como blanco se utilizan dos tubos a los que se dispensan 30 μl de PBS.

Por otro lado, tenemos preparados los diferentes extractos a titular. Siguiendo el mismo protocolo que para los standars, se colocan las distintas dosis (μl) de la solución problema. Esta operación se repite para cada uno de los extractos a medir.

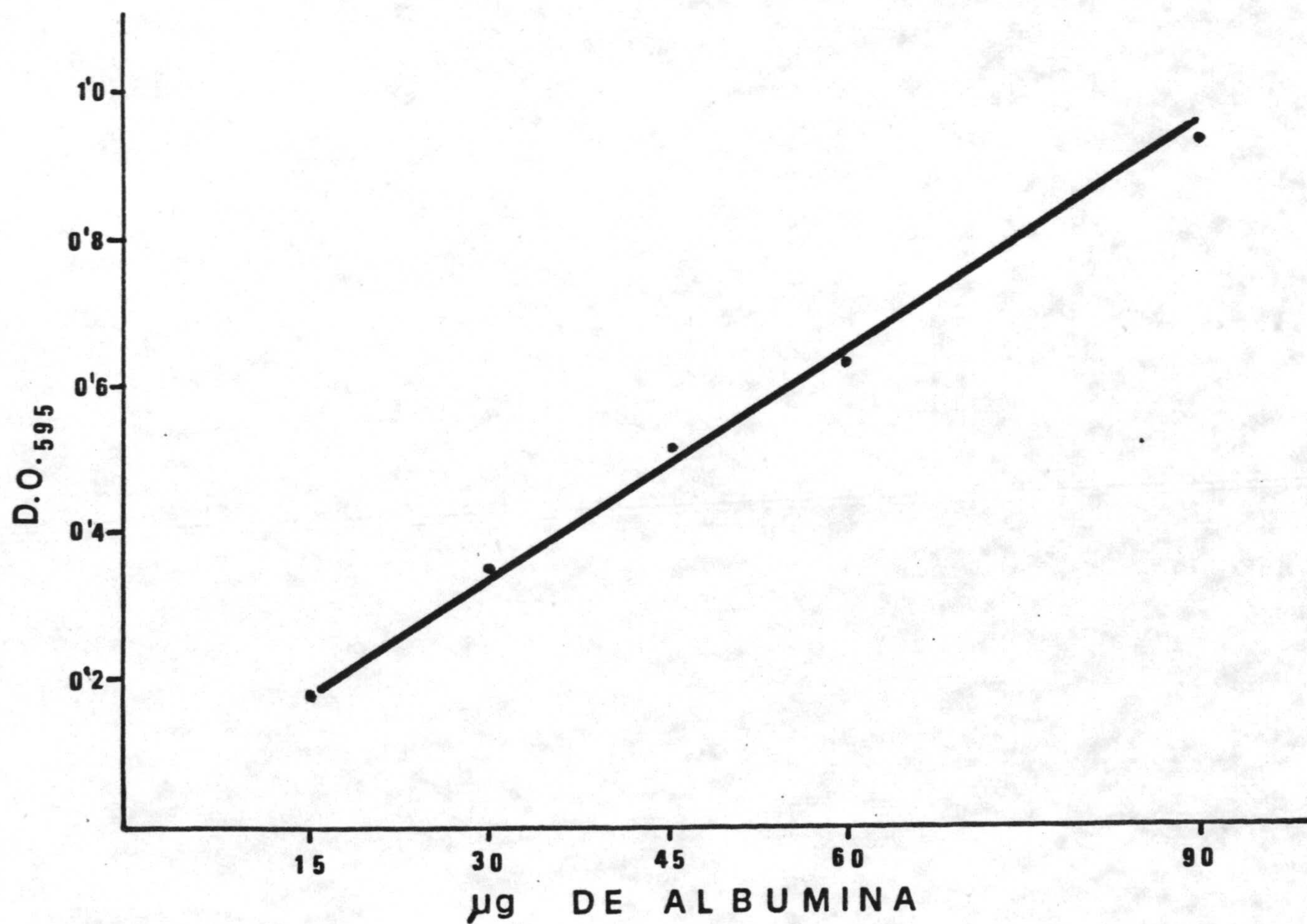
Finalmente, se dispensan a todos los tubos 5 ml de reactivo Bradford diluido (1 volumen de reactivo concentrado disuelto en 4 volúmenes de agua bidestilada y desionizada) y se hace la lectura en espectrofotómetro a 595 nm.

- Cálculos

Con los resultados suministrados por las distintas dosis de la solución standar, se construye una curva patrón de albúmina, representando en ordenadas

las densidades ópticas y en abcisas los μg de proteína correspondientes. Sobre ella, se llevan los valores de D.O. de los problemas, deduciéndose por interpolación y una vez tenida en cuenta la dosis (μl), la concentración protéica final, (Figura 3).

FIGURA 3



4) HIDROLISIS ENZIMATICA

Para determinar si el factor/es... activo del extracto es o no sensible a la hidrólisis enzimática, se sometió el E70 a la acción independiente de tripsina y proteasa. Como control se empleó una solución en PBS de albúmina bovina ($3\mu\text{g}/\mu\text{l}$) digerida con los mismos enzimas.

El enzima a utilizar (que se sirve en forma insoluble unido a un polímero y cuya actividad específica quedó indicada en el apartado correspondiente), se lavó tres veces en PBS seguido de respectivas centrifugaciones a 500 g durante 10 minutos. Una vez lavado, se suspende el enzima en este buffer, añadiendo después una alícuota de esta solución a la suspensión protéica, hasta conseguir una concentración de 10 mg de enzima por ml de suspensión. La incubación se llevó a cabo durante 60 minutos, con agitación continua, en un aparato rotatorio a 37°C . Terminado ésto, se vuelve a centrifugar, recogiendo el sobrenadante.

Una alícuota de este sobrenadante junto con otra de albúmina control, hidrolizada de igual manera son usadas para determinar las concentraciones protéicas por el método Bradford, descrito en el apartado anterior.

El resto de los sobrenadantes, se emplearon para estudiar su correspondiente actividad inhibidora mediante radioensayo.

5) EXTRACCION LIPIDICAa) Tratamiento con etanol

Tanto E70 como albúmina, utilizada como control, se trataron en frío con etanol. Para ello añadimos 9 volúmenes de etanol al 80% a 1 volumen de E70. Esta mezcla, agitada ocasionalmente durante 10 minutos en un recipiente enfriado en baño de hielo, se sometió a centrifugación a 800 g durante 15 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C. Recogido el precipitado, el sobrenadante es evaporado totalmente en baño María (45°C) mediante chorro de nitrógeno gaseoso. Una vez secado se disuelve, igual que la fase precipitada, en medio de cultivo para el estudio de su actividad.

El control de albúmina ha seguido las mismas operaciones.

b) Tratamiento con cloroformo

El E70 se trató con etanol de acuerdo con la metódica ya indicada. Obtenido el sobrenadante (fase soluble en etanol), se mide su volumen para, a temperatura ambiente, adicionarle la misma cantidad de cloroformo. Durante 15 minutos la mezcla es agitada periódicamente, centrifugándola después a 800 g durante 15 minutos. Concluida la centrifugación, aparece una fase acuosa (superior) y otra orgánica (inferior) que denominamos respectivamente como fase I y II de E70. Ambas fracciones son secadas totalmente a 45°C con chorro de nitrógeno gaseoso. Posteriormente se suspenden



en medio de cultivo para comprobar su actividad.

Como control continuamos usando albúmina bovina que, en todo momento, sigue idénticas pautas que el extracto.

6) DETERMINACION DEL CONTENIDO LIPIDICO

La fase II (orgánica) de E70, nombrada abreviadamente como extracto lipídico, fué utilizada para cuantificar los lípidos mediante una técnica gravimétrica.

Antes de proceder a su secado, la fase orgánica fué recogida y llevada a un pequeño tubo de cristal previamente pesado en una balanza de precisión. Terminado esto, secamos totalmente la muestra y volvemos a pesar el tubo. La diferencia de pesada corresponderá a la cantidad de extracto lipídico.

7) DETECCION DE POLIAMINAS

Para detectar la presencia de poliaminas en el extracto lipídico (aunque esto es poco probable ya que son sustancias polares), probamos dicho extracto con el tumor A1 mediante radioensayo (apartado G de métodos). Para ello cultivamos, independientemente, el tumor con RPMI más suero humano AB al 10% (que carece de poliaminaoxidasas, necesaria para la activación funcional de las poliaminas), con RPMI más suero de caballo al 10% (que tampoco contiene poliaminaoxidasas) y con RPMI más suero fetal de ternera

al 10%, que si contiene este enzima.

8) CROMATOGRAFIA

Con objeto de separar los distintos componentes del extracto lipídico, se empleó la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice. Se utilizó el siguiente sistema de disolventes:

Cloroformo: Metanol: Agua (60:38:8)

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

Paralelamente y a 1'5 cm del borde, por el que va a comenzar la cromatografía, se aplican las diversas muestras con pipeta Hamilton que expende 1 μ l por pulsación. Como patrones se utilizan soluciones en

etanol de: prostaglandinas (PGE_1 , PGE_2 , PGA_1 , $PGF_{2\alpha}$), colesterol, cortisona y aldosterona.

Una vez aplicadas las muestras y que éstas se han secado, se introduce de nuevo la placa en la cubeta, preparada según acabamos de indicar. Se tapa y se espera a que la placa se desarrolle. Finalmente, se seca en estufa a $37^\circ C$ y se revela con vapores de yodo.

Paralelamente a esta cromatografía analítica, se hizo otra preparativa para analizar el extracto lipídico. En ésta se procedió, una vez desarrollada y secada la placa, a barrer el área de separación del extracto previamente dividida en zonas paralelas de 1 cm de altura. Las distintas fracciones de extracto lipídico, separadas de esta forma, se extraen con etanol puro y cloroformo mediante una técnica equivalente a la extracción lipídica. Por último, se secan con chorro de nitrógeno gaseoso en baño María ($45^\circ C$) y disueltas en medio de cultivo se probaron con células para determinar su actividad.

F) PREPARACION DE EXTRACTO LIPIDICO DE BAZO DE RATON

Diez ratones normales de la cepa B10 (H-2^b), fueron sacrificados para obtener el extracto lipídico de las células de bazo.

Depositados los bazos en placas de Petri, conteniendo PBS, se homogenizan con pinzas y tijeras. Las células liberadas, se lavan y suspenden en 10 ml de PBS. Hecho esto, procedemos a preparar el extracto de estas células, siguiendo la misma técnica que para el extracto de MCG3 (apartado D de métodos). La extracción lipídica, se realiza también de igual forma (apartado E.5.). Finalmente obtenemos, tras secar y cuantificar la fase orgánica (II), el extracto lipídico de bazo, que disuelto en RPMI será usado para probar su actividad.

G) RADIOENSAYO

Las distintas suspensiones celulares utilizadas para el radioensayo, fueron ajustadas a la concentración correspondiente (apartado C de métodos), en medio RPMI al 10 % en suero fetal de ternera. Los extractos se habrán preparado también, a las respectivas concentraciones en que van a ser estudiados.

Con una pipeta Hamilton se dispensan 10 μ l de extracto, en cada pocillo de la placa de microcultivo, haciendo triplicados para cada concentración (6 de estos pocillos tendrán PBS en lugar de extracto y serán usados como controles). Tras adicionar 50 μ l de suspensión celular ($5 \cdot 10^4$ ó $4 \cdot 10^5$ células/pocillo, dependiendo del tipo de célula), se añade 150 μ l de medio de cultivo. A continuación se expende, a cada pocillo, 1 μ l (1 μ Ci) del isótopo correspondiente (timidina tritiada o uridina tritiada) y se procede a la incubación.

Los linfocitos humanos y células de bazo de ratón siguen el mismo protocolo, con la diferencia de que el isótopo se añade 48 h. después de haberlos estimulado e incubado con 1 μ l de PHA (2'5 μ g/ml).

Los cultivos se llevaron a un incubador de CO₂ (5%) a 37°C con atmósfera humidificada durante 24 h. Transcurrido este tiempo, son recogidos, en papel Whatman, mediante un recolector semiautomático

de células. Tras secado de este filtro, los círculos que quedan marcados en él, se extraen para disponerlos en unos pequeños tubos de plástico especiales para contaje. Finalmente, añadimos 5 ml de líquido de centelleo y su radioactividad es medida en un contador de radiaciones β .

Las células de exudado peritoneal están formadas, principalmente, por macrófagos. Al ser éstas unas células que no se dividen, sólo se estudia la síntesis de RNA, mediante la incorporación de Uridina- ^3H .

B) EXPRESION DE LA ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS

La actividad de los extractos se ha expresado, indistintamente, de dos formas:

1) % de inhibición (I) producida por el extracto sobre la captación de isótopo en las células estudiadas,

$$I = \frac{\bar{X}_0 - \bar{X}_i}{\bar{X}_0} \cdot 100$$

\bar{X}_0 : media de d.p.m. de los pocillos usados como control.

\bar{X}_i : media de d.p.m. de los pocillos que contienen extracto.

2) a) Actividad absoluta de extracto (A), definida según la siguiente ecuación:

$$A = \frac{N}{n}$$

N : Concentración total de proteínas o lípidos en el extracto. Viene dada en mg/ml.

n : Cantidad de extracto, en el cultivo celular, que produce un 50% de inhibición. Este valor se ha definido en mg/U₅₀, siendo U₅₀ unidades de inhibición al 50%.

A: Actividad absoluta de extracto. Vendrá dada en unidades de inhibición al 50% por ml de extracto, U50/ml.

b) Actividad específica de extracto (A.E.), es el resultado de dividir A por N;

$$A.E. = \frac{1}{n}$$

Sus unidades serán por consiguiente: $\frac{U50}{mg}$

c) Incremento relativo de actividad, es el cociente entre actividades específicas; Ej.:

$$I.R. = \frac{A.E.E70}{A.E.E} = \frac{n_E}{n_{E70}}$$

Todos estos parámetros, dependen del tipo de células utilizado por lo que se indicará entre paréntesis la célula a las que vienen referidas.

I) METODO ESTADISTICO

1) Los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico consistente en un análisis de la varianza:

a) Análisis de la varianza de dos vias con igual número de elementos por casilla.

b) Para la comparación simultánea de todas las medias de filas en cada columna, se utilizará el método de secuencia de NEWMANS y KEULS, para un error global del 5%.

2) En algún caso se aplicó un test de Student de comparación de dos medias de muestras independientes.

RESULTADOS

A) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO CRUDO DE MCG3 (E) SOBRE LA CAPTACION DE TIMIDINA-³H (T-³H) Y URIDINA-³H (U-³H) EN CELULAS TUMORALES Y NORMALES DE RATON Y HUMANAS.

En la Tabla 1 observamos que E inhibe la incorporación de T-³H y U-³H en todas las células experimentadas. La inhibición media, con dosis de 20 y 25 µg/ml, fué de 65'3 ± 10'4 para la captación de T-³H y de 60'0 ± 7'2 para la captación de U-³H (Tabla 5, Gráfica 2).

Tanto en esta serie de experimentos como en todos los siguientes, las células fueron observadas microscópicamente, encontrando que los efectos del extracto son citostáticos y no citotóxicos.

TABLA 1. - Efecto del extracto crudo de MCG3 (E) sobre la incorporación de T-³H y U-³H en células tumorales y normales de ratón y humanas.

- Los resultados de esta tabla, así como de las siguientes (salvo que se indique otra cosa), se expresan como media de d.p.m. \pm S.D. y % de inhibición.

- En todos los experimentos en que se utilizan células de exudado peritoneal (C.E.P.), sólo se estudia la captación de Uridina - ³H (material y métodos, pg. 140).

- N.E. : No experimentado.

TABLA 1

CELULAS	E	CAPTACION DE T- ³ H		CAPTACION DE U- ³ H	
		D.P.M. ± S.D. (%INH)		D.P.M. ± S.D. (%INH)	
MCG3	CONTROL	40.569±3.528		22.866± 333	
	20 µg/ml	19.668±1.422	<u>52</u>	8.281± 421	<u>64</u>
EHRlich	CONTROL	30.604±2.714		30.917±3.393	
	20 µg/ml	12.354± 798	<u>60</u>	14.490± 824	<u>53</u>
TLX9	CONTROL	215.653±7.232		29.015±3.359	
	20 µg/ml	89.192±2.219	<u>59</u>	11.372± 258	<u>61</u>
MCG4	CONTROL	28.320±2.970		27.200±2.380	
	20 µg/ml	9.460± 980	<u>67</u>	8.920± 840	<u>67</u>
SL2	CONTROL	299.256±10.568		81.053±4.122	
	25 µg/ml	103.962±3.630	<u>65</u>	23.153±1.308	<u>71</u>
NS1	CONTROL	167.141±8.830		62.742±4.834	
	25 µg/ml	53.507±3.004	<u>68</u>	31.245±2.218	<u>50</u>
P815X2	CONTROL	265.207±9.535			
	25 µg/ml	142.416±3.713	<u>46</u>	N.E.	
A1	CONTROL	209.689±7.594		90.990±1.100	
	25 µg/ml	61.051±3.362	<u>71</u>	43.675± 991	<u>52</u>

<u>CELULAS</u>	<u>E</u>	<u>CAPTACION DE T-³H</u>		<u>CAPTACION DE U-³H</u>	
		<u>D.P.M. ± S.D.</u>	<u>(%INH)</u>	<u>D.P.M. ± S.D.</u>	<u>(%INH)</u>
C.M.O.	CONTROL	81.079 ± 1.843		15.909 ± 1.402	
	25 μg/ml	20.540 ± 1.923	<u>75</u>	5.536 ± 1.41	<u>65</u>
C.E.P.	CONTROL			14.992 ± 651	
	25 μg/ml			6.958 ± 167	<u>54</u>
C.B.+PHA	CONTROL	82.921 ± 6.881		25.113 ± 1.111	
	25 μg/ml	27.789 ± 2.451	<u>66</u>	9.403 ± 1.024	<u>63</u>
RAJI	CONTROL	997.231 ± 56.511			
	25 μg/ml	138.302 ± 4.834	<u>86</u>	N.E.	
LINF.HUM. +PHA	CONTROL	289.935 ± 14.536			
	25 μg/ml	91.048 ± 3.983	<u>69</u>	N.E.	

B) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE MCG3 TRATADO A 70°C DURANTE 30' (E70), SOBRE LA LA CAPTACION DE T-³H Y U-³H EN CELULAS TUMORALES Y NORMALES DE RATON Y HUMANAS.

El E70 no sólo mantiene la capacidad de inhibir la incorporación de los isótopos de Timidina y Uridina, en las mismas células de experimentos anteriores, sino que la aumenta (Tabla 2). Con dosis de 20 y 25 µg/ml se obtienen inhibiciones medias de 95'2 ± 4'7 y 90'3 ± 8'6 respectivamente para la captación de T-³H y U-³H (Tabla 5, Gráfica 2).

De estos resultados se deduce que el factor/es activo del extracto de MCG3 es termoestable.

TABLA 2.- Efecto de E70 sobre la incorporación de Timidina - ^3H y Uridina - ^3H en células tumorales y normales de ratón y humanas.

TABLA 2

<u>CELULAS</u>	<u>E70</u>	<u>CAPTACION DE T-³H</u>			<u>CAPTACION DE U-³H</u>		
		<u>D.P.M. ± S.D. (%INH)</u>			<u>D.P.M. ± S.D. (%INH)</u>		
MCG3	CONTROL	40.569±3.528			22.866± 333		
	20µg/ml	362±	14	<u>99</u>	463±	32	<u>98</u>
EHRlich	CONTROL	30.604±2.714			30.917±3.393		
	20µg/ml	110±	12	<u>100</u>	321±	29	<u>99</u>
TLX9	CONTROL	215.653±7.232			29.015±3.359		
	20µg/ml	2.339±	143	<u>99</u>	344±	33	<u>99</u>
MCG4	CONTROL	28.320±2.970			27.200±2.380		
	20µg/ml	540±	56	<u>98</u>	1.440±	140	<u>95</u>
SL2	CONTROL	378.190±6.314			81.053±4.122		
	25µg/ml	34.369±	2.502	<u>91</u>	12.250±	811	<u>85</u>
NSI	CONTROL				53.758±3.102		
	20µg/ml	N.E.			14.332±	630	<u>73</u>
P815X2	CONTROL	283.445±16.145					
	25µg/ml	242±	54	<u>100</u>	N.E.		
A1	CONTROL	195.559± 6.575			92.800±1.953		
	25µg/ml	27.965±	2.519	<u>86</u>	3.300±	56	<u>96</u>

<u>CELULAS</u>	<u>E70</u>	<u>CAPTACION DE T-³H</u>			<u>CAPTACION DE U-³H</u>		
		<u>D.P.M. ± S.D. (%INH)</u>			<u>D.P.M. ± S.D. (%INH)</u>		
C.M.O.	CONTROL	78.256±	2.092		15.909±	1.402	
	25µg/ml	5.994±	589	<u>92</u>	1.963±	184	<u>88</u>
C.E.P.	CONTROL				18.219±	426	
	25µg/ml				2.127±	256	<u>88</u>
C.B.+PHA	CONTROL	91.732±	7.892		25.113±	1.111	
	25µg/ml	6.087±	787	<u>93</u>	4.512±	783	<u>82</u>
LINF.HUM.							
+PHA	CONTROL	289.935±	14.536				
	25µg/ml	16.385±	1.042	<u>94</u>			N.E.

C) COMPARACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE E Y E70 SOBRE LA CAPTACION DE TIMIDINA-³H POR CELULAS DE MEDULA OSEA (M.O.) DE RATON.

En la Tabla 3, Gráfica 1, se expresa una titulación de E y E70 sobre células de médula ósea. La inhibición producida por el extracto crudo sobre la captación de T-³H es menor, para cualquier concentración estudiada, que la ejercida por el extracto calentado a 70^oC.

Mientras que las actividades absolutas (material y métodos, pg. 141) de E y E70 sobre M.O. son prácticamente iguales, la actividad específica de E70 es 1'5 veces superior a la del extracto crudo (Gráfica 1).

TABLA 3.- Diferencia en la inhibición inducida por E y E70 sobre la incorporación de T-³H por células de M.O. de ratón.

- Los resultados se expresan como media del % de inhibición \pm S.D.

TABLA 3

<u>CONCENTRACION</u> <u>($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>X% DE INHIBICION DE CAPTACION DE T-³H + S.D.</u>	
	<u>E</u>	<u>E70</u>
30	83'5 <u>+</u> 0'7	92'8 <u>+</u> 1'4
12	50'4 <u>+</u> 0'9	67'1 <u>+</u> 1'0
6	30'0 <u>+</u> 1'5	42'0 <u>+</u> 2'3
3	22'8 <u>+</u> 1'8	32'7 <u>+</u> 2'1

El análisis de la varianza de la Tabla 3 se recoge en la siguiente Tabla estadística,

<u>Fuente</u>	<u>g.l</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>Fexp.</u>	<u>Significacion</u>
Entre dosis	3'0	13.169'0533	4.389'6844	1.814'8566	1%.
Entre E y E70	1'0	859'2066	859'2066	355'2275	1%.
Interacción	3'0	50'1533	16'7177	6'9117	1%.
Dentro	16'0	38'7000	2'4187		

De estos datos se deduce que:

- 1) Existe diferencia de inhibición entre las distintas concentraciones ($p < 0'001$).
- 2) La inhibición producida por E y E70 es distinta ($p < 0'001$).
- 3) La diferente inhibición entre E y E70 varía con la dosis ($p < 0'001$). Respecto a esto obtenemos que, para cualquier concentración, el efecto inhibitor de E es menor que E70 para un error global del 5%.

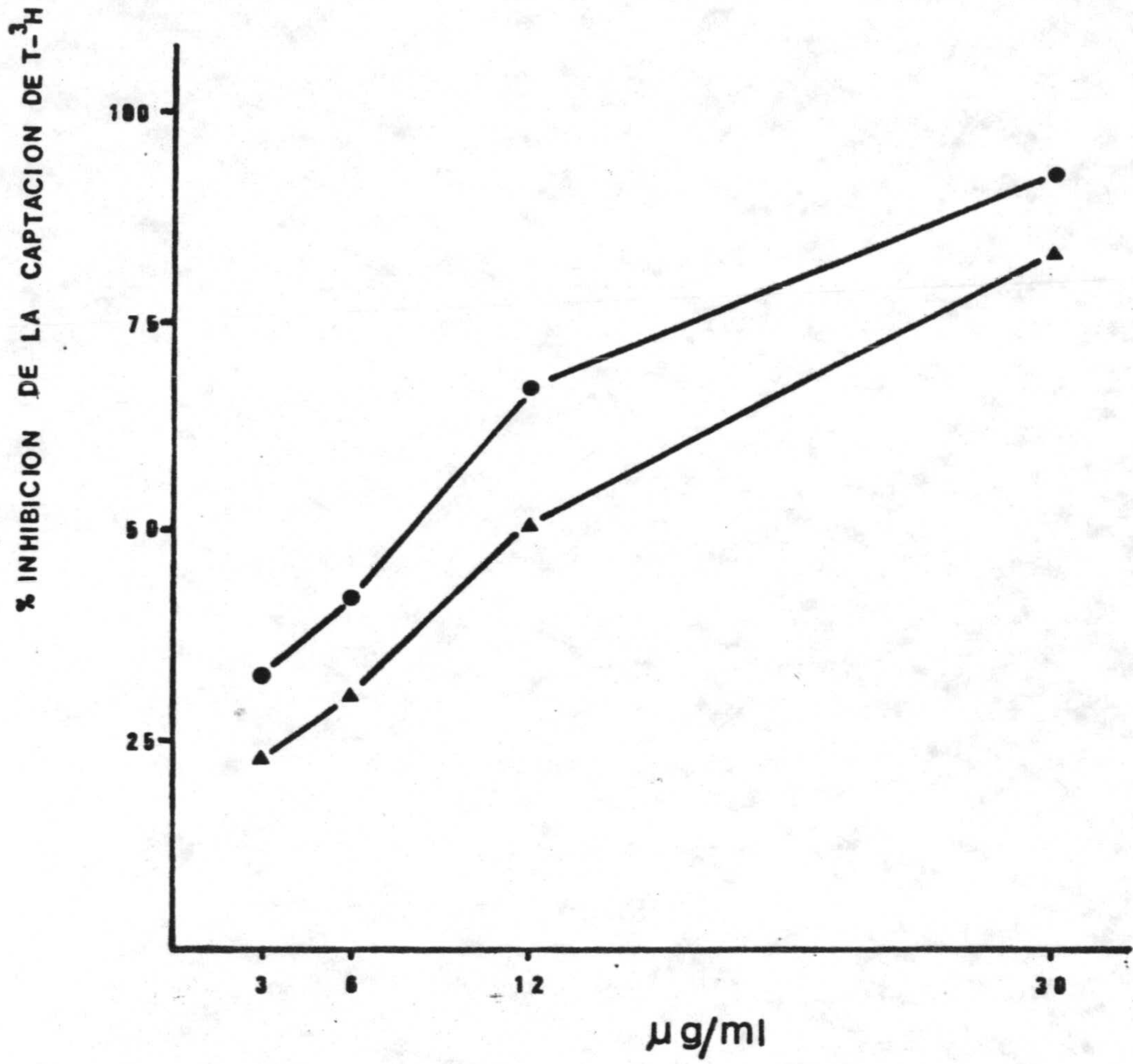
GRAFICA 1.- Efecto de E y E70 en la captación de T-³H por células de médula ósea de ratón.

- E (▲ —▲) ; E70 (● —●)

- En ordenadas se representa el % de inhibición de captación de T-³H y en abcisas la concentración en $\mu\text{g/ml}$.

Al pie de gráfica se expresan los valores de las actividades absolutas y específicas de E70 y E sobre M.O., así como el incremento relativo entre éstas.

GRAFICA 1



$$A_{E70} \text{ (M.O.)} = 1438 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$A_E \text{ (M.O.)} = 1417 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$A_{E70} \text{ (M.O.)} = 625 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$A_E \text{ (M.O.)} = 417 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

I. R. = 1'5

D) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE MCG3
SOMETIDO A CALENTAMIENTO Y POSTERIOR DIALISIS
(E70D), SOBRE LA CAPTACION DE T-³H Y U-³H EN
CELULAS TUMORALES Y NORMALES DE RATON.

Tras dializar el E70 frente a PBS obtenemos el E70D. Concentraciones de 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de este extracto se pusieron en contacto con diversas células tumorales y normales de ratón. En todos los casos según se observa en la Tabla 4, se pierde la actividad inhibidora. La Tabla 5, Gráfica 2, nos muestran que las inhibiciones promedio de incorporación de T-³H y U-³H son $2'3 \pm 3'2$ y $4'6 \pm 8'2$ respectivamente para las células estudiadas.

Estos datos expresan que el factor/es activo del extracto es dializable y con un peso molecular inferior a 12.000 (material y métodos, pg. 128).

TABLA 4.- Efecto de E70D sobre la incorporación de $T-^3H$ y $U-^3H$ en células tumorales y normales de ratón.
- Las flechas entre paréntesis indican estimulación.

TABLA 4

<u>CELULAS</u>	<u>E7OD</u>	<u>CAPTACION DE T-³H</u>		<u>CAPTACION DE U-³H</u>	
		<u>D.P.M. + S.D.</u>	<u>(%INH)</u>	<u>D.P.M. + S.D.</u>	<u>(%INH)</u>
EHRlich	CONTROL	30.194+	938		
	25 µg/ml	28.937+	736	<u>4</u>	N.E.
SL2	CONTROL	292.468+	20.112		70.620+7.121
	25 µg/ml	269.976+	13.423	<u>8</u>	57.328+5.528 <u>19</u>
P815X2	CONTROL	249.303+	13.265		
	20 µg/ml	244.135+	14.772	<u>2</u>	N.E.
A1	CONTROL	288.732+	4.739		95.862+2.109
	20 µg/ml	287.449+	3.158	<u>0</u>	98.423+1.658 <u>0 (↑)</u>
C.M.O.	CONTROL	72.303+	2.550		12.510+1.169
	25 µg/ml	74.866+	1.978	<u>0 (↑)</u>	15.546+1.341 <u>0 (↑)</u>
C.E.P.	CONTROL				22.785+1.075
	25 µg/ml				21.818+ 748 <u>4</u>
CB+PHA	CONTROL	119.412+	10.483		25.113+1.111
	20 µg/ml	120.180+	8.673	<u>0 (↑)</u>	25.260+1.275 <u>0 (↑)</u>

TABLA 5, GRAFICA 2.- Inhibición media de la captación de T-³H y U-³H en células tumorales y normales de ratón y humanas, tratados con 20 y 25 μ g/ml de E, E70 y E70D.

- Los resultados se expresan como media del % de inhibiciones \pm S.D.

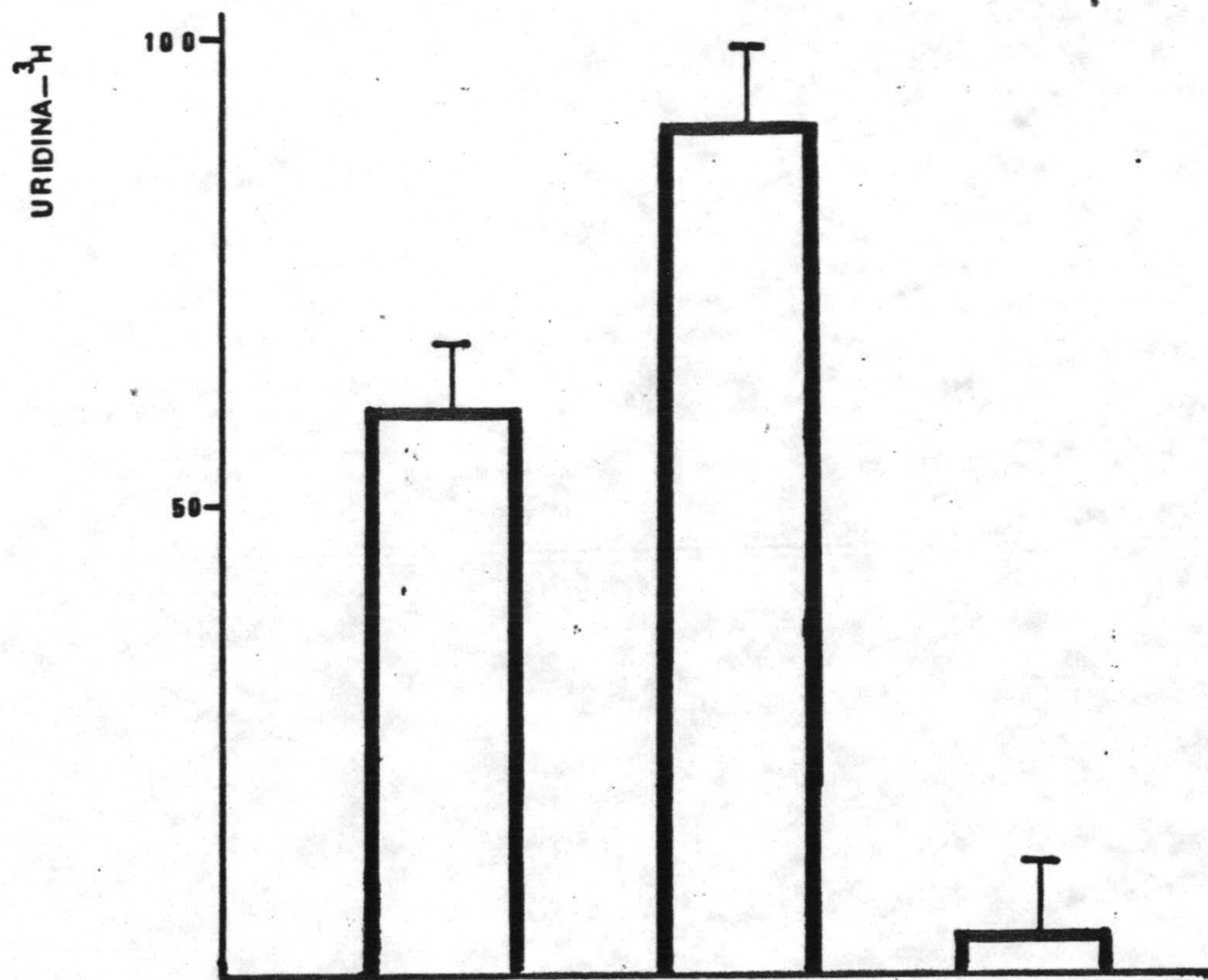
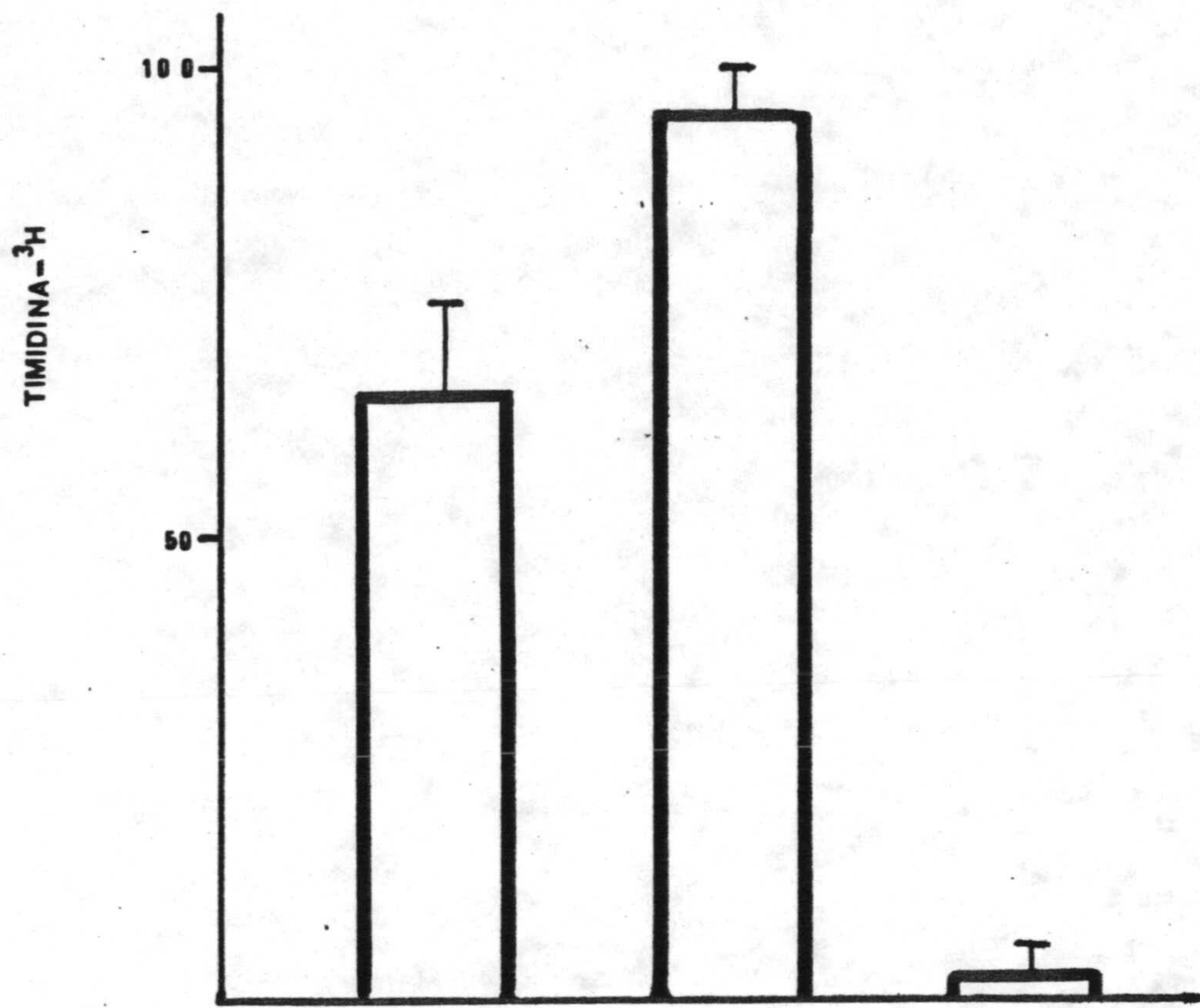
- N = número de células estudiadas

TABLA 5

<u>EXTRACTO</u> (20y25µg/ml)	<u>X % DE INHIBICION ± S.D. DE LA CAPTACION DE :</u>	
	<u>TIMIDINA-³H</u>	<u>URIDINA-³H</u>
<u>E</u>	65'3±10'4 (N=12)	60'0±7'2 (N=10)
<u>E70</u>	95'2±4'7 (N=10)	90'3±8'6 (N=10)
<u>E70D</u>	2'3±3'2 (N=6)	4'6±8'2 (N=5)

GRAFICA 2

% DE LA INHIBICION DE CAPTACION DE:



E) COMPARACION DE LA INHIBICION INDUCIDA EN LA INCORPORACION DE T-³H POR E70, E7ODV (DIALIZABLE A VACIO) Y E7ONDV (NO DIALIZABLE A VACIO), SOBRE DOS CELULAS TUMORALES DE RATON.

Tras someter el E70 a una diálisis a vacío, se separan dos fracciones de extracto. Una de ellas sale atravesando los poros de la membrana dialítica (E7ODV), la otra queda retenida en la tripa de diálisis (E7ONDV) (material y métodos, pg.129).

18 μ g/ml de E70, E7ODV y E7ONDV se incubaron con células tumorales SL2 y A1. En la tabla 6, Gráfica 3, se expresa la inhibición que sobre la captación de T-³H produjeron estos extractos. Se observa que la mayor actividad inhibidora aparece en E7ODV, mientras que la fracción no dializable (E7ONDV) disminuye apreciablemente su capacidad para inhibir la síntesis de ADN.

Estos resultados señalan, de nuevo, que el factor/es activo del extracto es dializable y de bajo peso molecular ($P_m < 12.000$).

TABLA 6, GRAFICA 3.- Efecto de E70, E70DV Y E70NDV sobre la captación de timidina -³H en células tumorales SL2 y A1 de ratón.

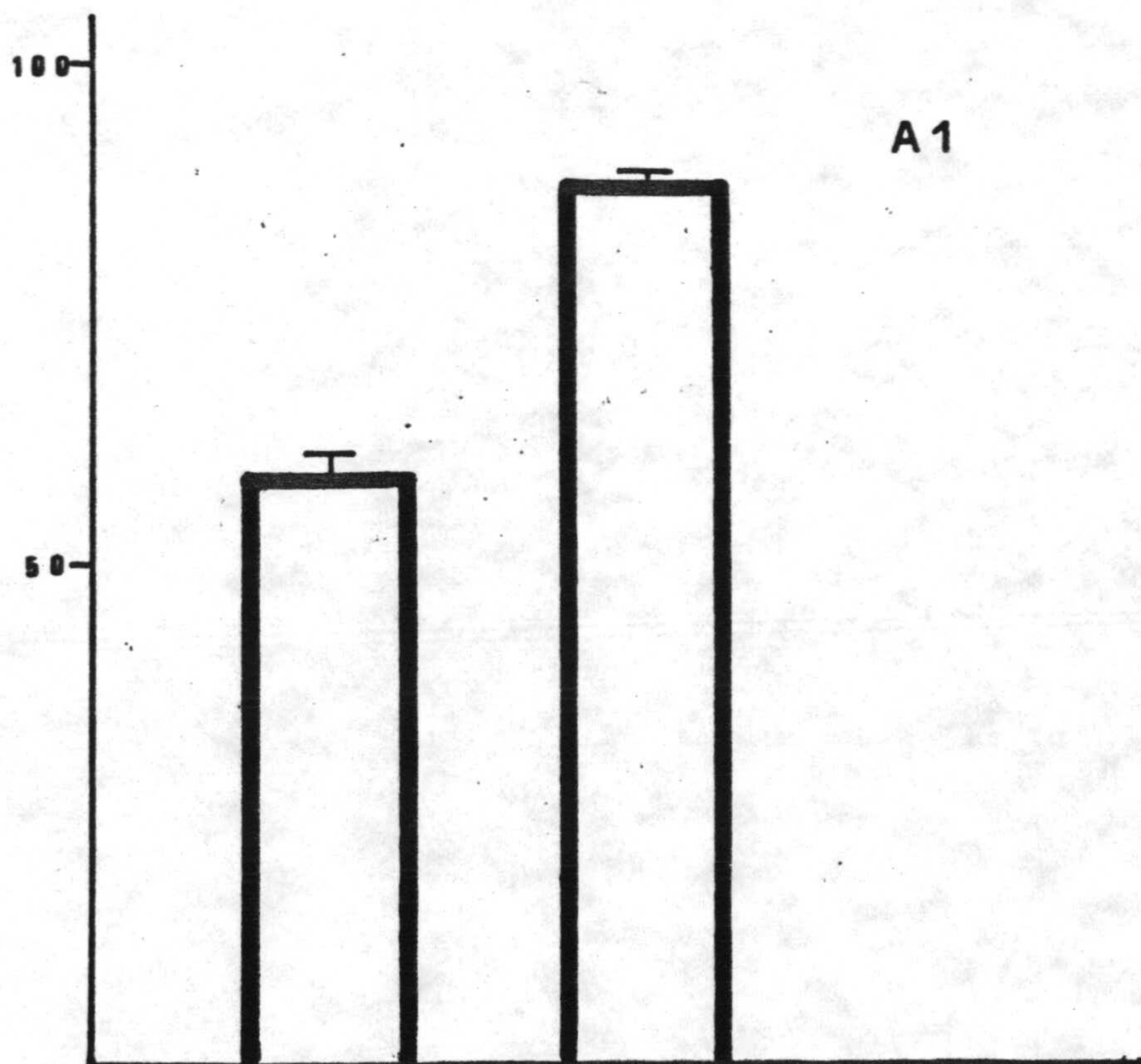
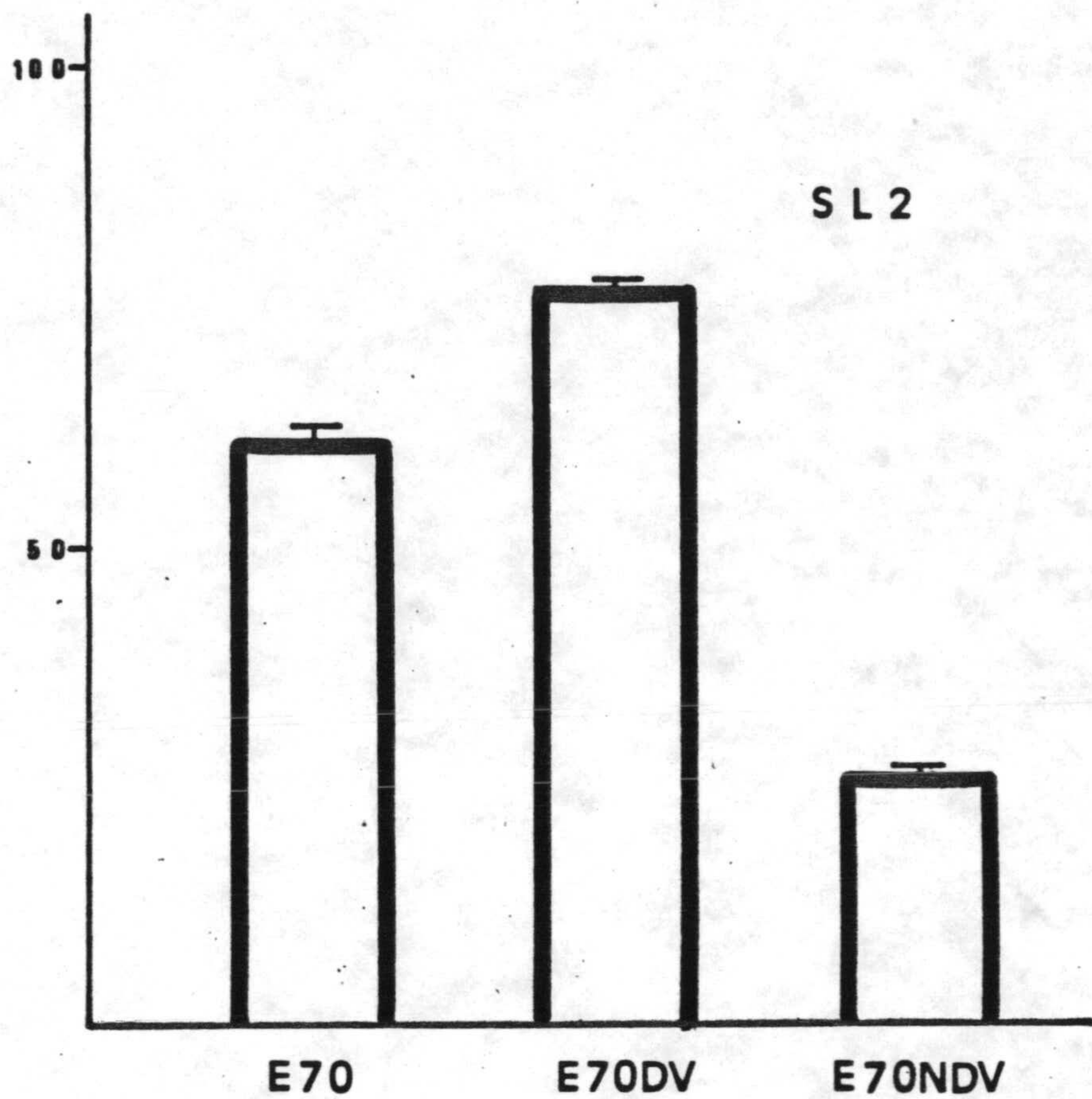
TABLA 6

CAPTACION DE TIMIDINA-³H ± S.D.

EXTRACTO (18µg/ml)	SL2		A1	
	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INH)</u>	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INH)</u>
CONTROL	307.554±10.016		195.559±6.575	
<u>E70</u>	119.487± 5.625	<u>61'1±1'7</u>	81.557±5.037	<u>58'3±2'6</u>
<u>E70 DV</u>	71.940± 1.545	<u>76'6±0'5</u>	24.478±2.511	<u>87'5±1'3</u>
<u>E70 NDV</u>	226.050± 3.171	<u>26'5±1'0</u>	N.E.	

GRAFICA 3

% DE INHIBICION DE LA CAPTACION DE T-³H



F) DIFERENCIA EN LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE E
SOBRE LA CAPTACION DE TIMIDINA-³H POR CELU-
LAS DE M.O. Y CELULAS TUMORALES DE RATON

La Tabla 7, Gráfica 4, muestran que para concen-
traciones de extracto superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ no se apre-
cia una diferencia claramente significativa entre la
inhibición de las células de médula ósea y las células
tumorales. Con dosis inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ aparecen ya
diferencias significativas entre el % de inhibición de
captación de timidina-³H en M.O. y las células tumo-
rales.

El extracto crudo presenta mayor actividad abso-
luta sobre la médula ósea que para las células tumorales
(Gráfica 4)

TABLA 7.- Diferencia en la inhibición inducida por E sobre la incorporación de Timidina — ³H en células de M.O. y diversas células tumorales de ratón.

- Los resultados se expresan como media del % de inhibición [±] S.D.

TABLA 7

<u>E</u> ($\mu\text{g/ml}$)	X % DE INHIBICION DE CAPTACION DE T- ³ H \pm S.D.				
	<u>M.O.</u>	<u>NS1</u>	<u>A1</u>	<u>MCG3</u>	<u>P815X2</u>
125'00	95'1 \pm 0'3	96'3 \pm 0'3	98'6 \pm 0'6	98'0 \pm 0'2	96'5 \pm 0'4
62'50	85'1 \pm 0'6	84'8 \pm 1'5	94'8 \pm 0'9	93'0 \pm 0'5	61'9 \pm 1'2
25'00	75'4 \pm 0'6	67'9 \pm 1'7	70'7 \pm 1'5	65'1 \pm 1'0	46'3 \pm 1'4
12'50	52'0 \pm 0'8	16'6 \pm 1'3	17'7 \pm 2'2	29'7 \pm 1'6	18'5 \pm 4'2
6'25	30'8 \pm 1'2	0'2 \pm 2'5	-3'4 \pm 3'8	9'6 \pm 2'0	-14'1 \pm 2'3
3'75	25'5 \pm 2'9	-1'5 \pm 3'8	-4'4 \pm 4'9	7'6 \pm 2'5	- 7'5 \pm 3'5
1'25	20'8 \pm 2'3	-1'5 \pm 3'3	-6'8 \pm 5'5	-1'3 \pm 3'0	- 4'8 \pm 5'3

El análisis de la varianza de la Tabla 7, se presenta en la Tabla estadística siguiente:

<u>Fuente</u>	<u>g.l.</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>F_{exp}</u>	<u>Signific.</u>
Entre dosis	6'0	150.226'7859	25.037'7976	3.921'1418	1%.
Entre células	4'0	8.041'2638	2.010'3159	314'8333	1%.
Interacción	24'0	5.288'5588	220'3566	34'5198	1%.
Dentro	70'0	446'9733	6'3853		

Obteniendo que:

- 1) Existe diferencia de inhibición entre las distintas dosis ($p < 0'001$).
- 2) Hay diferencia de inhibición entre las células ($p < 0'001$).
- 3) La diferencia de inhibición entre las células varía con la dosis ($p < 0'001$).

Por este motivo, hacemos una comparación entre las medias de inhibición de las células para cada dosis. Para ello, se disponen los valores medios obtenidos, para cada concentración, en orden creciente. Las medias que son iguales aparecen subrayadas entre sí, las que son distintas no lo estarán y las que se subrayan por dos veces significa que estadísticamente ocupan una posición ambigua. Todo ello para un error global, en cada concentración, del 5%.

Los resultados son los siguientes:

Dosis de E	Celulas	: M.O.	NS1	P815X2	MCG3	A1
125 µg/ml	Medias(%ING):	<u>95'1</u>	<u>96'3</u>	<u>96'5</u>	<u>98'0</u>	<u>98'6</u>

Dosis de E	Celulas	: P815X2	NSI	M.O.	MCG3	A1
62'5 $\mu\text{g/ml}$	Medias (%INH)	: 61'9	<u>84'8</u>	<u>85'1</u>	<u>93'0</u>	<u>94'8</u>
25 $\mu\text{g/ml}$	"	P815X2	MCG3	NS1	A1	M.O.
	"	46'3	<u>65'1</u>	<u>67'9</u>	<u>70'7</u>	<u>75'4</u>
12'5 $\mu\text{g/ml}$	"	NS1	A1	P815X2	MCG3	M.O.
	"	<u>16'6</u>	<u>17'7</u>	<u>18'5</u>	<u>29'7</u>	<u>52'0</u>
6'25 $\mu\text{g/ml}$	"	P815X2	A1	NS1	MCG3	M.O.
	"	-14'1	<u>-3'4</u>	<u>0'2</u>	<u>9'6</u>	<u>30'8</u>
3'75 $\mu\text{g/ml}$	"	P815X2	A1	NS1	MCG3	M.O.
	"	<u>- 7'5</u>	<u>-4'4</u>	<u>-1'5</u>	<u>7'6</u>	<u>25'5</u>
1'25 $\mu\text{g/ml}$	"	A1	P815X2	NS1	MCG3	M.O.
	"	<u>- 6'8</u>	<u>-4'8</u>	<u>-1'5</u>	<u>-1'3</u>	<u>20'8</u>

Observamos que para dosis iguales o inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ hay diferencia estadística significativa entre la inhibición de médula ósea y las células tumorales, resultando aquella más inhibida.

En sucesivos resultados se empleará igualmente un análisis de la varianza. Es por esto, que una vez analizado el significado de la tabla y subrayados, sólo se presentará la tabla estadística correspondiente, seguida de los resultados.

GRAFICA 4.- Efecto de E sobre la captación de $T-^3H$ por células de M.O. y células tumorales de ratón.

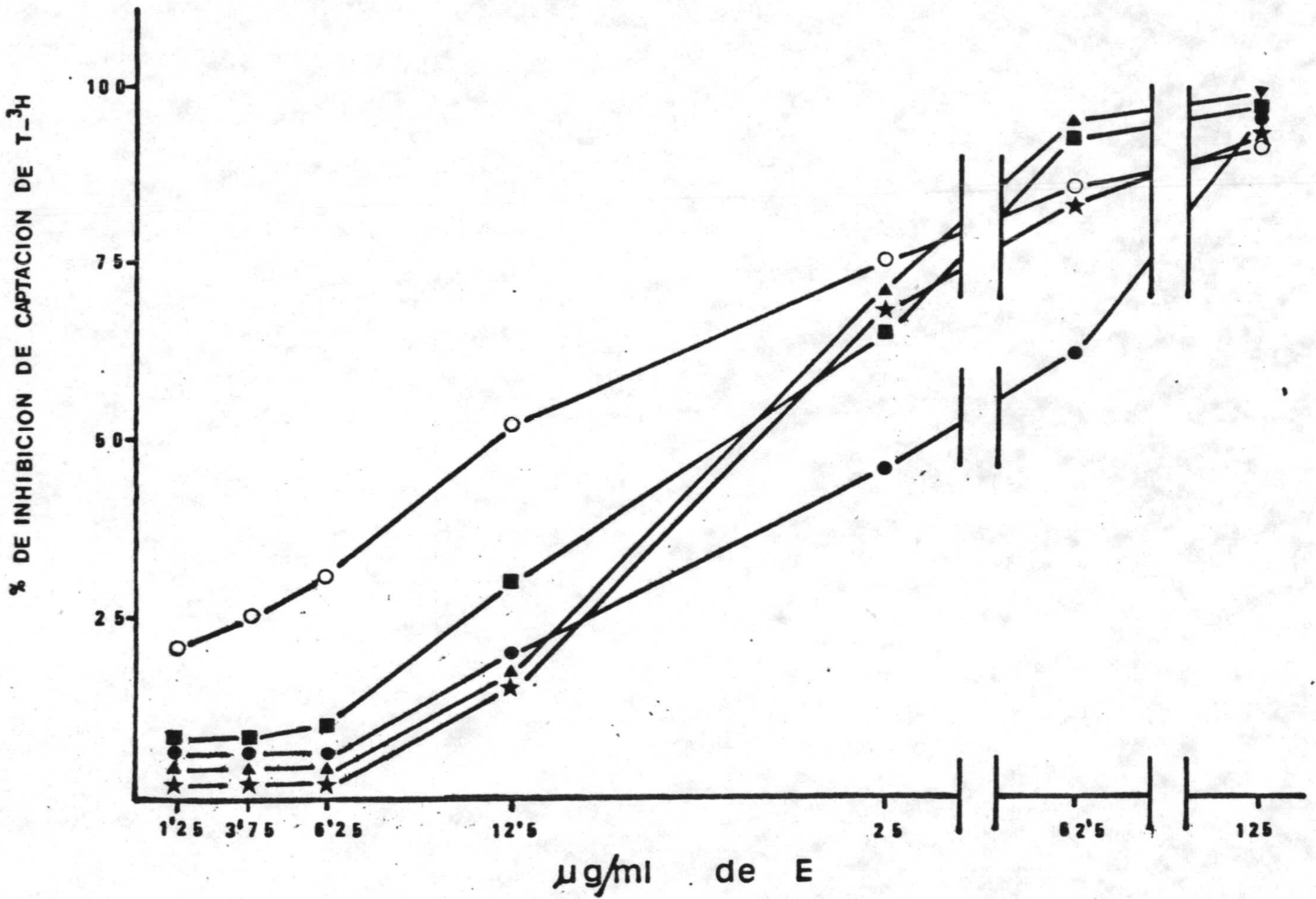
- M.O. (○ ——— ○) ; NS1 (★ ——— ★) ; A1 (▲ ——— ▲)
MCG3 (■ ——— ■) y P815X2 (● ——— ●)

- En ordenadas se representa el % de inhibición de captación de $T-^3H$ y en abcisas las $\mu g/ml$ de E.

- Los valores de inhibición con signo negativo (estimulación) se representan como inhibición cero.

Al pie de gráfica se expresan los valores de las actividades **absolutas** de E sobre las diversas células estudiadas.

GRAFICA 4



$A_E (M.O) = 1423 \frac{\mu}{\mu l}$
 $A_E (MCG3) = 861 \frac{\mu}{\mu l}$
 $A_E (A1) = 850 \frac{\mu}{\mu l}$
 $A_E (NS1) = 819 \frac{\mu}{\mu l}$
 $A_E (PB15X2) = 515 \frac{\mu}{\mu l}$

G) DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE E
SOBRE LA CAPTACION DE URIDINA-³H POR CELU-
LAS DE M.O. Y CELULAS TUMORALES DE RATON

El extracto crudo se tituló con células de médula ósea y células tumorales para estudiar la inhibición sobre la incorporación de Uridina-³H. Para dosis superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ no se observan diferencias significativas entre unas y otras células, mientras que concentraciones inferiores a esta, producen una mayor inhibición en la M.O. que en las células tumorales experimentadas (Tabla 8, Gráfica 5).

La actividad absoluta del extracto crudo sobre M.O. es superior a la de las células tumorales (Gráfica 5).

Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos, en el apartado anterior, sobre la incorporación de Timidina-³H.

TABLA 8.- Diferencia en la inhibición inducida por E sobre la incorporación de Uridina-³H en células de M.O. y dos células tumorales de ratón.

- Los resultados son dados como media del % de inhibición \pm S.D.

TABLA 8

<u>E</u> ($\mu\text{g/ml}$)	X% DE INHIBICION DE CAPTACION DE U- ³ H \pm S.D.		
	<u>M.O.</u>	<u>A1</u>	<u>NS1</u>
62'50	87'8 \pm 0'4	91'3 \pm 1'8	91'9 \pm 1'4
37'50	80'3 \pm 0'8	72'3 \pm 1'1	81'4 \pm 1'4
25'00	65'2 \pm 0'8	52'0 \pm 1'0	50'2 \pm 2'0
12'50	42'4 \pm 1'2	19'2 \pm 1'4	18'6 \pm 2'7
6'25	30'5 \pm 1'5	3'1 \pm 2'7	
3'75	28'8 \pm 2'0	-1'2 \pm 3'0	
1'25	13'7 \pm 3'5	-0'7 \pm 2'2	

Cuando se aplica el análisis de la varianza a la Tabla 8 se obtiene la siguiente Tabla estadística:

<u>Fuente</u>	<u>g.l.</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>F_{exp}</u>	<u>Signific.</u>
Entre dosis	3'0	21.047'3563	7.015'7854	3.287'7932	1%.
Entre células	2'0	716'1800	358'0900	167'8109	1%.
Interacción	6'0	970'1177	161'6862	75'7707	1%.
Dentro	24'0	51'2133	2'1338		

Los resultados son los siguientes:

Dosis de E	Células	:	M.O.	A1	NS1
62'5 ug/ml	Medias(%INH):		87'8	<u>91'3</u>	<u>91'9</u>
37'5 "	"		A1 72'3	M.O. <u>80'3</u>	NS1 <u>81'4</u>
25'0 "	"		NS1 <u>50'2</u>	A1 <u>52'0</u>	M.O. 65'2
12'5 "	"		NS1 <u>18'6</u>	A1 <u>19'2</u>	M.O. 42'5
6'25 "	"			A1 3'1	M.O. 30'4
3'75 "	"			A1 -1'2	M.O. 28'8
1'25 "	"			A1 0'27	M.O. 13'7

Con estos datos se demuestra estadísticamente que dosis de E iguales o inferiores a $25\mu\text{g/ml}$, producen una inhibición en M.O. mayor que en las células tumorales (para un error global, en cada concentración, del 5%).

GRAFICA 5.- Efecto de E sobre la captación de $U-^3H$ por células de M.O. y células tumorales de ratón.

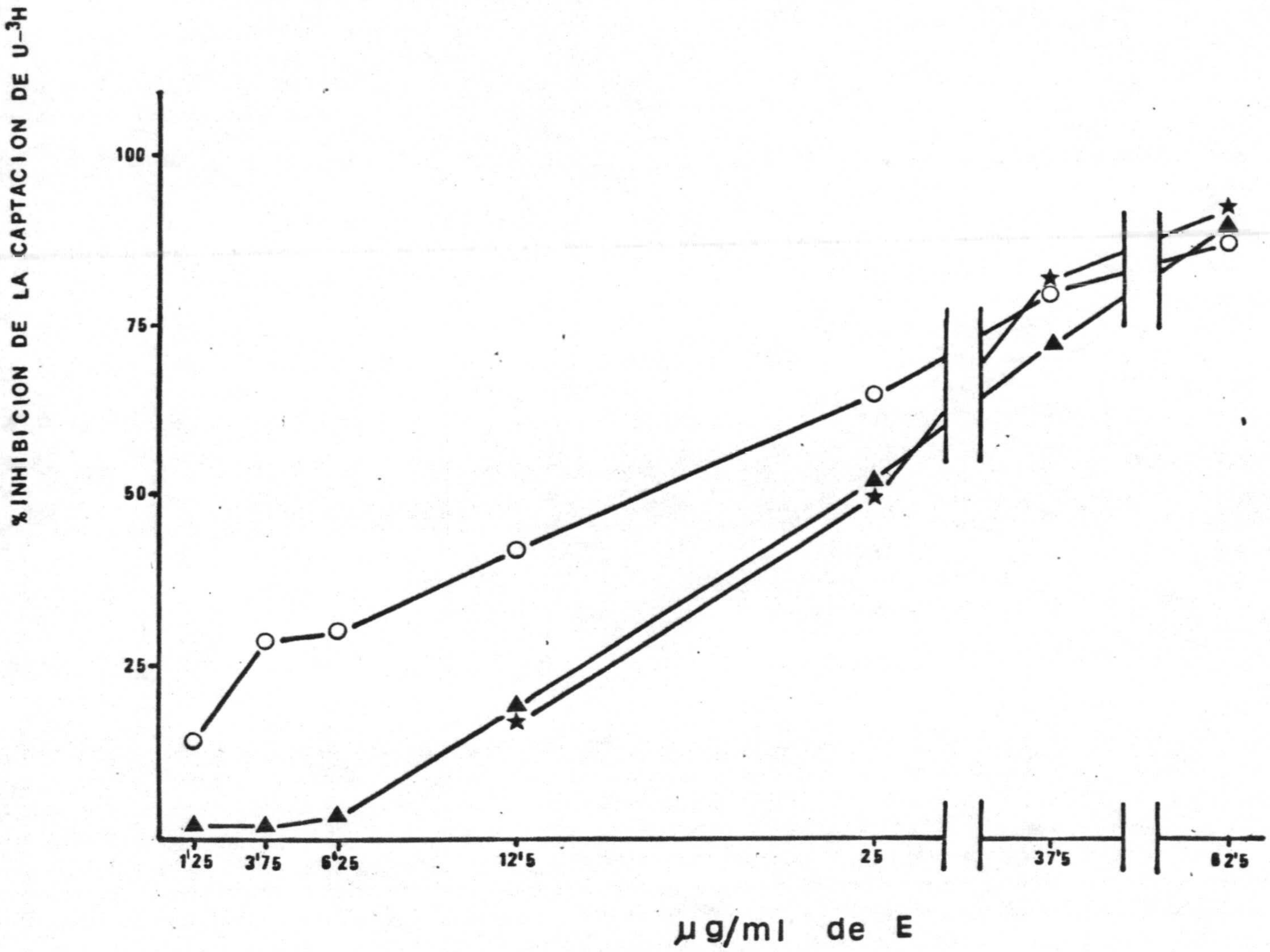
- M.O. (○ -----○) ; A1 (▲ -----▲) y NS1 (★-----★)

- En ordenadas se representa el % de inhibición de captación de $U-^3H$ y en abcisas los $\mu g/ml$ de E.

- Se han representado como inhibición cero aquellos valores que tenían signo negativo. (lo mismo se hará en sucesivas gráficas donde aparezca esta situación).

Al pie de gráfica se expresan los valores de las actividades absolutas de E sobre las diversas células estudiadas.

GRAFICA 5



$$A_E (MO) = 1012 \quad \frac{U_{50}}{ml}$$

$$A_E (A1) = 701 \quad "$$

$$A_E (NS1) = 680 \quad "$$

H) DIFERENCIA EN LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE E70 SOBRE LA CAPTACION DE TIMIDINA-³H POR CELULAS DE M.O. Y CELULAS TUMORALES DE RATON.

En la Tabla 9, Gráfica 6, se observa que concentraciones de E70 iguales o superiores a 30 $\mu\text{g/ml}$ no producen diferencia de inhibición entre las células de médula ósea y las células tumorales. Son, con dosis inferiores a 30 $\mu\text{g/ml}$, cuando surgen diferencias significativas para captar isótopo entre unas células y otras.

El E70 presenta mayor actividad absoluta en M.O. que sobre las células tumorales (Gráfica 6)

TABLA 9.- Diferencia en la inhibición inducida por E70 sobre la incorporación de Timidina - ^3H en células de M.O. y dos células tumorales de ratón.

- Los resultados se expresan como media del % de inhibición \pm S.D.

TABLA 9

<u>E70</u> <u>($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>\bar{X}% DE INHIBICION DE CAPTACION DE T-³H±S.D.</u>		
	<u>M.O.</u>	<u>A1</u>	<u>SL2</u>
75	93'2±0'5	97'0±1'2	
30	92'8±1'4	89'1±1'3	95'3±0'7
12	67'1±1'0	39'6±2'8	46'9±1'3
6	42'0±2'3	12'1±2'2	30'3±2'7
3	32'7±2'1	2'0±1'9	12'8±2'7

El análisis de la varianza de la Tabla 9 se recoge en la Tabla estadística siguiente:

<u>Fuente</u>	<u>g.l.</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>Fexp.</u>	<u>Signif.</u>
Entre dosis	3'0	30.660'8000	10.220'2666	2.575'2754	1%.
Entre células	2'0	3.166'1088	1.583'0544	398'8938	1%.
Interacción	6'0	925'3999	154'2333	38'8633	1%.
Dentro	24'0	95'2466	3'9686		

Los resultados son los siguientes:

Dosis de E70	Células :	M.O.	A1		
75 µg/ml	Medias(%Inh):	93'2	97'0		
30 "	"	A1	M.O.	SL2	
	"	89'1	92'8	95'3	
12 "	"	A1	SL2	M.O.	
	"	39'6	46'9	67'1	
6 "	"	A1	SL2	M.O.	
	"	12'1	30'3	42'0	
3 "	"	A1	SL2	M.O.	
	"	2'0	12'8	32'7	

Del análisis de estos resultados se deduce, que para concentraciones de E70 inferiores a 30 µg/ml la inhibición en las tres células es distinta, siendo la M.O. la que presenta mayor inhibición (para un error global, en cada dosis, del 5%)

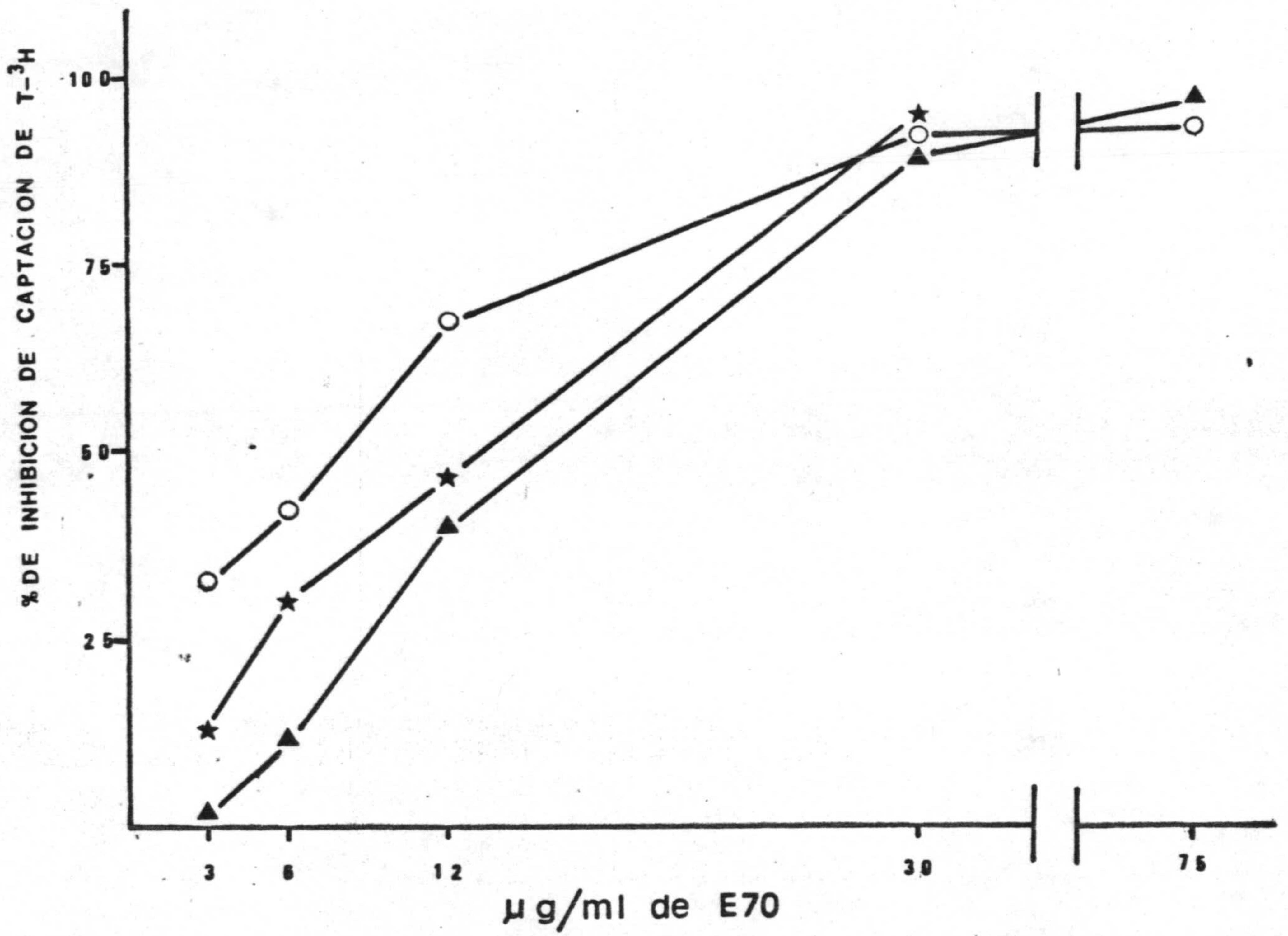
GRAFICA 6.- Efecto de E70 sobre la captación de T-³H por células de M.O. y células tumorales de ratón.

- M.O. (O ——— O); A1 (▲ ——— ▲) y SL2 (★ ——— ★)

- En ordenadas se representa el % de inhibición de captación de T-³H y en abcisas los $\mu\text{g/ml}$ de E70.

Al pie de gráfica se expresan los valores de las actividades absolutas de E70 sobre las diversas células usadas.

GRAFICA 6



$$A_{E70} (MO) = 1420 \quad \frac{U_{50}}{ml}$$

$$A_{E70} (SL2) = 851 \quad "$$

$$A_{E70} (A1) = 738 \quad "$$

I) ACTIVIDAD INHIBIDORA DE EXTRACTOS DE OTROS TUMORES SOBRE LA CAPTACION DE T-³H EN CELULAS DE M.O. Y CELULAS TUMORALES DE RATON.

Extracto crudo de P815Y y extractos calentados a 70°C durante 30' de P815Y y A1, se probaron en células de M.O. y células tumorales P815X2 y MCG3.

Los resultados recogidos en la Tabla 10, muestran que, en todos los casos, hubo inhibición de los diversos extractos sobre la captación del isótopo de timidina.

Al comparar la inhibición de E70P815Y sobre M.O. y P815X2, se encontró que para dosis de 25 y 5 µg/ml la M.O. se inhibe más que la célula tumoral.

TABLA 10.- Efecto de EP815Y, E70P815Y y E70A1 en la incorporación de isótopo de timidina por células de M.O., P815X2 y MCG3.

TABLA 10

CAPTACION DE TIMIDINA - ³H ± S.D.

EXTRACTO (µg/ml)	M.O.		P815X2		MCG3	
	D.P.M.	(%INH)	D.P.M.	(%INH)	D.P.M.	(%INH)
CONTROL			218.610±16.650			
EP815Y (100)	N.E.		75.364± 5.118	65'5±0'2	N.E.	
" (50)	N.E.		132.839± 8.318	39'2±3'8	N.E.	
CONTROL	75.245±1.960		218.610±16.650			
E70P815Y (25)	1.279± 419	98'3±0'6	90.504± 5.654	58'6±2'6	N.E.	
" ('5)	26.912±1.043	64'2±1'4	191.794± 3.200	12'3±1'5	N.E.	
" (2)	68.526±1.330	8'9±1'8	202.069± 4.811	7'6±2'2	N.E.	
CONTROL					38.012±2.520	
E70A1 (50)	N.E.		N.E.		1.638± 140	95'7±0'4



El análisis de la varianza se aplicó a la titulación de E70P815Y, obteniéndose la siguiente Tabla,

<u>Fuente</u>	<u>g.l.</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>Fexp.</u>	<u>Significación</u>
Entre dosis	2'0	14.888'1600	7.444'0800	2.346'6451	1%.
Entre células	1'0	4.327'6005	4.327'6005	1.364'2173	1%.
Interacción	2'0	2.090'1377	1.045'0688	329'4437	1%.
Dentro	12'0	38'0666	3'1722		

Los resultados fueron:

Dosis de E70P815Y	Células	:	P815X2	M.O.
25 µg/ml	Medias (%Inh)	:	58'6	98'3
5 "	"		P815X2	M.O.
	"		12'3	64'2
2 "	"		P815X2	M.O.
	"		<u>7'6</u>	<u>8'9</u>

De aquí se deduce que la inhibición producida por E70P815Y sobre M.O. y P815X2, estadísticamente es distinta ($p < 0'001$) para concentraciones de 25 y 5 µg/ml, igualándose a la concentración de 2 µg/ml (con un error global, para cada dosis, del 5%).

J) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO DE MCG3 TRATADO CON ENZIMAS, SOBRE LA CAPTACION DE T-³H EN CELULAS TUMORALES A1 DE RATON.

- El extracto de MCG3 se sometió independientemente a la acción de tripsina y proteasa. Como control se utilizó albúmina digerida con los mismos enzimas. Las concentraciones protéicas, antes y después de la hidrólisis enzimática, fueron cuantificadas por el método Bradford (material y metodos, pg.130). Estos resultados se presentan en la Tabla 11 A.

- La actividad inhibidora de estas sustancias se determinó incubándolas con células A1, (Tabla 11B, Gráfica 7).

Observamos que, con dosis de 10 μ l, el extracto crudo produce una inhibición del 99'8% y tanto el extracto tratado con tripsina como el hidrolizado con proteasa, siguen manteniendo la capacidad para inhibir la incorporación de isótopo: 97'4 y 97'2% respectivamente. Para la albúmina tratada enzimáticamente, en ningún caso, se observa inhibición, lo que nos indica que el tratamiento enzimático no es tóxico para las células.

Estos datos reflejan que el factor/es activo, no es sensible a la acción de enzimas proteolíticas.

TABLA 11 A, - Concentración protéica de la albúmina y el extracto crudo, antes y después de la hidrólisis enzimática.

TABLA 11 B, GRAFICA 7. - Actividad inhibidora de E; E tratado independientemente con tripsina y proteasa, y albúmina digerida con los mismos enzimas, sobre la incorporación de T-³H en células tumorales A1.

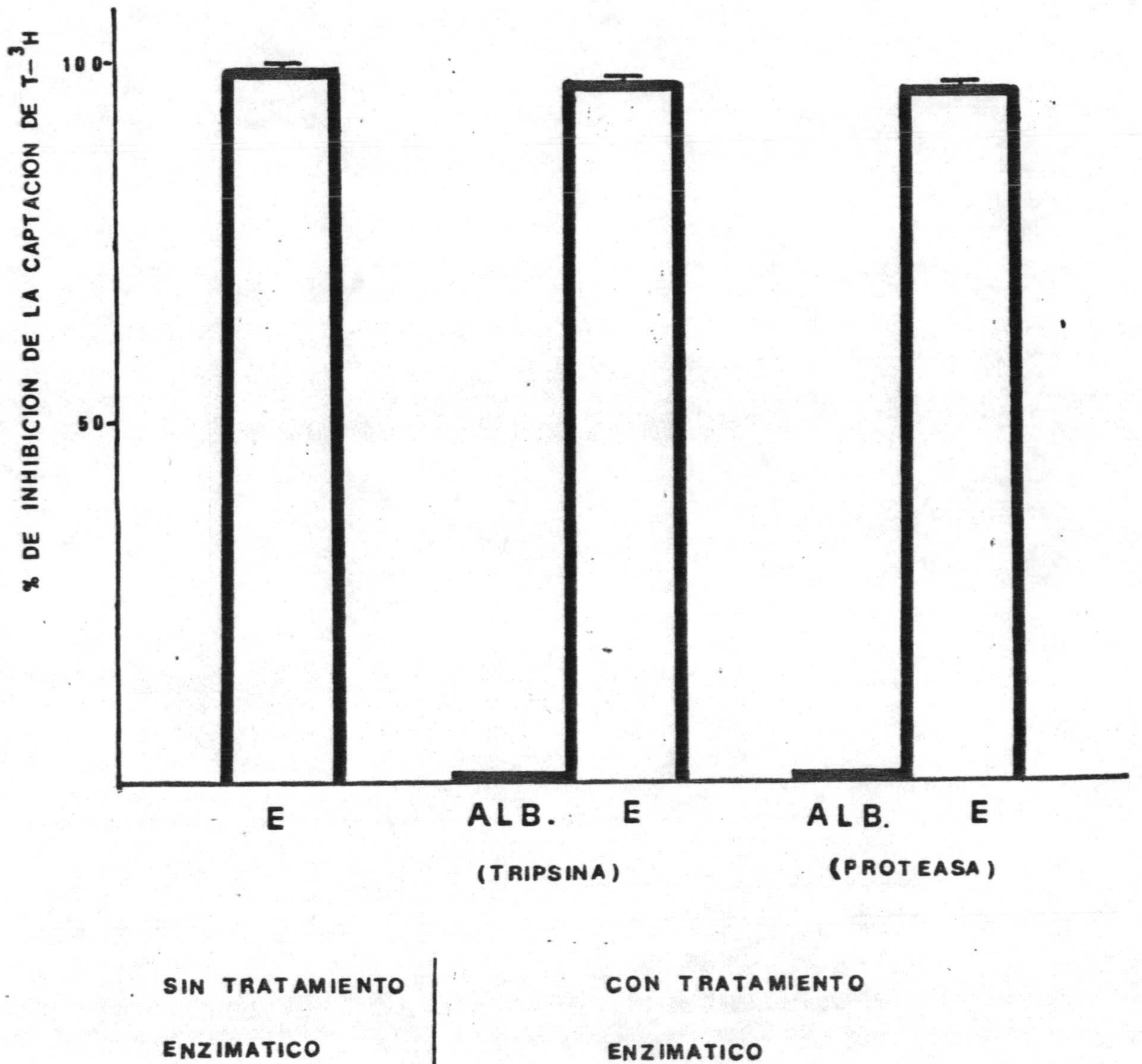
TABLA 11 A

	<u>CONCENTRACIONES ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</u>	
	<u>ALBUMINA</u>	<u>EXTRACTO</u>
SIN DIGESTION ENZIMATICA :	3'0	2'5
CON DIGESTION ENZIMATICA :		
- TRIPSINA	2'0	0'9
- PROTEASA	1'1	0'5

TABLA 11 B

<u>DOSIS (10μl/pocillo)</u>	<u>CAPTACION DE T-³H\pmS.D.</u>	
	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INHIBICION)</u>
CONTROL	280.339 \pm 17.976	
<u>E</u>	676 \pm 268	<u>99'8\pm0'1</u>
ALBUMINA+TRIPSINA	333.663 \pm 20.369	<u>0</u>
<u>E +TRIPSINA</u>	8.703 \pm 750	<u>97'4\pm0'2</u>
ALBUMINA+PROTEASA	313.884 \pm 842	<u>0</u>
<u>E +PROTEASA</u>	9.184 \pm 420	<u>97'2\pm0'1</u>

GRAFICA 7



K) ACTIVIDAD DE E70 TRATADO CON ETANOL SOBRE LA CAPTACION DE T-³H EN CELULAS DE MEDULA OSEA Y CELULAS TUMORALES DE RATON.

El E70 se trató con una disolución al 80% de etanol, apareciendo una fase precipitada y otra soluble (material y métodos, pg.134). Una y otra fase se probaron con células de M.O., A1 y P815X2 para observar la captación de T-³H.

Como control se utiliza solución de albúmina, que se somete al mismo proceso que E70, separándose también las dos fases para su estudio.

Los resultados se presentan en la Tabla 12, Gráfica 8. La fase precipitada de E70, prácticamente pierde la actividad inhibidora para captar isótopo, mientras que la fase soluble ejerce una elevada inhibición en todos los casos.

Por otro lado, en ninguna de las dos fases de albúmina, separadas por tratamiento con etanol, se aprecia efecto inhibidor sobre la incorporación de T-³H, lo que refleja la no toxicidad del tratamiento.

TABLA 12, GRAFICA 8.- Efecto inhibidor de E70 tratado con etanol y de albúmina, con igual tratamiento, sobre la captación de T-³H en células de M.O. y dos células tumorales de ratón.

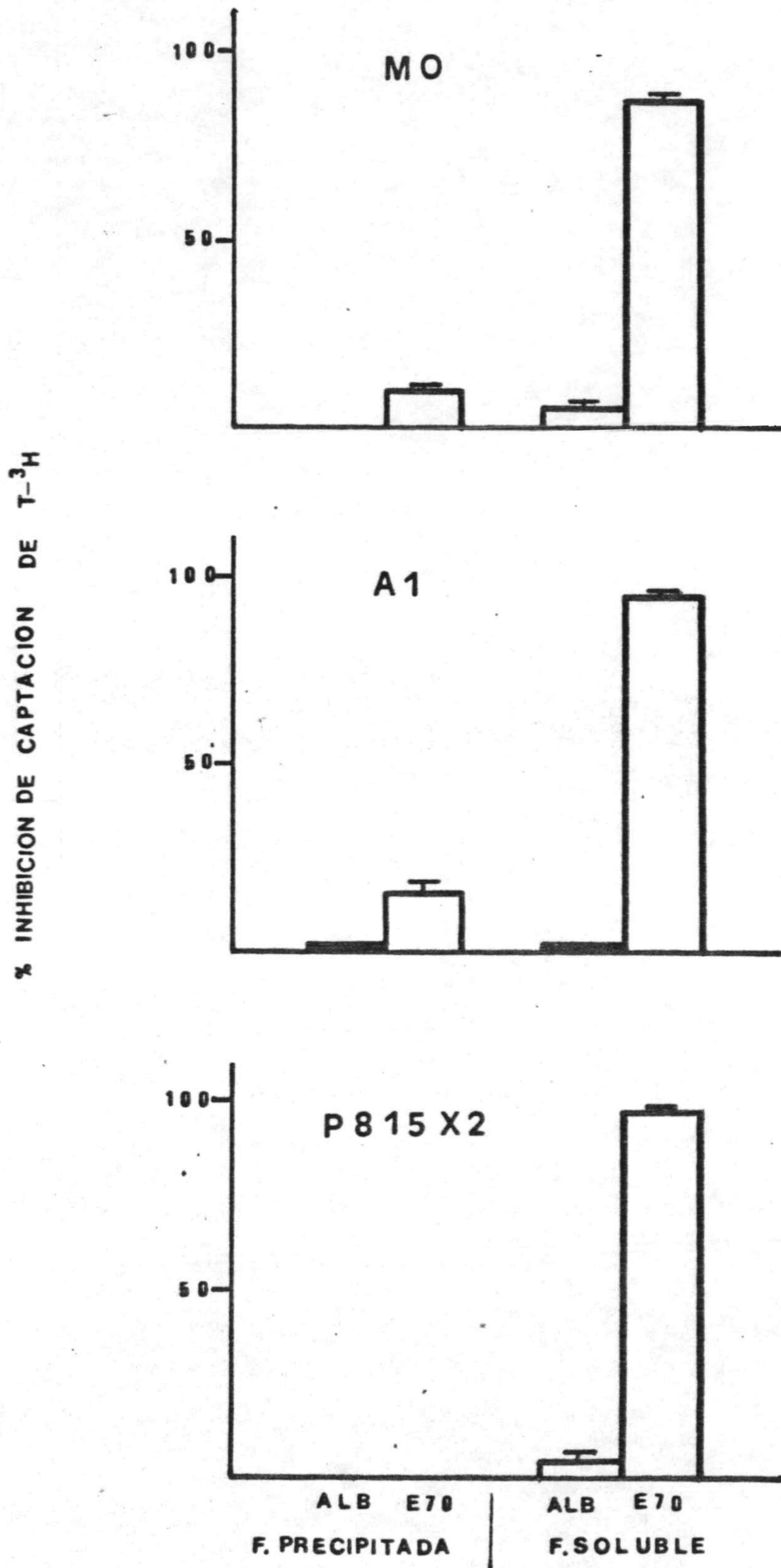
- La dosis utilizada de E70 y albúmina (tratados con etanol), fué de 10 μ l/pocillo.

TABLA 12

CAPTACION DE TIMIDINA - ^3H + S.D.

CELULAS	CONTROL	FASE PRECIPITADA		FASE SOLUBLE	
		ALBUMINA	E70	ALBUMINA	E70
	D.P.M.	D.P.M./(%INH)	D.P.M./(%INH)	D.P.M./(%INH)	D.P.M./(%INH)
<u>M.O.</u>	62.719 _± 64	62.437 _± 822 (0)	54.948 _± 247 (12'0 _± 0'4)	59.375 _± 415 (5'3 _± 0'7)	7.531 _± 406 (87'3 _± 0'7)
<u>A1</u>	306.312 _± 7.256	327.784 _± 10.672 (0)	276.656 _± 6.520 (15'6 _± 2'0)	347.550 _± 16.255 (0)	18.755 _± 2.390 (94'6 _± 0'7)
<u>P815X2</u>	260.283 _± 7.191	N.E.	N.E.	249.303 _± 6.530 (4'2 _± 2'5)	7.922 _± 645 (96'8 _± 0'3)

GRAFICA 8



L) ACTIVIDAD DE LA FASE SOLUBLE DE E70 EN ETANOL TRATADA CON CLOROFORMO SOBRE CELULAS NORMALES Y TUMORALES DE RATON.

En el apartado anterior observábamos que es la fase soluble de E70 en etanol la que presenta actividad inhibidora, por lo que ahora, la utilizamos para su estudio. Para ello, se somete esta fracción a un tratamiento con cloroformo, separándose de nuevo dos fases, una acuosa y otra orgánica, que reciben los nombres de fase I y II de E70, respectivamente (material y metodos, PG. 134).

La albúmina que utilizamos como control ha seguido los mismos procesos, extrayéndose también las dos fracciones.

Ambas fases de E70 y albúmina se incubaron con células normales y tumorales de ratón para analizar el efecto inhibitor sobre la captación de isótopo.

En la Tabla 13, Gráfica 9, se observa que la fase I (acuosa) de E70 no ejerce inhibición en ningún caso, siendo la fase II (orgánica) de E70 la que induce una elevada inhibición para incorporar isótopo.

Con respecto a la albúmina, ninguna de las fases tiene actividad inhibidora, lo que demuestra la no toxicidad del tratamiento.

Los datos aquí presentados señalan que el factor/es activo es soluble en disolventes orgánicos lo que sugiere su carácter lipídico.

TABLA 13, GRAFICA 9.- Efecto inhibidor de las fases I (acuosa) y II (orgánica) de E70 y albúmina sobre la captación de T-³H y U-³H en células normales y tumorales de ratón.

- Todas las células fueron estudiadas para la captación de T-³H, excepto las células de exudado peritoneal (C.E.P.) que lo fueron para la captación de U-³H.

- La dosis de E70 y albúmina, tanto de la fase I como de la II, fué de 10µl/pocillo.

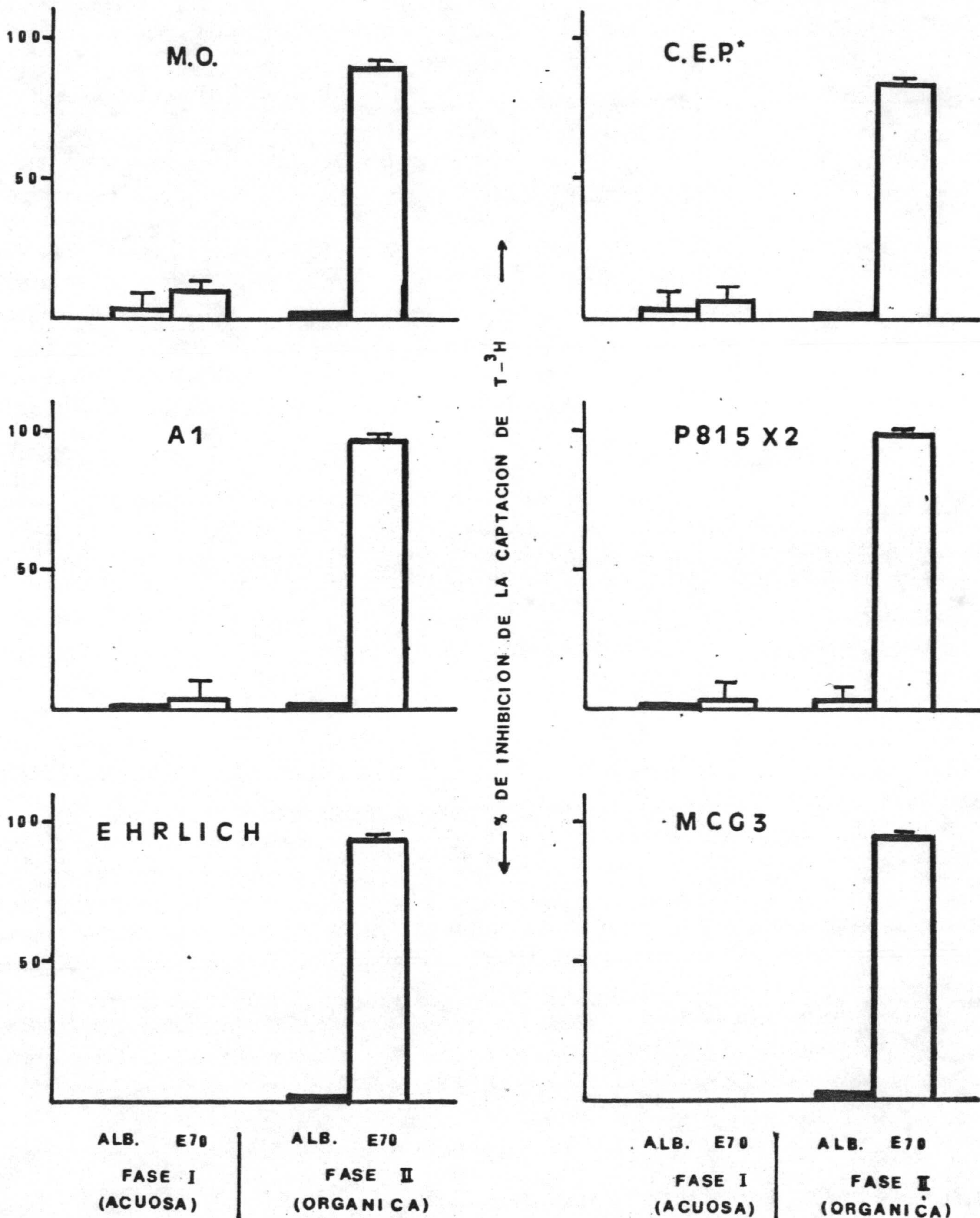
TABLA 13

CAPTACION DE TIMIDINA - ³H ± S.D.

CELULAS	CONTROL D.P.M.	FASE I (ACUOSA)		FASE II (ORGANICA)	
		ALBUMINA D.P.M./(%INH)	E70 D.P.M./(%INH)	ALBUMINA D.P.M./(%INH)	E70 D.P.M./(%INH)
C.M.O.	59.552± 4.288	57.849± 3.537 (2'9+5'9)	52.172± 1.581 (9'8+2'7)	64.632± 2.247 (0)	6.572± 895 (89'8+1'4)
C.E.P.*	17.918± 1.449	17.212± 1.148 (4'1+6'4)	16.095± 843 (6'5+4'9)	18.219± 1.143 (0)	2.946± 248 (83'8+1'4)
A1	332.622± 16.642	369.170± 29.173 (0)	355.266± 22.852 (3'8+6'2)	338.862± 17.657 (0)	9.662± 968 (97'1+0'3)
P815X2	283.445± 16.145	288.316± 19.303 (0)	281.217± 17.508 (2'5+6'1)	276.560± 13.777 (2'0+4'8)	247± 25 (99'9+0'1)
EHRlich	29.845± 1.125	N.E.	N.E.	30.194± 938 (0)	1.888± 260 (93'7+0'9)
MCG3	41.298± 5.091	N.E.	N.E.	46.279± 4.542 (0)	2.070± 51 (95'5+0'1)

*Captación de Uridina-³H.

GRAFICA 9



*CAPTACION DE U-³H

M) COMPARACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE EXTRACTO LIPIDICO (FASE II DE E70) SOBRE LA CAPTACION DE T-³H EN CELULAS DE M.O. Y CELULAS TUMORALES DE RATON.

Se ha nombrado como fase II (orgánica) de E70 a la fracción de E70 que, siendo soluble en etanol se disuelve además en cloroformo, es por ello que a partir de ahora recibirá la denominación de extracto lipídico. (material y métodos, pg. 135). En éste se encuentra la actividad inhibidora por lo cual procedemos a su titulación comparativa con células de M.O. A1 y P815X2.

La Tabla 14, Gráfica 10, muestran que para concentraciones superiores a 9 µg/ml de extracto lipídico no se observan diferencias significativas de inhibición entre las células estudiadas. Son con dosis inferiores a ésta cuando empieza a haber diferencias de la M.O. y las células tumorales A1 y P81X2 para incorporar T-³H.

El extracto lipídico sigue manteniendo la misma actividad absoluta sobre M.O. que en casos anteriores. Análoga situación ocurre sobre las células tumorales (Gráfica 10).

TABLA 14.- Diferencia en la inhibición inducida por el extracto lipídico sobre la incorporación de timidina-³H en células de M.O., A1 y P815X2.

TABLA 14

CAPTACION DE TIMIDINA-³H +S.D.

EXTRACTO LIPIDICO ($\mu\text{g/ml}$)	CAPTACION DE TIMIDINA- ³ H <u>+S.D.</u>					
	M.O.		A1		P815X2	
	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INH)</u>	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INH)</u>	<u>D.P.M.</u>	<u>(%INH)</u>
CONTROL	89.929+5.577		204.142+8.923		285.354+16.916	
15'0	11.772+ 283	<u>86'9+0'3</u>	32.308+2.195	<u>84'2+1'1</u>	27.979+ 1.432	<u>90'2+0'5</u>
9'0	19.776+1.323	<u>78'0+1'5</u>	76.574+2.314	<u>62'5+1'1</u>	84.822+ 2.904	<u>70'3+1'0</u>
3'0	50.632+2.062	<u>43'7+2'3</u>	186.814+4.083	<u>8'5+2'0</u>	219.658+12.050	<u>23'0+4'2</u>
2'1	61.026+2.765	<u>32'1+3'1</u>	209.855+9.632	<u>-2'8+4'7</u>	257.363+13.674	<u>9'8+4'8</u>
1'5	67.832+2.880	<u>24'6+3'2</u>	206.783+10.102	<u>-1'3+4'9</u>	267.511+13.932	<u>6'3+4'9</u>
0'9	87.426+2.985	<u>2'8+3'3</u>	204.685+9.987	<u>-0'3+4'9</u>	283.358+15.285	<u>0'7+5'3</u>
0'3	87.697+3.508	<u>2'5+3'9</u>	214.962+11.195	<u>-5'3+5'5</u>	296.670+17.789	<u>-4'0+6'3</u>

Cuando se aplica el análisis de la varianza a la Tabla 14 se obtiene la Tabla,

<u>Fuente</u>	<u>g.l.</u>	<u>s.c.</u>	<u>m.c.</u>	<u>Fexp.</u>	<u>Signif.</u>
Entre dosis	6'0	67.244'4326	11.207'4054	795'8100	1%.
Entre células	2'0	3.397'0441	1.698'5220	120'6078	1%.
Interacción	12'0	1.955'5625	162'9635	11'5716	1%.
Dentro	42'0	591'4866	14'0830		

Los resultados son:

Dosis de E.lipídico	Células	A1	M.O.	P815X2
15µg/ml	Medias(%Inh)	84'2	86'9	90'2
9 "	"	A1 62'5	P815X2 70'3	M.O. 78'0
3 "	"	A1 8'5	P815X2 23'0	M.O. 43'7
2'1 "	"	A1 -2'8	P815X2 9'8	M.O. 32'1
1'5 "	"	A1 -1'3	P815X2 6'3	M.O. 24'6
0'9 "	"	A1 -0'3	P815X2 0'7	M.O. 2'8
0'3 "	"	A1 -5'3	P815X2 -4'0	M.O. 2'5

De aquí se deduce que para concentraciones, de extracto lipídico, comprendidos entre 9 y 1'5 $\mu\text{g/ml}$, la inhibición ejercida en las tres células es estadísticamente distinta ($p < 0'001$) siendo la M.O. la que presenta mayor inhibición. Con dosis superiores o inferiores a éstas, las inhibiciones se igualan. Todo ello para un error global, en cada dosis, del 5%.

GRAFICA 10.- Efecto del extracto lipídico sobre la captación de T-³H en células de M.O. y células tumorales de ratón.

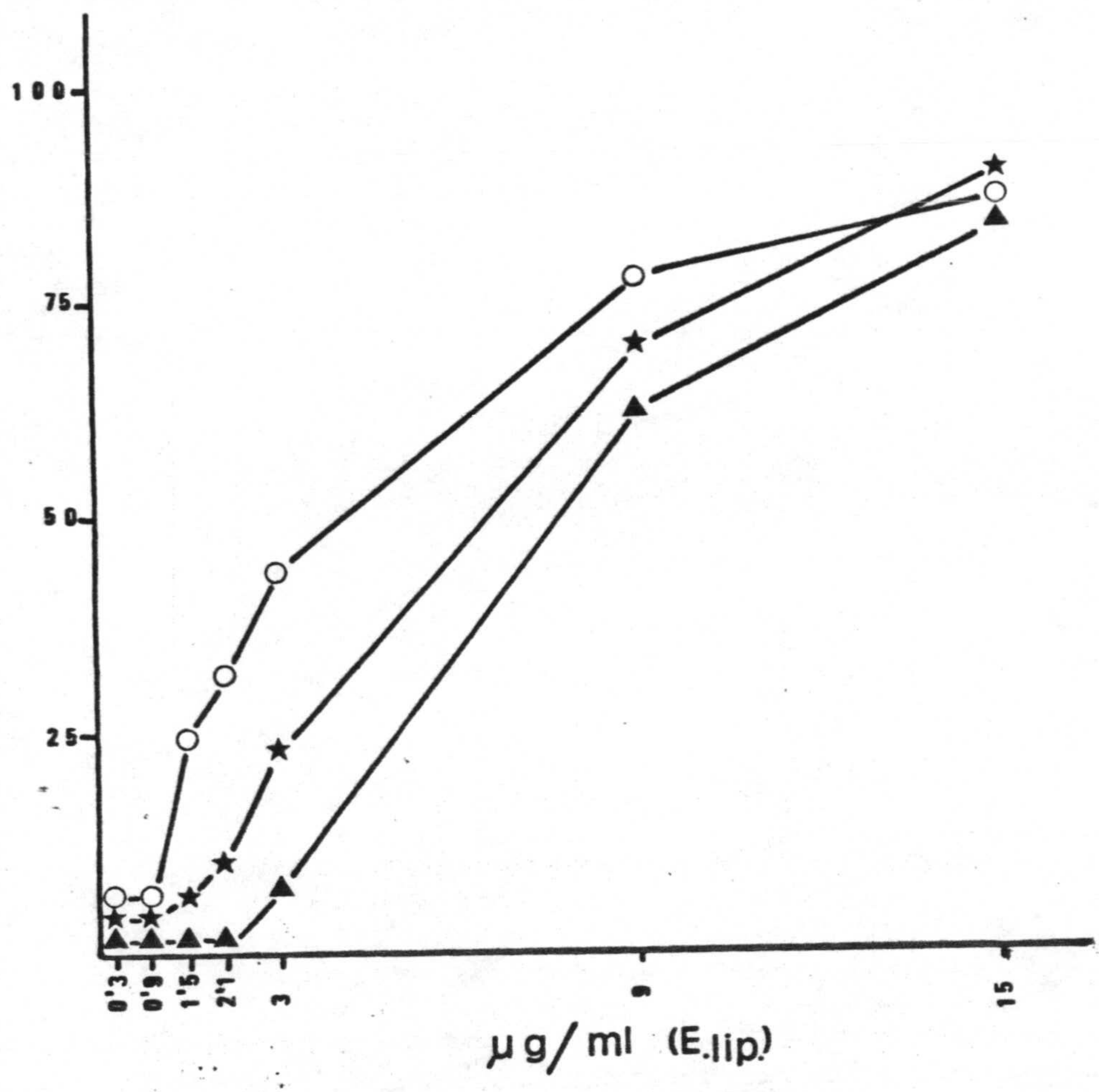
- M.O. (○ ----- ○); A1 (▲ ----- ▲) y P815X2 (★-----★)

- En ordenadas se expresa el % de inhibición de captación de T-³H y en abcisas la concentración en µg/ml.

Al pie de gráfica se expresan los valores de la actividad absoluta del extracto lipídico sobre las células estudiadas, así como la actividad específica en médula ósea.

GRAFICA 10

% INHIBICION DE CAPTACION DE TIMIDINA-³H



$$A_{E.LIP. (MO)} = 1481 \frac{U_{50}}{ml}$$

$$A_{E.LIP. (P815X2)} = 923 \cdot$$

$$A_{E.LIP. (A1)} = 789 \cdot$$

$$A_{E.LIP. (MO)} = 1235 \frac{U_{50}}{mg}$$

N) DIFERENCIA DE INHIBICION INDUCIDA POR EL EXTRACTO LIPIDICO SOBRE LA INCORPORACION DE T-³H POR CELULAS TUMORALES CULTIVADAS Y FRESCAS.

En la Tabla 15, Gráfica 11, observamos como 30 µg/ml de extracto lipídico inhibe de manera distinta la captación de isótopo, según las células tumorales utilizadas sean cultivadas o frescas. La inhibición es de un 93'7% para las células MCG3 cultivadas, mientras que para las células frescas disminuye a un 74'4%. Para el caso de Ehrlich la diferencia, respectivamente, entre unas y otras es mucho más acusada, 95'5% y 0%.

TABLA 15, GRAFICA 11.- % de inhibición de la captación de T-³H por extracto lipídico en células tumorales cultivadas y frescas de MCG3 y Ehrlich.

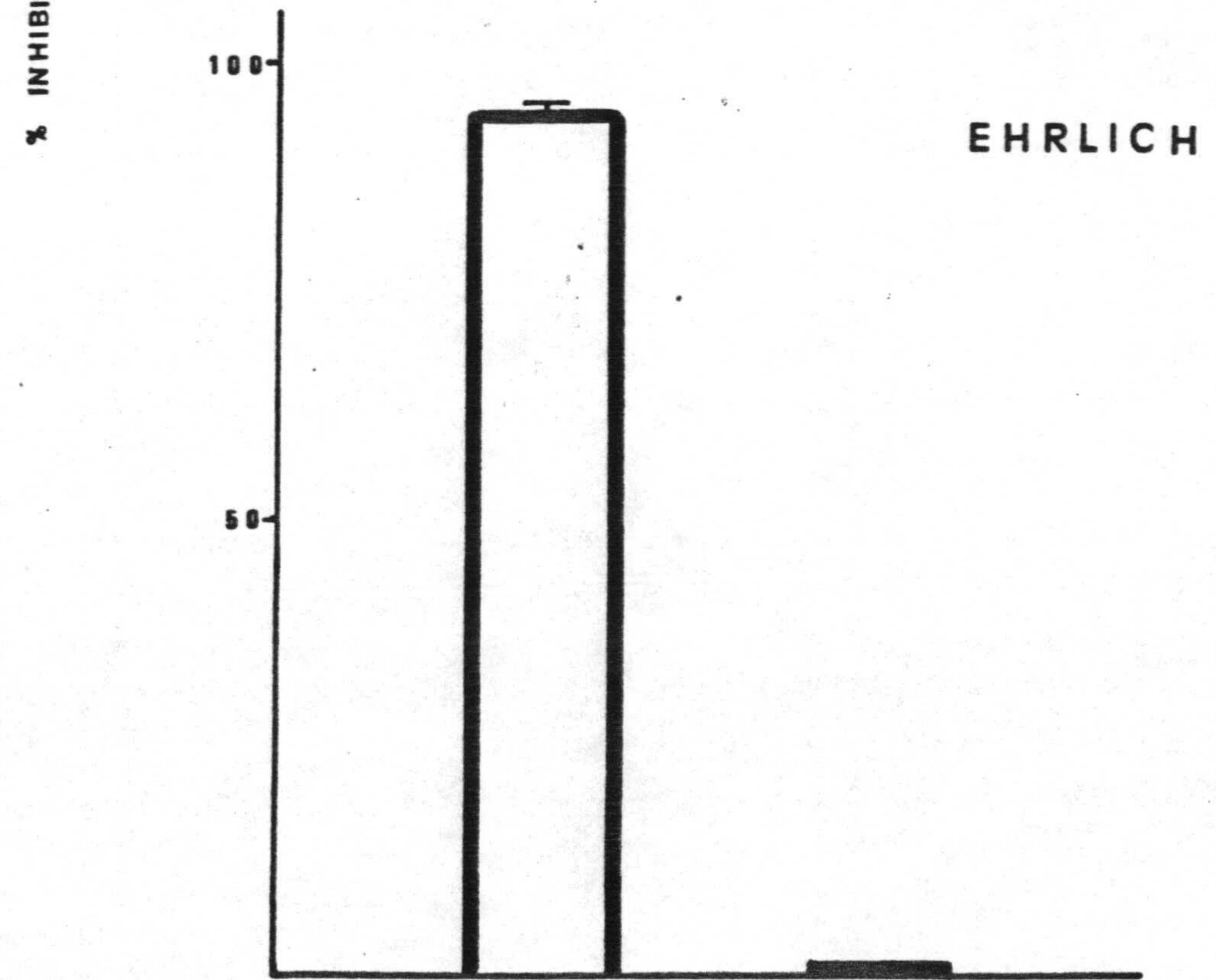
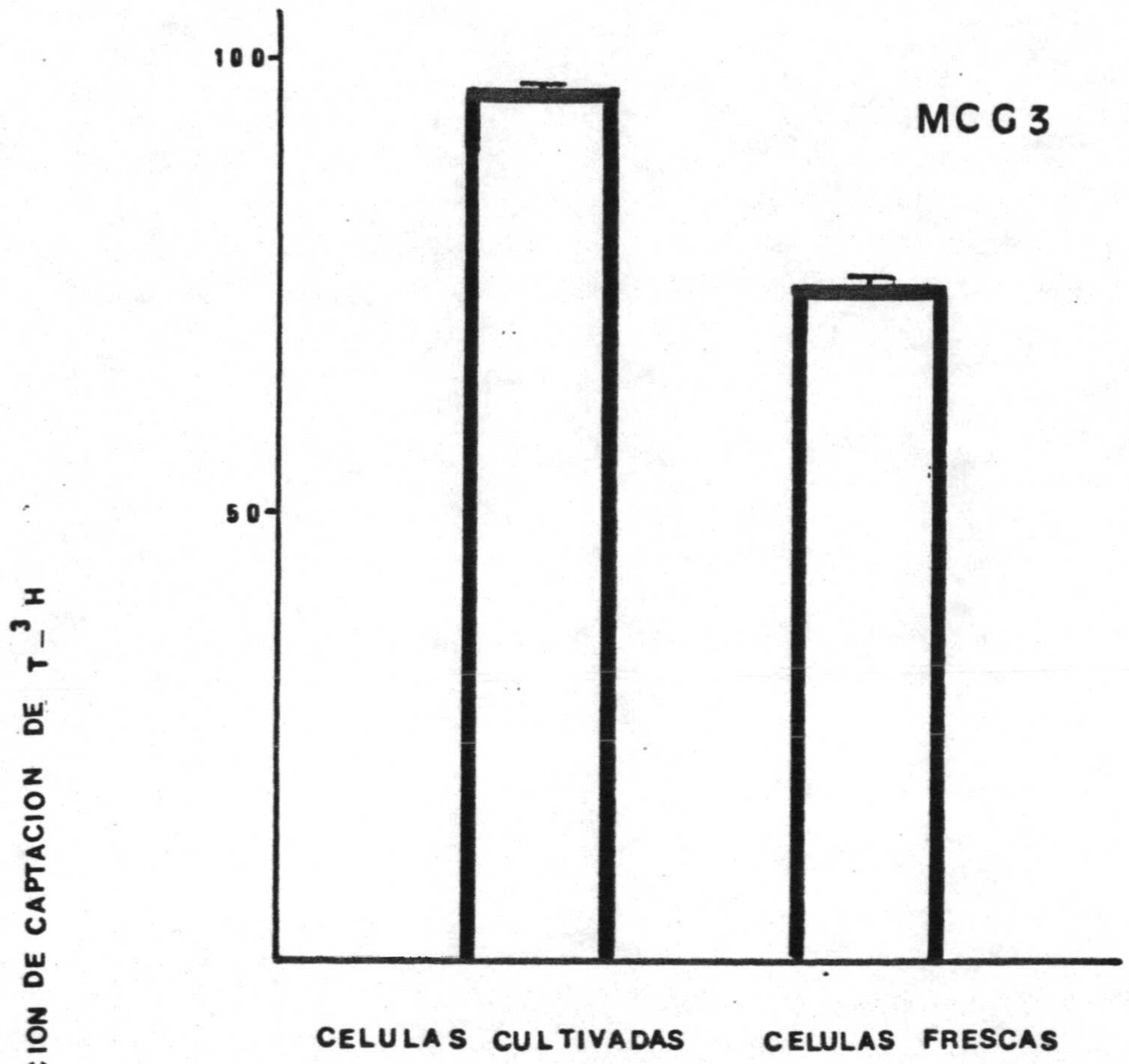
TABLA 15

CAPTACION DE T-³H \pm S.D.

		<u>C. CULTIVADAS</u>		<u>C. FRESCAS</u>	
		<u>D.P.M.</u>	<u>(% INH)</u>	<u>D.P.M.</u>	<u>(% INH)</u>
<u>MCG3</u>	CONTROL	46.279+4.542		68.018+1.395	
	30 μ g/ml	2.070+ 51	<u>95'5\pm0'1</u>	17.401+ 756	<u>74'4\pm1'1</u>
<u>ERLICH</u>	CONTROL	30.194+ 938		52.986+3.818	
	30 μ g/ml	1.888+ 260	<u>93'7\pm0'9</u>	65.927+4.556	<u>0</u>

Se aplicó un test de Student a las células MCG3 cultivadas y frescas, para conocer si las medias de inhibición producidas por el extracto lipídico eran o no distintas. Estadísticamente se encuentra que las células cultivadas, presentan mayor inhibición que las frescas ($p < 0'001$).

GRAFICA 11



O) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO LIPI-
DICO PARA LA CAPTACION DE T-³H SOBRE CELULAS
FRESCAS DE EHRLICH Y M.O.

- Distintas dosis de extracto lipídico se probaron en células frescas de Ehrlich y M.O. La captación de T-³H por células de M.O. resulta inhibida en un amplio rango de concentraciones de extracto (de 15 a 1'5 µg/ml) y sólo con dosis tan bajas como 0'9 µg/ml desaparece la inhibición. Sin embargo, las células tumorales frescas de Ehrlich no son inhibidas en ningún caso (Tabla 16, Gráfica 12).

TABLA 16.- Efecto del extracto lipídico en la incorporación de T-³H por células frescas de Ehrlich y M.O.

TABLA 16

CAPTACION DE T³H \pm S.D.

E. LIPIDICO (μ g/ml)	M.O.		EHRlich	
	D.P.M.	(% INH)	D.P.M.	(% INH)
CONTROL	89.929 \pm 5.557		52.986 \pm 3.818	
15	11.772 \pm 287	86'9 \pm 0'3	63.705 \pm 3.019	-20'2 \pm 5'7
9	19.776 \pm 1.323	78'0 \pm 1'5	55.380 \pm 6.195	- 4'5 \pm 11'7
3	50.632 \pm 2.062	43'7 \pm 2'3	51.656 \pm 5.020	2'5 \pm 9'5
2'1	61.026 \pm 2.765	32'1 \pm 3'1	52.569 \pm 4.735	0'1 \pm 8'9
1'5	67.832 \pm 2.880	24'6 \pm 3'2	53.418 \pm 4.138	- 0'1 \pm 7'8
0'9	87.426 \pm 2.985	2'8 \pm 3'3	58.213 \pm 4.316	- 9'9 \pm 8'1
0'3	87.697 \pm 3.508	2'5 \pm 3'9	56.202 \pm 5.304	- 6'1 \pm 10'0

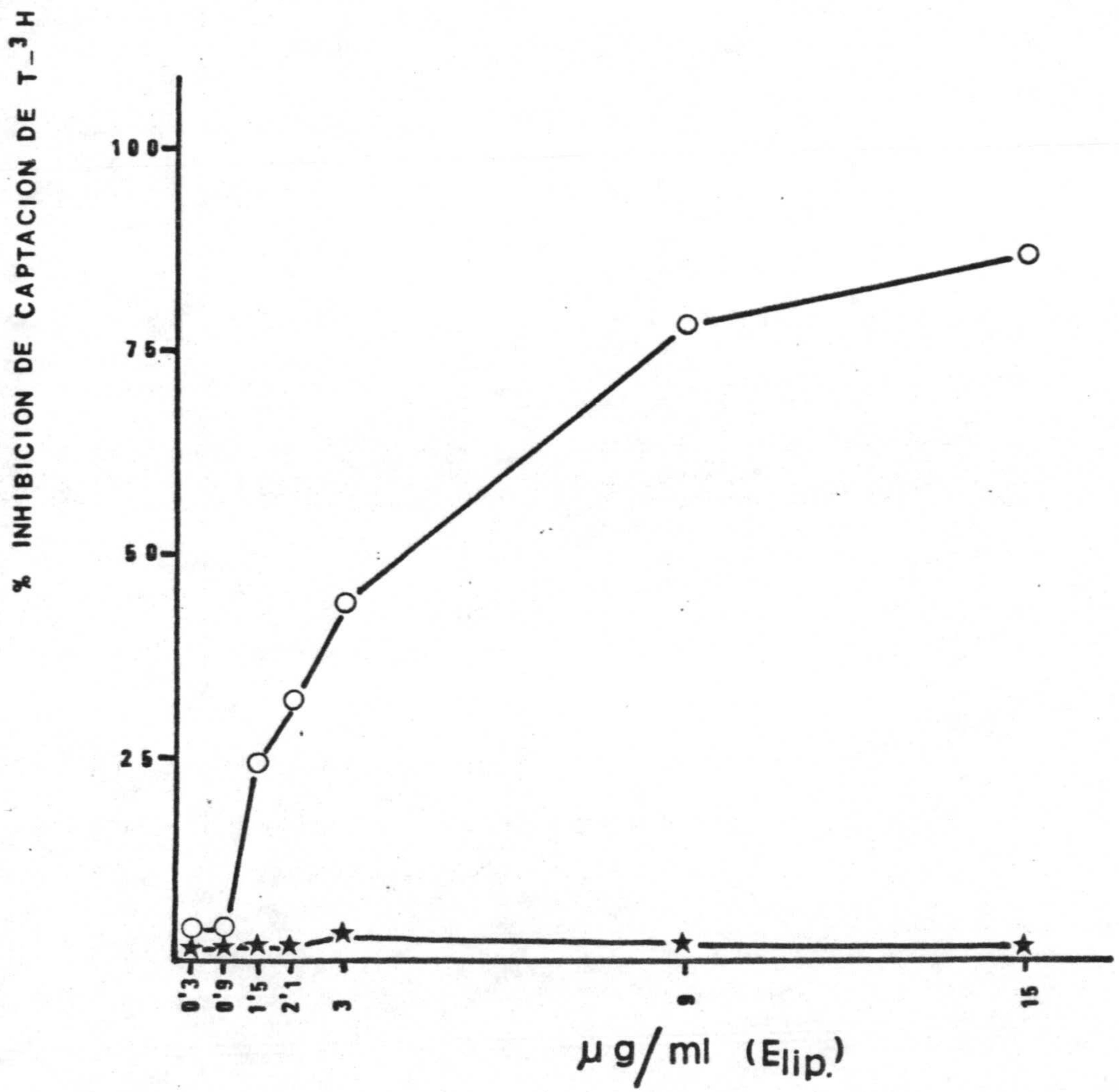
GRAFICA 12.- Efecto del extracto lipídico sobre la captación de T-³H en células frescas de Ehrlich y M.O.

- M.O. (○—○); Ehrlich (★—★)

- En ordenadas se expresa la captación de T-³H y en abcisas la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de extracto lipídico.

- Se han representado los valores negativos de inhibición como cero.

GRAFICA 12



P) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO LIPIDICO
SOBRE LA CAPTACION DE T-³H EN LINFOCITOS HUMA-
NOS ESTIMULADOS CON PHA.

En la Tabla 17, se expresa una titulación de extracto lipídico sobre linfocitos humanos transformados con PHA. De manera análoga a como ya lo hiciera en otras células de ratón, el extracto sigue inhibiendo la captación de isótopo en linfocitos humanos tratados con PHA.

TABLA 17.- Efecto del extracto lipídico sobre la incorporación de T-³H en linfocitos humanos estimulados con PHA.

TABLA 17

<u>E. LIPIDICO</u> ($\mu\text{g/ml}$)	<u>CAPTACION DE T-³H \pm S.D.</u>		
	<u>D.P.M.</u>		<u>% INHIBICION</u>
CONTROL	289.935 \pm 14.536		
30	89 \pm	38	<u>99'9\pm0'0</u>
15	511 \pm	53	<u>99'8\pm0'0</u>
3	164.091 \pm 10.304		<u>43'4\pm3'6</u>

Q) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO LIPIDICO SOBRE LA CAPTACION DE T-³H POR CELULAS TUMORALES MCG3, INCUBADAS CON SUEROS SANGUINEOS DE DISTINTAS ESPECIES.

Es muy poco probable que el extracto lipídico pueda contener poliaminas, ya que éstas son sustancias polares. No obstante como se secretan en gran cantidad por las células tumorales (RUSSEL, 1973) y presenta actividad inhibidora sobre el crecimiento celular (HIGGINS y col ., 1969; TABOR y TABOR, 1976) desarrollamos un protocolo para detectarlas en el extracto lipídico (material y métodos, pg.135).

El efecto inhibidor del extracto lipídico sobre la incorporación de T-³H persistió en todos los casos en que se incubaron células tumorales MCG3 con suero fetal de ternera (rico en poliamina oxidasa), humano y de caballo (carentes de poliamina oxidasa). (Tabla 18, Gráfica 13).

Puesto que las poliaminas necesitan de la poliamina oxidasa para actuar (BACHRACH, 1970), el hecho de que persista la actividad inhibidora usando sueros carentes en este enzima, demuestra que el extracto lipídico no contiene poliaminas.

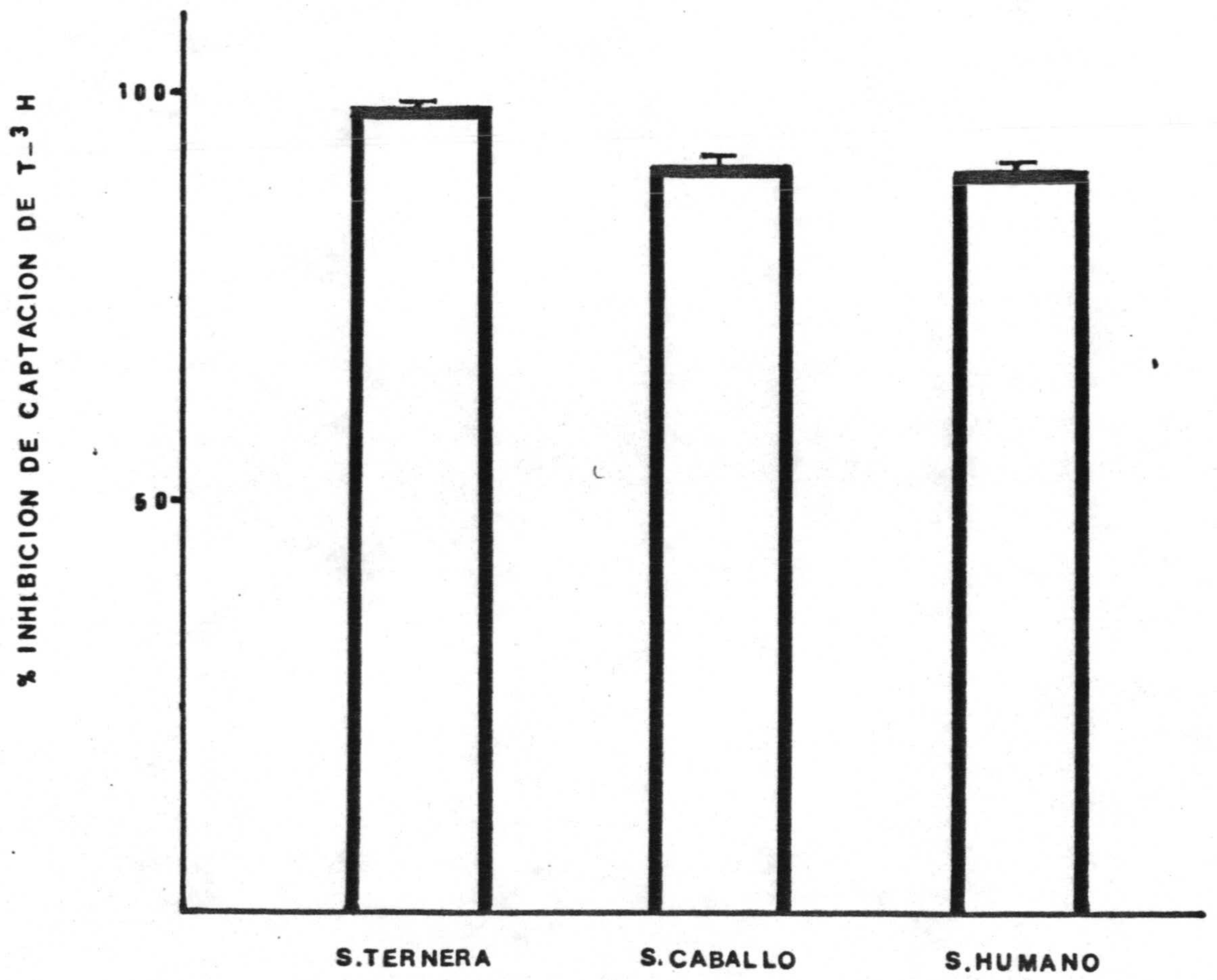
TABLA 18, GRAFICA 13.- Inhibición inducida por el extracto lipídico sobre la captación de T-³H en células MCG3, incubadas independientemente con suero fetal de ternera, humano y de caballo.



TABLA 18

<u>SUEROS</u>	<u>E. LIPIDICO</u>	<u>CAPTACION DE T³H ± S.D.</u>	
		<u>D.P.M.</u>	<u>% INHIBICION</u>
FETAL DE TERNERA	CONTROL	43.857±2.237	
	30 µg/ml	837± 41	<u>98'1±0'1</u>
HUMANO	CONTROL	165.758±4.386	
	30 µg/ml	15.082±1.659	<u>90'9±1'1</u>
CABALLO	CONTROL	33.816±1.441	
	30 µg/ml	3.677± 262	<u>89'1±0'8</u>

GRAFICA 13



R) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF) DEL EXTRACTO LIPIDICO DE MCG3.

En la Gráfica 14 se representa el efecto inhibitor de las diferentes fracciones de extracto lipídico de MCG3, obtenidas mediante cromatografía preparativa en capa fina, sobre la captación de T-³H en células de médula ósea y células tumorales P815X2 de ratón. Se observa que tanto con M.O. como con P815X2, aparecen dos picos importantes de actividad inhibidora; el primero (I) con un $Rf_{100} = 0 - 3$ (correspondiente a 1 cm de placa cromatográfica) y el segundo (II) de $Rf_{100} = 29 - 46$ (que incluye 3 cm de placa).

Igualmente se expresan las diferentes bandas que aparecen al revelar otra cromatografía analítica, conteniendo extracto lipídico y standares de prostaglandinas, colesterol, aldosterona y cortisona.

- GRAFICA 14.- Efecto inhibidor de las distintas fracciones separadas por cromatografía en capas finas, de extracto lipídico de MCG3 sobre células de M.O. y P815X2.

- En ordenadas se representa el % de inhibición de la captación de T-³H y en las abcisas los R_{fx100} ,

$$(R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}})$$

- Se expresa también el disolvente empleado en la cromatografía, así como la serie de bandas obtenidas del extracto lipídico y de las sustancias estándares.

S) COMPARACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE EXTRACTO LIPIDICO DE MCG3 y EXTRACTO LIPIDICO DE BAZO DE RATON, SOBRE LA CAPTACION DE T-³H POR CELULAS DE M.O. DE RATON.

En la Tabla 19, Gráfica 15, se expresa una titulación de extracto lipídico de MCG3 y de bazo de ratón sobre células de médula ósea.

La inhibición producida por el extracto lipídico de MCG3 sobre la captación de isótopo es mucho mayor, para cualquier concentración estudiada, que la ejercida por el extracto lipídico de bazo de ratón.

TABLA 19.- Diferencia en la inhibición inducida por extracto lipídico de MCG3 y de bazo de ratón, sobre la incorporación de T-³H por células de M.O. de ratón.

TABLA 19

CAPTACION DE TIMIDINA - ^3H \pm S.D

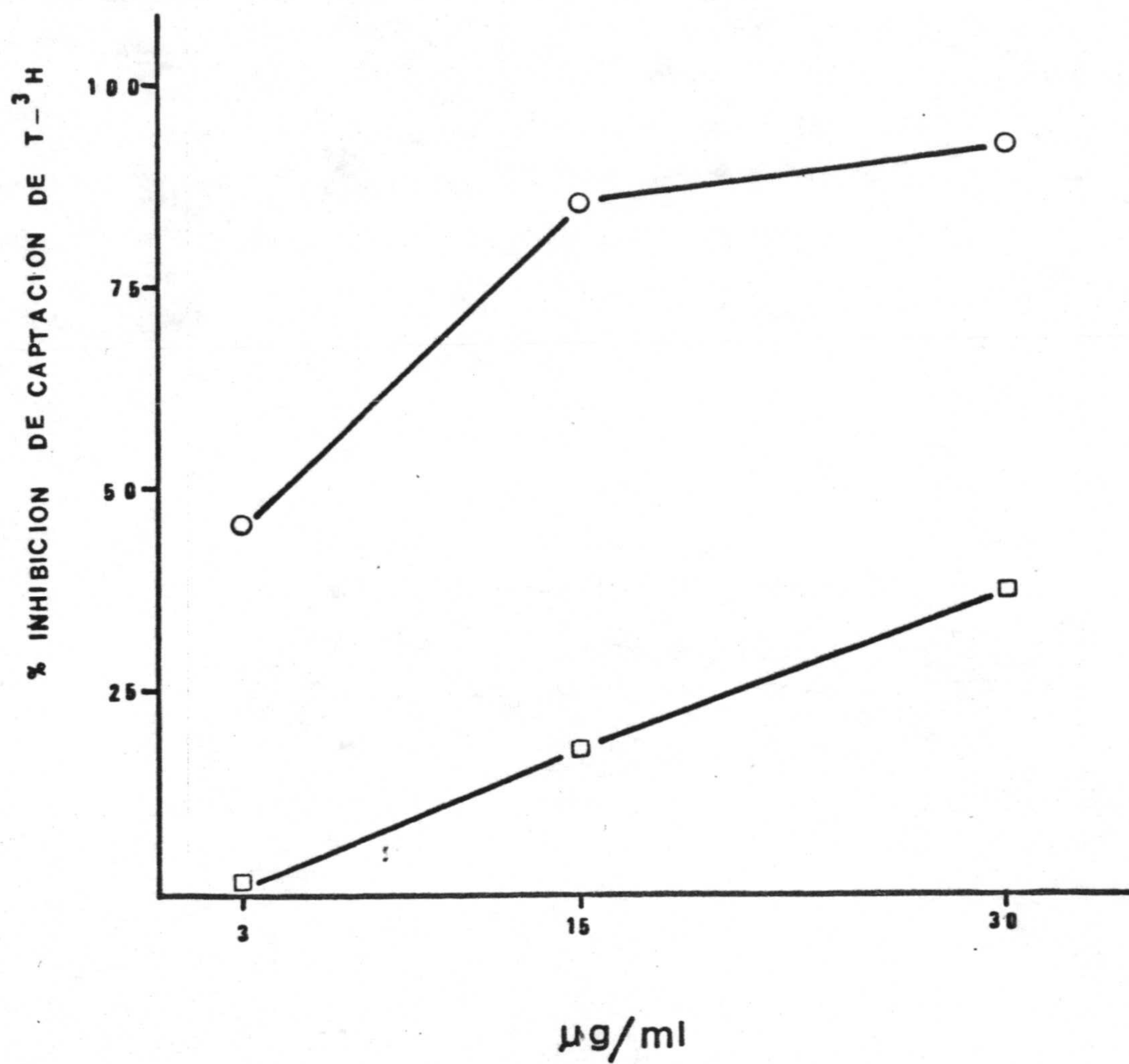
<u>CONCENTRACION</u> ($\mu\text{g/ml}$)	<u>EXTRACTO LIPIDICO (MCG3)</u>		<u>EXTRACTO LIPIDICO (BAZO)</u>	
	<u>D.P.M.</u>	<u>(% INH)</u>	<u>D.P.M.</u>	<u>(% INH)</u>
CONTROL	73.598+4.983		70.282+4.826	
30	5.299+ 985	<u>92'8\pm1'3</u>	43.660+1.086	<u>37'9\pm1'5</u>
15	10.966+1.037	<u>85'1\pm1'8</u>	57.350+1.925	<u>18'4\pm2'7</u>
3	40.037+2.080	<u>45'6\pm2'8</u>	69.578+2.538	<u>1'0\pm3'6</u>

GRAFICA 15. - Efecto de extracto lipídico de MCG3 y de bazo de ratón, en la captación de T-³H por células de M.O.

- Extracto lipídico de MCG3 (○—○); extracto lipídico de bazo (□—□).

- En ordenadas se representa el % de inhibición de captación de T-³H y en abcisas la concentración en µg/ml.

GRAFICA 15



DISCUSSION

DISCUSION

Prólogo

Son numerosos los factores inmunosupresores descritos, tanto en los fluidos de los portadores de un tumor como en los extractos directos de células tumorales (ver introducción). Las características físico-químicas de estos factores son muy variadas, así como sus pesos moleculares, pero la mayor parte de ellos coinciden en su carácter protéico o peptídico. También tienen en común la capacidad de inhibir uno o varios aspectos funcionales del sistema inmune, por lo que se piensa que estos factores secretados por las células tumorales, contribuyen al "escape" de éstas a la actuación del sistema inmune (ver introducción).

Algunos de estos factores inmunosupresores actúan inicialmente sobre células inmunes (WILKINS y col., 1983a, 1983b; SIMON y col., 1983), otros además de su actividad inmunosupresora, inhiben la proliferación de células no inmunes (REMACLE-BONNET y col., 1976).

Por otra parte hay factores inmunosupresores que son especiesespecíficos (KUMAR y col., 1981;

SIMON y col., 1983) y otros que tienen la capacidad de actuar sobre células de distinta especie (REMACLE-BONNET, 1976; OH y col., 1981a, 1981b).

Dentro de este contexto, el factor/es detectado en el linfoma MCG3 tiene actividad inmunosupresora ya que inhibe la síntesis de DNA y RNA en células inmunes normales: células de bazo de ratón y linfocitos periféricos humanos estimulados con PHA, células peritoneales de ratón, células de médula ósea de ratón; y células inmunes tumorales (Tabla 1). Además tienen la capacidad de inhibir células no inmunes, como el fibrosarcoma MCG4 y carcinoma de Ehrlich (Tabla 1).

Como acabamos de indicar, la actividad del factor/es detectada en MCG3 es interespecífica, ya que actúan sobre células de ratón y humanas. Esta capacidad funcional sobre células normales y tumorales, inmunes y no inmunes, de ratón y humanas, nos hizo sospechar la posibilidad de que estos factores pudieran ser moléculas fisiológicas, reguladoras del crecimiento celular.

Por otra parte, desde el punto de vista bioquímico, los factores activos del MCG3 tienen caracter lipídico (FLIPC: Factores lipídicos inhibidores de la Proliferación Celular), (Tabla 13, gráfica 9), hallazgo poco usual dentro de la literatura de los factores supresores detectados en tumores, pero que podría explicar la falta de especificidad por un tejido o especie como acabamos de comentar.

Aunque hemos creído conveniente seguir un orden cronológico en la exposición de los resultados, la discusión de los mismos nos permite alterar este orden, por lo que comentaremos primero los aspectos técnicos de la caracterización bioquímica y después hablaremos de la funcionalidad, posible mecanismo de actuación y las implicaciones fisiopatológicas de los factores caracterizados.

CARACTERIZACION DEL FACTOR/ES INHIBIDOR
DEL EXTRACTO DE MCG3

La mayor parte de los factores inhibidores detectados en células tumorales tienen carácter protéico (vease introducción) y ésta fue la idea inicial con la que comenzamos a caracterizar el factor activo del extracto de MCG3. También por esta razón, la actividad se expresó inicialmente en función de la concentración de proteínas en el cultivo celular. Además desarrollamos el parámetro actividad específica (A.E.) que nos permitiría conocer, matemáticamente, el enriquecimiento de la actividad del extracto al ir purificando y por tanto, progresivamente disminuyendo en éste la concentración de proteínas (vease material y métodos). No obstante, también desarrollamos el parámetro actividad absoluta (A), que nos expresa de una forma total la actividad del extracto en función del volumen del mismo (que se mantuvo constante a lo largo de todos los pasos de purificación), sin tener en cuenta las concentraciones de proteínas o lípidos (Material y métodos).

Ante la posibilidad de que el extracto pudiera contener enzimas proteolíticas u otras sustancias citotóxicas, todos los cultivos realizados fueron observados microscópicamente. En todas las experiencias realizadas, la actividad del extracto fue citostática y nunca citotóxica. La falta de citotoxicidad del extracto queda totalmente evidenciada en los resultados presentados en la Tabla 16, Gráfica 12, donde observamos que frente a células frescas de Ehrlich, el extracto fue inactivo.

El primer paso en la purificación del factor/es inhibidor fue determinar su termoestabilidad, calentando a 70°C durante 30 minutos. Al observar que la actividad se mantenía (Tabla 2), supusimos que el factor activo era una proteína, no compleja, de un peso molecular no muy elevado.

La actividad absoluta, sobre células de médula ósea, del extracto crudo (E) y el calentado (E70) fue equivalente (Gráfica 1), lo que nos indica que al calentar no hubo una pérdida significativa del factor activo. Sin embargo, la actividad específica de E70 ($A.E_{E70} = 625 \text{ u50/mg}$) no fue muy superior a la de E ($A.E_E = 415 \text{ u50/mg}$), determinando un incremento

relativo (I.R.= 1'5) no muy elevado (Gráfica 1). Esto se debió a que no hubo una pérdida muy intensa de proteínas tras el calentamiento (aproximadamente un 33%).

Observamos a continuación que el factor activo era fácilmente dializable, bien de una forma pasiva (Tabla 4) o activa (Tabla 6, Gráfica 3). El realizar la diálisis a vacío nos permitió estudiar el líquido transudado (E70DV), confirmándose la presencia de actividad inhibidora en éste (tabla 6, Gráfica 3). Esto nos permitía concluir en primer lugar, que la molecula/s activa tenía un peso molecular inferior a 12.000 Daltons (peso molecular máximo dializable por la membrana utilizada). En segundo lugar, comprobamos que la actividad del factor/es inhibidor no disminuía al ser dializado; es decir, que el factor/es dializable conservaba toda la actividad inhibidora.

Comprobamos también que la solución que quedaba en la membrana después de la diálisis (E70NDV), tenía una actividad residual muy inferior a la del E70DV (Tabla 6, Gráfica 3). Probablemente, correspon-

día a factor activo que no había podido salir, debido a la hiperosmolaridad desarrollada en E70NDV. Pensamos añadir agua a la membrana para descender la osmolaridad y seguir dializando hasta que E70DNV perdiera toda su actividad, pero desechamos la idea ya que el objetivo esencial de estas experiencias era demostrar que el factor activo era totalmente dializable y esto, ya se había demostrado con los resultados expresados en la Tabla 4.

Estos resultados nos sugerían la posibilidad de que la molécula activa fuera un péptido de bajo peso molecular, por lo que el siguiente paso fue tratar el extracto con enzimas proteolíticas.

Aunque los enzimas empleados (tripsina y proteasa) estaban unidos a polímeros insolubles que permitían eliminarlos por centrifugación después de la reacción enzimática, decidimos usar solución de albúmina bovina como control, para determinar la posible citotoxicidad de la técnica utilizada.

La albúmina tratada con enzimas proteolíticos no inhibió la proliferación de A1, por lo que el procedimiento de proteólisis en sí, fue inocuo para la



célula (Tabla 11B). Sin embargo, la actividad inhibidora de E, no varió tras el tratamiento con los enzimas (Tabla 11B), lo que nos indicaba que el factor activo no era sensible a la acción de esos enzimas proteolíticos. Estos datos nos hicieron dudar del carácter peptídico del factor inhibidor.

Se pensó entonces que los responsables de la inhibición de la captación de timidina y uridina tritiadas pudieran ser la timidina y uridina "frias", contenidas en el extracto del tumor, que competirían con las homólogas marcadas, para incorporarse a las células en crecimiento. Esta idea se desechó ya que en la observación microscópica rutinaria de los cultivos celulares, para detectar cualquier efecto citotóxico, comprobamos que había un descenso real de la población celular en los cultivos que llevaban extracto, en comparación con los cultivos controles. Incluso llevamos a cabo varios experimentos paralelos, en los que se hacía un contaje de células en cultivos con y sin extracto, encontrando que en los primeros el número de células era menor que en los segundos (resultados no presentados). También los resultados de la Tabla 16, Gráfica 12, confirman la ausencia de timidina fria del extracto, ya que éste no pudo inhibir

la captación de timidina tritiada por las células frescas del tumor de Ehrlich; si el extracto hubiera contenido timidina fría, se habría producido un efecto inhibitor por competición entre la timidina fría y la marcada.

Finalmente, la solubilidad de los factores activos del extracto en cloroformo, hace muy poco probable su relación con sustancias de la polaridad de la timidina y uridina.

Las poliaminas son moléculas con capacidad de inhibir la proliferación celular (HIGGINS y col., 1969). Aunque son sintetizadas por las células normales, algunas células tumorales las sintetizan en elevadas concentraciones (RUSSEL, 1973).

La solubilidad de los factores en cloroformo, hace muy poco probable la identificación de éstos con poliaminas; no obstante, para descartar esta posibilidad, cultivamos las células a estudiar con sueros procedentes de animales no ruminantes (suero de caballo y humano). Estos sueros carecen de poliaminaoxidasas (BACHRACH, 1970), enzima necesaria para la activación de las poliaminas. Si los factores activos fueran poliaminas, su actividad hubiera desaparecido al

actuar sobre células cultivadas con sueros carentes de poli-aminooxidasa. Sin embargo, la actividad inhibidora del extracto se mantuvo en todos los casos (Tabla 18, Gráfica 13). Estos resultados nos permiten concluir que los factores inhibidores del extracto de MCG3 no son poliaminas.

Llegados a este punto, nos planteamos la posibilidad de que el factor/es inhibidor del extracto de MCG3 pudiera tener carácter lipídico, por lo que procedimos a trabajar en este sentido.

En primer lugar, encontramos que la actividad inhibidora era retenida en la fase soluble después de tratar E70 con etanol. La fracción precipitada había perdido toda actividad (Tabla 12, Gráfica 8). La solución de albúmina tratada con etanol no inhibió la captación del isótopo, lo que nos permitió excluir la posible toxicidad de la técnica.

La fase soluble mezclada con cloroformo, determinó a su vez una fase acuosa y una fase orgánica. La actividad se perdió en la primera fase y quedó retenida en la segunda (Tabla 13, Gráfica 9). Estos re-

sultados confirmaban el carácter lipídico del factor/es activo del extracto de MCG3 (FLIP: Factores lipídicos inhibidores de la proliferación celular). Observamos también en estas experiencias, empleando una solución control de albúmina bovina, que el procedimiento no fue tóxico para las células ya que esta solución control tratada con cloroformo, no inhibió las células estudiadas (Tabla 13, Gráfica 9).

El cálculo de la actividad absoluta del extracto lipídico de MCG3 sobre médula ósea dió un valor (1.481 U50/ml) (Gráfica 10) aproximado al de la actividad total de E (1.438 U50/ml) y E70 (1.417 U50/ml) (Gráfica 1). Esto nos indica que en los procesos de extracción, apenas hubo pérdida de FLIPC.

La separación del extracto lipídico mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando un sistema polar de disolventes, Cloroformo: Metanol: Agua (60: 38: 8), evidenció al probar con células de médula ósea y células tumorales P815X2, dos picos importantes de actividad; un primero (I) de $Rf_{100} = 0 - 3$ y un segundo (II) de $Rf_{100} = 29 - 46$ (Gráfica 14), lo que nos demostraba la relación de factores activos con lípidos de elevada polaridad. La definición de estos dos picos no es ocasional ni casual, pues no sólo se probó su acti-

vidad con las células citadas sino con otras células distintas (A1 y MCG3), confirmándose su presencia (resultados no presentados). La CCF se repitió en tres experimentos independientes y los picos de actividad mantuvieron los Rf_{100} apuntados anteriormente.

El amplio rango de Rf_{100} del pico II = 29-46 (que incluye 3 cm de la placa cromatográfica) sugiere la presencia de más de un tipo de lípidos, probablemente una familia de ellos. El pico I tiene un valor Rf_{100} más restringido (0 - 3, correspondiente a 1 cm de placa), por lo que no podemos asegurar lo mismo que en el caso anterior.

Al revelar la placa con vapor de yodo o ácido sulfúrico, aparecieron una serie de bandas (Gráfica 14), una de ellas coincidía con el pico I y la otra con el II, aunque no en la zona de máxima actividad.

No podemos afirmar si las bandas detectadas corresponden a los lípidos con actividad inhibidora, sobre todo en el caso del pico II, donde, según hemos señalado, deben de haber varias sustancias activas independientes.

El hecho de que estos lípidos no hayan podido detectarse por vapor de I_2 ó H_2SO_4 , nos indica que se encuentran en concentraciones muy bajas.

Con los resultados presentados en la Gráfica 14, tampoco podemos evidenciar el tipo de lípidos que han sido separados.

Numerosos trabajos han demostrado que los tumores secretan prostaglandinas (PG) en elevada concentración, principalmente PGE (HUMER y STRAUSSER, 1974, HAMMARSTRONL, 1982). Se ha observado que la PGE tiene un efecto inmunosupresor (BOCKMAN y ROTHSCHILD, 1979) e inhibidor de la mielopoyesis (PELNS, 1982). Tanto PGE como PGA tienen capacidad para inhibir células tumorales (TURNER y col., 1982; MAYSCHAK y col., 1982); por tanto, el efecto inhibidor de éstas PG es equivalente al de los factores activos del extracto de MCG3.

Sin embargo, la separación cromatográfica nos señala que no hay relación de estos factores, al menos, con las PGE_1 , E_2 , A_1 y $F_{2\alpha}$, ya que estas se encuentran dentro de un rango de $Rf_{100} = 59 - 80$, muy distinto al de los picos I y II (Gráfica 14). Por otra parte, al teñir la placa cromatográfica con una solución de acetato cúprico, específico para PG (GREEN y SAMUELSSON, 1964) no se observó ninguna banda visible, lo que nos aseguraba la carencia de concentraciones apreciables de Rf_{100} en el extracto lipídico.

Tampoco hubo coincidencia de los dos picos de actividad con los estándares de colesterol ($Rf_{100} = 90$),

aldosterona y cortisona ($Rf_{100} = 92$). Por tanto, los resultados aportados no nos han permitido una caracterización adecuada del FLIPC. No obstante, al consultar la literatura relacionada con este campo, hemos encontrado que lípidos polares como los gangliósidos (GM_1 , GM_2 y GM_3), separados en condiciones equivalentes a las nuestras (KRISHNARAJ y col., 1982), presentan unos $Rf_{100} = 26-42$, equivalentes al Rf_{100} del pico II. Desgraciadamente, nosotros no pudimos disponer de los estándares de gangliósidos, por lo que no podemos afirmar las coincidencias de ambos Rf_{100} en nuestro sistema.

Ratones portadores de un tumor y pacientes humanos, presentan elevados niveles circulantes de gangliósidos (KLOPPEL y col., 1977; PORTOVKALIAN y col., 1978). También se han detectado altos niveles séricos de gangliósidos en ratones con linfoma tímico (equivalente al MCG3) (KRISHNARAJ y col., 1982). Por otra parte, se ha demostrado que estos lípidos tienen un efecto inmunosupresor (LENGLE y col., 1979).

Todas estas observaciones hacen a los gangliósidos candidatos idóneos, para ser identificados con la familia de lípidos inhibidores, incluidos en el pico II. El estudio de esta posible identidad, será llevado a cabo en futuras experiencias.

GARCIA-OLIVARES y RODRIGUEZ-VEDIA (1984), han demostrado, estudiando el fluido ascítico libre de células inducido por el MCG3, al ser inoculado intraperitonealmente, factores de carácter lipídico equivalentes a los FLIPC detectados por nosotros en el extracto de MCG3. Esto nos indica que el tumor los libera al medio extracelular. Sin embargo, estos factores no pudieron ser dializados del fluido ascítico, en contraste con los resultados comentados anteriormente, en donde se manifestó que los FLIPC del extracto de MCG3 eran completamente dializables (Tabla 4, Tabla 6, Gráfica 3). Es probable, que los factores lipídicos, tras ser secretados por MCG3 se unan en el fluido ascítico a una proteína transportadora, formando una lipoproteína no dializable.

WOLF y col., (1981) han encontrado, en el suero de pacientes de linfoma cutáneo (linfoma T), un factor lipídico (SIF: Soluble inhibitory factor) con actividad inmunosupresora. El SIF también ha sido detectado en el sobrenadante del cultivo de un coriocarcinoma (WOLF y col., 1983). En condiciones normales parece ser secretado por células T (WOLF y col., 1978; WOLF y MERLER, 1979; WOLF y ANDREONI, 1982). La sepa-

ración cromatográfica del SIF, en condiciones equivalentes a las muestras, da un Rf_{100} alrededor de 32, cercano por tanto, al de los factores lipídicos que integran el pico II.

El SIF, probablemente de forma equivalente del FLIPC, se ha evidenciado que en el suero es transportado por una proteína de alrededor de 150.000 de peso molecular.

El hecho de que el SIF tenga también actividad inhibidora sobre la proliferación de células inmunes y no inmunes, igual que el FLIPC, hace sospechar cierta relación del SIF humano, al menos, con los lípidos murinos que componen el pico II.

MECANISMO DE ACCION. POSIBLE FUNCION BIOLOGICA

El determinar el mecanismo de acción del FLIPC se sale de los objetivos planteados en esta tesis y constituirían materia de futuras investigaciones. No obstante, en experimentos desarrollados en nuestro laboratorio, hemos podido observar que la acción del FLIPC parece ser irreversible ya que linfocitos humanos, tratados durante 24 h. con el extracto lipídico de MCG3 y posteriormente lavados, al ser estimulados con PHA, su síntesis de DNA fue inferior que la de los controles. Esto indicaría, bien que el FLIPC, después de actuar sobre la célula induce en ésta variaciones metabólicas irreversibles, o bien que podría conectar irreversiblemente con un hipotético receptor celular, produciendo un efecto inhibitor continuado sobre la proliferación celular.

El carácter lipídico del FLIPC le permitirá penetrar en el interior de la célula para desarrollar su actividad, pero no hay que olvidar, según se aclaró anteriormente, que al ser secretado el FLIPC por el MCG3, parece unirse a una macromolécula transportadora, por lo que también podría actuar sobre un receptor de membrana específico para esta macromolécula.

En relación con su efecto sobre la síntesis de DNA y RNA, ambos efectos inhibidores, parecen ser paralelos a lo largo de todos los resultados presentados, por lo que es probable que se deban a un único mecanismo de acción. Un bloqueo de la fase G_1 del ciclo, inhibiría la síntesis de RNA, que ocurre en gran intensidad durante esta etapa, pero también bloquearía la síntesis de DNA, al no permitir que las células llegaran a la fase S. A pesar de todo, esta posibilidad es especulativa y no podrá ser determinada hasta futuras experiencias.

En los resultados presentados anteriormente, se evidencia que los FLIPC no son inmunoespecíficos, ya que no solo inhiben células de origen inmune o hematopoyético, sino además otras células no inmunes (Tablas 1 y 2). Tampoco los FLIPC son especieespecíficos, ya que hemos observado que actúan sobre células de ratón y humanos (Tablas 1, 2 y 17).

Esta falta de especificidad para células inmunes y para células de la propia especie, es debido probablemente a su carácter no protéico. Otras sustan-

cias no protéicas inhibitoras del crecimiento celular, como son las prostaglandinas y las poliaminas, también carecen de inmunoespecificidad y especieespecificidad (TABOR y TABOR, 1976; SAMUELSSON y col., 1979).

Pero igual que las poliaminas y prostaglandinas son consideradas como factores reguladores del crecimiento celular (SMITH y col., 1983; TURNER y col., 1982; PELUS, 1982) FLIPC también podría serlo. Los resultados comparativos de inhibición de células de médula ósea y células tumorales, así parecen confirmarlo.

En la Tabla 7, Gráfica 4, se observa como con cantidades de extracto crudo (E) inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$, la inhibición de la síntesis de DNA por las células de médula ósea es significativamente mas alta que la inhibición en diversas células tumorales. Esta diferencia se mantuvo, incluso con cantidades tan pequeñas como 1'25 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$, no hubo diferencia entre células de médula ósea y células tumorales; es de suponer que a concentraciones inferiores a 1'25 $\mu\text{g/ml}$, estas diferencias también desaparezcan.

Al comparar la actividad absoluta de E, sobre células de médula ósea y sobre diversas células tumorales vemos que la primera es sensiblemente superior a las

segundas (Gráfica 4), lo que nos indica que los FLIPC son menos activos sobre células tumorales que sobre células de médula ósea.

Resultados equivalentes se obtuvieron al estudiar este fenómeno referido a la captación de Uridina-³H (Tabla 8, Gráfica 5).

En relación con el extracto calentado a 70°C (E70), la diferencia en cuanto a su efecto sobre la síntesis de DNA en células de médula ósea y células tumorales, se evidenció con dosis inferiores a 12 µg/ml y se mantuvo hasta dosis tan bajas como 3 µg/ml. Por encima de 12 µg/ml no hubo una diferencia significativa (Tabla 9, Gráfica 6).

Con el extracto lipídico de MCG3 encontramos que las diferencias aparecían con 9 µg/ml, no detectándose por encima de esta concentración y desapareciendo con 0'9 µg/ml (Tabla 14, Gráfica 10).

Todos estas diferencias se amplifican, si tenemos en cuenta que el número de células de médula ósea es 8 veces el de células tumorales (ver material y métodos).

Estos resultados sugieren que los FLIPC son factores reguladores del crecimiento celular. Las células tumorales tendrían un mecanismo defectuoso (receptores alterados o alteración de los procesos bioquímicos) que le impediría ser inhibidas apropiadamente por FLIPC y este defecto podría contribuir a la situación de crecimiento incontrolado que caracteriza a estas células.

Las curvas de inhibición comparativa que hemos comentado, nos indican que FLIPC, probablemente, actúa a nivel fisiológico, dentro de unos márgenes de concentración en los cuales la inhibición de la célula normal supera a la inhibición de la célula tumoral (por ej. de 9 a 0.9 $\mu\text{g/ml}$ del extracto lipídico).

FLIPC, se ajusta al concepto de los que BURTON (1975) denominó sustancia clave (key substance) responsable de la inhibición por contacto. No obstante, sería simplista suponer que FLIPC sea la única responsable de un fenómeno tan complejo como es la inhibición por contacto, pues otros factores como variación de pH, Na^+ y K^+ , así como las poliaminas y prostaglandinas podrían intervenir.

También las Chalonas (BULLOGS, 1973) podrían intervenir en el proceso de regulación celular, aunque el tejido especificidad que presentan estas sustancias, contrasta con la inespecificidad de las apuntadas anteriormente.

A pesar de todo lo dicho, si admitimos que FLIPC es un factor fisiológico regulador del crecimiento celular, sería lógico detectarlo en tejido normales. Aunque en nuestro laboratorio no ha podido ser detectado en suero normal de ratón (GARCIA-OLIVARES y RODRIGUEZ-VEDIA, 1984), en el extracto lipídico de bazo, pero en menor concentración que en MCG3, se detecta actividad inhibidora de la síntesis de DNA (Tabla 19, Gráfica 15). Este extracto lipídico de bazo está siendo estudiado y mediante separación cromatográfica, se han obtenido picos de actividad equivalentes a los del MCG3 (GARCIA-OLIVARES, D., Tesina de Licenciatura en preparación).

El SIF, detectado en humanos, que suponemos que está relacionado con el FLIPC de ratón, ha sido encontrado también en otros tejidos normales (WOLF y col., 1978).

Según todo lo dicho, los FLIPC serían secretados por la célula, probablemente al proliferar, y mediante un mecanismo feed-back, regularían esta proliferación celular; si esta célula se transforma neoplásicamente,

al proliferar intensamente, secretaría una gran cantidad de FLIPC, junto quizá con otros factores como poliaminas y prostaglandinas, pero al tener un mecanismo defectuoso de inhibición, estas células no regularían su crecimiento adecuadamente (algo semejante ocurre en algunos tumores endocrinos en relación con la secreción de la hormona).

A pesar de todo, si los tumores sintetizan gran cantidad de FLIPC, cabría esperar una cierta regulación celular, pues en nuestros resultados se apreció una apropiada inhibición de las células tumorales con elevadas concentraciones de extracto.

Las experiencias llevadas a cabo por nosotros, se han realizado en su mayor parte con células cultivadas durante largo tiempo. Sin embargo, cuando trabajamos con células tumorales "frescas", extraídas directamente del ratón, la inhibición por FLIPC fue aún menor (Tabla 15, Gráfica 11; Tabla 16, Gráfica 12). Estos resultados indicarían que "in vivo" los tumores son menos susceptibles de regular su crecimiento, y explicaría por qué éstos, incluso secretando grandes cantidades de FLIPC, progresan "in vivo".

En la Tabla 16, Gráfica 12, se observa que la actividad, inhibidora de FLIPC es nula para las células frescas de carcinoma de Ehrlich. Esto aclararía la alta tumorigenicidad de este carcinoma, que se ha observado crece en el ratón, incluso sin tener en cuenta las barreras de histocompatibilidad.

LIV y col. (1977), han demostrado que las células tumorales cultivadas son menos tumorigénicas que las crecidas "in vivo". Quizá se deba, como ya hemos visto, a que las células cultivadas son mas regulables por FLIPC que las crecidas "in vivo".

Por tanto, los portadores avanzados de un tumor presentan altos niveles de FLIPC (GARCIA-OLIVARES y RODRIGUEZ-VEDIA, 1984) que no pueden controlar la proliferación de las células anómalas, pero sí pueden tener un intenso efecto inhibitor sobre células normales de elevada proliferación celular como son las hematopoyéticas. Las consecuencias ya han sido comentadas en la introducción: Anemias e Inmunosupresión.

El embarazo es una situación fisiológica donde, debido a la intensa proliferación celular existente, de forma equivalente a las neoplasias, cabe esperar una elevada secreción de FLIPC. Al igual que en las neoplásias,

se ha observado en el embarazo, anemia e inmunosupresión (TOMAS, 1978; PESSINA y col., 1982) que podrían explicarse en parte, por un exceso en la secreción de FLIPC.

No queremos concluir esta discusión sin comentar la relación del FLIPC, y su probable equivalente humano el SIF, con las células T.

El FLIPC ha sido detectado en el MCG3, que es un linfoma T. Apuntamos anteriormente que el FLIPC, al menos el pico II hallado en la cromatografía, podría estar relacionado con gangliósidos, que presentan actividad inmunosupresora y son encontrados, en elevadas concentraciones, en el suero de ratones de leucemia tímica (KRISHNARAJ y col., 1982). Por otra parte, el SIF fue detectado en altas dosis en el suero de pacientes con linfoma cutáneo (linfoma T) (WOLF y col., 1981) y se ha observado que es secretado por los linfocitos T periféricos normales proliferantes (WOLF y col., 1978; SALINAS-CARMONA y col., 1982).

La relación de estos factores inhibidores con las células T, podría sugerir su identificación con lin-

foquinas u otros factores secretados por células T con actividad inmunosupresora. Esta actividad podría estar dirigida especialmente a la regulación de la proliferación de células de médula ósea, lo que explicaría su especial actividad, observada en nuestros resultados, sobre estas células. Esto además, coincidiría con los resultados aportados por diversos autores que evidencian una regulación de las células hematopoyéticas por parte de las células T (TRUCCO y col., 1984).

Resumiendo, o aceptamos lo discutido anteriormente, donde consideramos a FLIPC como factores reguladores del crecimiento celular secretados en elevadas concentraciones por un tumor, o admitimos esta última proposición considerando al FLIPC como una linfoquina inmunosupresora.

Hay una serie de datos, algunos de ellos ya comentados, que nos inclinan a quedarnos con la primera proposición. En primer lugar, ya quedó demostrada la falta de especificidad por células inmunes de FLIPC. El SIF, carece también de especificidad por células inmunes y puede inhibir también fibroblastos (WOLF y col., 1978). En segundo lugar, el FLIPC no sólo ha sido detectado en MCG3, sino también parece estar presente en el mastocitoma P815X2

y el plasmocitoma A1 (Tabla 10). En relación con el SIF, ha sido detectado en el sobrenadante del cultivo de fibroblastos humanos (WOLF y col., 1978) y en el sobrenadante de cultivo de un coriocarcinoma humano (WOLF y col., 1983). Tanto en un caso como en otro, vemos como estos factores lipídicos, están ampliamente distribuidos por diversos tipos de tejidos, donde contribuyen a la regulación del crecimiento celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El extracto crudo de MCG3 contiene factores que inhiben la proliferación celular.
- 2.- Estos factores han sido caracterizados como lípidos polares (FLIPC).
- 3.- Los FLIPC no son específicos de células inmunes, ni especieespecíficos.
- 4.- Estos factores actúan controlando el crecimiento celular y presentan menor actividad reguladora sobre células tumorales que sobre células normales.

BIBLIOGRAFIA



ABELEV, G.I., PEROVA, S.D., KHRAMKOVA, N.I., POSTNIKOVA, Z.A. and IRLIN, I.S. (1963): Production of embryonal alfa-globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplantation, 1, 174-180.

ABELL, C.W. and MONAHAN, T.M. (1973): The role of adenosine-3'5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. J. Cell. Biol., 59, 549- 565.

ABERCROMBIE, M. and HEAYSMAN, J.E.M. (1964): Observations on the social behaviour of cells in tissue culture, II. "Monolayering" of fibroblasts. Exp. Cell. Res., 6, 293-306.

AGLIETTA, M., PIACIBELLO, W. and GAVOSTO, F. (1983): Responsiveness to prostaglandin E₁ of different subtypes of normal and pathological committed granulomonopoietic precursors. Acta Haemat., 69, 376-381.

ALBINO, A.P., LLOYD, K.O., HOUGHTON, A.N., OETTGEN, H.F. and OLD, L.J. (1981): Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different meloma metastases of the same patients. Implications for the study of tumor antigens. J. Exp. Med., 154, 1764-1778.

ALLAVENA, P., INTRONA, M., MANGIONI, C. and MANTONAVI, A. (1981): Inhibition of natural killer activity by tumor associated lymphoid cells from ascites ovarian carcinomas. J. Natl. Cancer Inst., 67, 319-325.

AOIKI, T., STEPHENSON, J.R. and AARONSON, S.A. (1973): Demonstration of a cell-surface antigen associated with murine sarcoma virus by immunoelectron microscopy. Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 742-746.

BACHRACH, V. (1970): Oxidized polyamines. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 939-946.

BALDWIN, R.W. and EMBLENTON, M.J. (1974): Neoantigens on spontaneous and carcinogen-induced rat tumours defined by in vitro lymphocytotoxicity in assays. Int. J. Cancer, 13, 433-443.

BALDWIN, R.W. and PRICE, M.R. (1975): Neoantigen expression in chemical carcinogenesis. Cancer comprehensive treatise. I. pp 345. Becker (ed.). Plenum Press. N.Y.

BALDWIN, R.W., PRICE, M.R. and ROBINS, R.A. (1973): Inhibition of hepatoma immune lymph node cell cytotoxicity by tumour bearing serum solubilised hepatoma antigen. Int. J. Cancer, 11, 527-533.

BARANSKA, W., KOLDOSKY, P. and KOPROWSKY, H. (1970): Antigenic study of unfertilized mouse eggs: cross-reactivity with SY-40-induced antigens. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 67, 193-197.

BASERGA, R. (1965): The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: a review. Cancer Res., 25, 581-595.

BASERGA, R. (1976): Multiplication and division in mammalian cells. pp. 53-77. N.Y. Marcel Dekker.

BERENBLUM, I. (1982): Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin. In Cancer: A comprehensive treatise. Vol. 1. Second edition. pp. 451-484. Becker. FF (ed.). N.Y. Plenum Press.

BISHOP, J.M. (1982): Oncogenes. Investigacion y Ciencia, N° 68, 52-64.

BOCKMAN, R.S. and ROTHSCHILD (1979): A possible mechanism of monocyte modulation of clonal expansion. J. Clin. Invest., 64, 812-819.

BOUTWELL, R.K., VERMA; A.K., ASHENDEL, C.L. and ASTRUP, E. (1982): Mouseskin: a useful model system for studying the mechanism of chemical carcinogenesis. Carcinog. Compr. Surv., 7, 1-12.

BOYUM, A. (1968): "Separation of leucocytes from blood en bone marrow". Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, 51-70.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

BRAWN, R.J. (1970): Possible association of embryonal antigen(s) with several primary 3-metyl-cholanthrene induced nurine sarcomas. Int. J. Cancer, 6, 245-249.

BROOKS, R.F., BENNETT, D.C. and SMITH, J.A. (1980): Mammalian cell cycles need two random transitions. Cell, 19, 493-504.

BROWN, R.E., STEELE, R.W., MARMER, D.J., HUDSON, J.L. and BREWSTER, M.A. (1983): Fatty acids and the inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation by leukemia serum. J. Immunol., 131, 1011-1016.

BULLOUCH, W.S. (1962): The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol. Rev., 37, 307-342.

BURNET, F.M. (1970): Immunological surveillance. Pergamon Press.

BURTON, A.C. (1975): The role of biochemical rhythms in contact inhibition of cellular division. In: Cellular Membranes and Tumor Cell Behaviour. pp. 249-266. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. USA.

CALDERWOOD, M.B., FORBES, J.T. and SMITH, R.T. (1981): Immune response to chemically induced tumours: correlation of responding cell class with "in vivo" inhibition of tumour growth. Br. J. Cancer, 43, 505-516.

CARPENTER, G. and COHEN, S. (1979): Epidermal growth factor. Annu. Rev. Biochem., 48, 193-216.

CHANG, K.S., LAW, L.W. and APELLA, E. (1975): Distinction between tumor specific transplantation antigen and virion antigen in solubilized products from membranes of virus induced leukemic cells. Int. J. Cancer, 15, 483-492.

CHENG, Y.S.E and CHEN, L.B. (1981): Detection of phosphotyrosine-containing 34.000 dalton protein in the framework of cells transformed with Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 2388-2392.

CHERESH, D.A., DISTASIO, J.A., VOGEL, C.L. and LOPEZ, D.M. (1982): Mitogen-induced blastogenesis and receptor mobility inhibition by breast cancer serum with elevated orosomucoid (alfa₁-acid glycoprotein) levels. J. Natl. Cancer inst., 68, 779-783.

CHEUNG, W.Y. (1980): Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science, 207, 19-27.

CHISM, S., BURTON, R. and WARNER, N.L. (1975): Lymphocyte activation in vitro to murine onco-foetal antigens. Nature, 257, 594-596.

COFFINO, P., BOURNE, H.R., FRIEDRICH, U. (1976): Molecular mechanisms of cyclic AMP action: a genetic approach. Recent. Prog. Horm. Res., 32, 669-684.

COGGIN, J.H. and ANDERSON, N.G. (1974): Cancer, differentiation and embryonic antigens: some central problems. Adv. Cancer Res., 19, 105-165.

COHEN, S. (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J. Biol. Chem., 237, 1555-1562.

COHEN, S. (1983): The epidermal growth factor (EGF). Cancer, 51, 1787-1791.

COHEN, S. and CARPENTER, G. (1975): Human epidermal growth factor: Isolation and chemical and biological properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 1317-1321.

- COLBURN, N.H. (1980): Tumor promotion and preneoplastic progression. Carcinog. Compr. Surv., 5, 33-56.
- CURRIE, G.A. and ALEXANDER, P. (1974): Spontaneous shedding of TSTA by viable sarcoma cells: its possible role in metastatic spread. Br. J. Cancer, 29, 72-75.
- CURRIE, G.A. and BASHAM, C. (1972): Serum mediated inhibition of the immunological reaction of the patient to his own tumour: a possible role for circulating antigen. Br. J. Cancer, 26, 427-438.
- DAINIYAK, N., KULKARNI, U., HOWARD, D., KALMANTI, M., DEWEY, M.C. and HOFFMAN, R. (1983): Mechanisms of abnormal erythropoiesis in malignancy. Cancer, 51: 1101-1106.
- DE LEO, A.B., SHIKV, H., TAKAHASHI, T., JOHN, M. and OLD; L.J. (1977): Cell surface antigens of chemically induced sarcoma of the mouse. I. murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblast and sarcoma cells: Description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. J. Exp. Med., 146, 720-734.
- DE LUSTRO, F. and ARGYRIS, B.F. (1976a): Mechanism of mastocytoma mediated suppression of lymphocyte reactivity. J. Immunol., 117, 2073-2080.

- DE LUSTRO, F. and ARGYRIS, B.F. (1976b): Mastocytoma--mediated suppression of mixed lymphocyte culture and mitogen responsiveness. Cell Immunol., 21, 177-184.
- DIAMANTSTEIN, T. and ULMER, A. (1975): The antagonistic action of cyclic GMP and cyclic AMP on proliferation of B and T lymphocytes. Immunology, 28, 113-119.
- EAGLE, H., FOLEY, G.E., KOPROWSKI, H., LAZARUS, H., LEVINE, E.M. and ADAMS, R.A. (1970): Growth characteristics of virus-transformed cells. J. Exp. Med., 131, 863-879.
- ECKNER, R.J. and STEEVES, R.A. (1972): A classification of the murine leukemia viruses. Neutralization of yseudotypes of friend spleen focus-forming virus by type-specific murine antisera. J. Exp. Med., 136, 832-850.
- EK, B., WESTERMARK, B., WASTERSON, A. and HELDIN, C. (1982): Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. Nature, 295, 419-420.
- EPIFANOVA, O.I. (1977): Mechanisms underlying the differential sensitivity of proliferating and resting cells to external factors. In Intern. Rev. of Cytol. Suppllem. F. pp. 303-335. N.Y. Academic Press.

ERICKSON, R.L., PURCHIO, A.F. ERICKSON, E., COLLETT, M.S. and BRUGGE, J.S. (1980): Molecular events in cells transformed by Rous sarcoma virus. J. Cell. Biol., 87, 319-325.

ESSEX, M. (1977): Horizontal transmission of feline leukaemia virus under natural conditions in a feline leukaemia cluster household. Int. J. Cancer, 19, 90-98.

EVANS, D.L., FRANK, M.K., MCKINNON, K.P. and CERRONE; M.C. (1981): Suppression of mitogen-and tumor-cell-induced lymphocyte stimulation by tumor-associated fetal antigens. Cell Immunol., 57, 155-174.

FINK, M., SNELL, G.D. and KELTON, D. (1953): Demonstration of antibody in strain BALB/c mice to homologous tumour S621 by the use of two techniques-anaphylaxis and tumor regression. Cancer Research, 13, 166-179.

FLEXMAN, J.F. and SHELLMAN, G.R. (1980): Factors affecting stimulation of natural cytotoxicity to a rat lymphoma by "Corynebacterium Parvum". J. Cancer, 42, 41-51.

FOLEY, E.V. (1953): Antigenic properties of methylcholantrene-induced tumors in mice of strain of origin. Cancer Res., 13, 853-862.

FUJIMOTO, J., GREENE, M.I. and SEHON, A.H. (1976): Regulation of the immune response to tumor antigens. Immunosuppressor cells in tumor bearing host. J. Immunol., 116, 791-799.

GARCIA-OLIVARES, E. and GARRIDO, F. (1978): Membrane antigens recognized by heteroantisera against mouse tumours, tested in cell lines of different H-2 haplotypes. Journal of Immunogenetic, 5, 313-322.

GARCIA-OLIVARES, E. and GARRIDO, F. (1980): Selective protection in BALB/c mice against Meth A sarcoma induced by normal allogeneic tissues from H-2 congenic mice. Rev. Esp. Fisiol., 36, 215-216.

GARCIA-OLIVARES, E., TORRES, M.D., GUTIERREZ, F. and OSORIO, C. (1982a): Relationship between foreign H-2-like antigens on MCG4 and the "in vivo" rejection of this tumour by syngeneic and semisyngeneic mice. Rev. Esp. Fisiol., 38, 9-12.

GARCIA-OLIVARES, E., GUTIERREZ, F. and OSORIO, C. (1982b): Immunochemical characterization of foreign H-2-like antigens expressed by a methyl-cholanthrene-induced sarcoma. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 133C, 377-381.

GARCIA-OLIVARES, E. and RODRIGUEZ-VEDIA, N. (1984): Detection of a cell proliferation inhibiting factor detected in the cell free ascitic fluid of intraperitoneal mouse tumours. Oncology. En prensa.

GARRIDO, F., SCHIRRMACHER, V. and FESTENSTEIN, H. (1975): H-2-like specificities on foreign haplotypes appearing on a mouse sarcoma after vaccinia virus infection. Nature, 259, 228-230.

GLYNN, J.P., McCOY, J.L. and FERER, A. (1968): Cross-resistance to the transplantation of singeneic Friend Moloney and Raascher virus induced tumors. Cancer Res. 28, 434-439.

GOLD; P. and FREEDMAN, S.O. (1965): Specific carcinoembryonic antigen of the human digestive system. J. Exp. Med., 122, 467-481.

GONZALEZ, R. and VERLY, M.G. (1978): Purification of an inhibitor of DNA synthesis in mammary cells. Eur. J. Cancer, 14, 689-697.

GOSPODAROWICZ, D. (1975): Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J. Biol. Chem., 250, 2515-2520.

GOSPODAROWICZ, D., GREENBURG, G., BIALECKI, H. (1978): Factors involved in the modulation of cell proliferation "in vivo" and "in vitro": the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. In vitro, 14, 85-118.

GOSPODAROWICZ, D. and HANDLEY, H.H. (1975): Stimulation of division of Y1 adrenal cells by a growth factor isolated from bovine pituitary glands. Endocrinology, 97, 102-107.

GRANT, J.P., BIGNER, D.D., FISCHINGER, P.J. and BOLOGNESI, D.P. (1974): Expression of murine leukemia virus structural antigens on the surface of chemically induced murine sarcoma. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 5037-5041.

GREEN, K. and SAMUELSSON, B. (1964): Prostaglandins and related factors: XIX. Thin-Layer chromatography of protaglandins. J. Lipid. Res., 5, 117-120.

GREEN, S.S. and WISTAR, J.R. (1976): Characterization of lymphocyte inhibition by supernatants of crowded lymphocytoblasts. J. Immunol., 117, 1429-1433.

GREENGARD, P. (1978): Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science, 199, 146-152.

GREGORY, H. (1975): Isolation and structure of urogastone and its relationship to epidermal growth factor. Nature, 257, 325-327.

HADDEN, L.W. and HADDEN, E.H. (1972): Guanosine-3'-5'-cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3024-3027.

HADDOX, M.K., MAGUN, B.E. and RUSSELL, D.H. (1980): Differential expression of type I and type II cyclic AMP dependent protein kinases during cell cycle and cyclic AMP-induced growth arrest. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 3445-3449.

HAMLIN, J.L. and PARDEE (1978): Control of DNA synthesis in tissue culture cells. In Vitro, 14, 119-127.

HAMMARSTROM, S. (1982): Endogenous prostaglandin production and cell replication "in vitro". Prostaglandins and cancer: First International Conference. pp. 297-307. Alan R. Liss. N.Y.

HAURANI, F.I., YOUNG, K. and TOCATINS, L.M. (1963): Reutilization of iron in anemia complicating malignant neoplasms. Blood, 22: 73-81.

HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., 25, 585-621.

HAYWARD, W.S., NEEL, B.G. and ASTRAIN, S.M. (1981): Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in AVL induced lymphoid leukemia. Nature, 290, 475-480.

HEBERMAN, R.B. (1977): Immunogenicity of tumor antigens. Biochim. Biophys. Acta, 473, 93-112.

HEBY, O. (1983): Cell cycle phase specificity and therapeutic effectiveness of polyamine synthesis inhibitors. 13th International Cancer Congress, Part C. Biology of Cancer (2). pp. 189-198. Liss, A.R. N.Y.

HEBY, O., ANDERSSON, G. and GRAY, J.W. (1978): Interference with S and G₂ phase progression of polyamine synthesis inhibitors. Exp. Cell Res., 111, 461-464.

HELLMAN, S., BOTNICK, L.E., HANNON, E.C. (1978): Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 490-494.

HELLSTROM, K.E. and HELLSTROM, I. (1974): Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumour antigens. Adv. Immunol., 18, 209-277.

HIBBS, Fr, J.B. (1974): Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells "in vitro" by activated macrophages. J. Natl. Cancer Inst., 53, 1487-1492.

HIGGINS, M.L., TILLMAN, M.C., RUPP, J.P. and LEACH, F.R. (1969): Effects of polyamines on cell culture cells. J. Cell Physiol., 74, 149-154.

HIRATA, F. and AXELROD, J. (1980): Phospholipid methylation and biological signal transmission. Science, 209, 1082-1090.

HOLLENBERG, M.D. and CUATRECASAS, P. (1975): Insulin and epidermal growth factors: Human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and aminoacid uptake. J. Biol. Chem., 250, 3845-3853.

HOLLEY, R.W. (1972): A unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2840-2841.

HOOPER, D.C. and MURGITA; R.A. (1981): Regulation of murine T-cell responses to autologous antigens by alfa-fetoprotein. Cell. Immunol., 63, 417-425.

HOUCK, J.C. and ATTALAH (1975): Chalcones (Specific and endogenous mitotic inhibitors) and cancer. Vol. 3. pp. 287-326. Becker, F.F. (ed.). Plenum Press. N.Y.

HOWARD, P. and PELC, S.R. (1951): Nuclear incorporation of ^{32}P as demonstrated by autoradiographs. Exp. Cell Res., 2, 178-187.

HUMES, J.L. and STRAUSSER, H.L. (1974): Prostaglandins and cyclic nucleotides in moloney sarcoma tumors. Prostaglandins, 5, 183-196.

HUMPHREYS, S.R., GLYNN, J.P., CHIRIGOS, M.A. and GOLDIN, A. (1962): Further studies on the homograft response in BALB/c mice with L1210 leukaemia and a resistance sub-line. J. Natl. Cancer Inst., 28, 1053-1066.

JIMENEZ DE ASUA, L., OTTO, A.M., ULRICH, M.O., MARTIN-PEREZ, J. and THOMAS, G. (1982): The regulation on DNA replication in animal cells by prostaglandin F_2 . Prostaglandins and cancer: First International Conference, pp. 309-331. Alan R. Liss, N.Y.

JOSEPH, B.S. and OLDSTONE, M.B.A. (1974): Antibody induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. J. Immunol., 113, 1205-1209.

KALISS, N. (1958): Immunological enhancement of tumour homografts in mice: a review. Cancer Res., 18, 992-1011.

KAMO, I., PATEL, C., KATELEY, J. and FRIEDMAN, H. (1975): Immunosuppression induced "in vitro" by mastocytoma tumor cells and cell-free extracts. J. Immunol., 114, 1749-1756.

KATELEY, J.R., KAMO, I., KAPLAN, G. and FRIEDMAN, H. (1974): Suppression effect of leukemia virus-infected lymphoid cells on "in vitro" immunization of normal splenocytes. J. Nat. Cancer Inst., 53, 1371-1378.

KLEIN, J. (1982): Immunology. The Science of self-Non-self discrimination. John Wiley and sons.

KLEIN, G., SJOGREN, H.O., KLEIN, E. and HELLSTRON, K. (1960): Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autotho-nous host. Cancer Res., 20, 1561-1569.

KLOPPEL, T.M., KEENAN, T.W., FREEMAN, M.J. and MOORE, D.J. (1977): Glycolipid-bound sialic acid in serum: increased levels in mice and humans bearing mammary carcinomas. proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 3011-3013.

KOPPI, T.A. and HALLIDAY, W.J. (1983): Cellular origin of blocking factors from cultures spleen cells of tumor-bearing mice. Cell. Immunol., 76, 29-38.

KRISNARAJ, R., LENGLE, E.E. and KEMP, R.G. (1982): Murine leukemia. Proposed role for gangliosides in immune suppression. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 18, 89-98.

KUMAR, R.K., LYKKE, A.W.J. and PENNY, R. (1981): Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma. II. Characterization of a plasma suppressor factor in tumor-bearing mice. J. Natl. Cancer Inst., 67, 1277-1282.

LAND, H., PARADA, L.F. and WEINBERG, R.A. (1983): Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science, 222, 771-778.

LAW, J.W. and APELLA, E.W. (1973): Immunogenic properties of solubilized tumour from and RNA virus-transformed neoplasm. Nature, 243, 83-87.

LECLERQ, J.C., LEVY, J.P., VARET, B., OPPENHEIM, S. and SENIK, A. (1970): Antigenic analysis of L strain cells: a new murine leukemia associated antigen: L. Cancer Research, 30, 2073-2082.

LENGLE; E.E., KRISHNARAJ, R. and KEMP, R.G. (1979): Inhibition of the lectin-induced mitogenic response of thymocytes by glucolipids. Cancer Res., 39, 817-822.

LEVI-MONTALCINI, R. (1964): Growth control of nerve cells by a protein factor and its antiserum. Science, 143, 105-110.

LEVINE; L. (1982): Stimulation of cellular prostaglandin production by phorbol-esters and growth factors and inhibition by cancer chemopreventive agents. Prostaglandins and cancer: First International Conference, pp. 189-204. Alan R. Liss. N.Y.

LIU, W.T., ROGERS, M.J., LAW, L.L. and CHANG, K.S.S. (1977): Properties of RBL-5 leukemia cells cultivated "in vitro". J. Natl. Cancer Inst., 58, 1661-1664.

MAROTTI, T., HRSAK, I., KRUSIC, J. and DEVERIC, G. (1982): Immunosuppression related to ascitic fluid in patients with ovarian carcinoma. Oncology, 39, 298-303.

MAYSCHAK, D.T., GLASS, E., KACY, S., BOERWINKLE, W., BARRANCO, S., FLYE, M.W. and TOWNSEND, C.M. (1982): Inhibition of growth of hamster pancreatic ductal adenocarcinoma cells "in vitro" by PGE₂ and 16, 16-dimethyl PGE₂ a preliminary report. Prostaglandins and cancer: First International Conference, pp. 385-389. Alan R. Liss. N.Y.

McCLUSKEY, D.R., ROY, A.D., ABRAM, W.P. and MARTIN, W.M.C. (1983): T lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with benign and malignant breast disease. Br. J. Cancer, 47, 307-309.

McCULLOCH, E.A. (1975): Granulopoiesis in cultures of human haemopoietic cells. Clin. Haematol., 4, 509-533.

McKEEHAN, W.L. and McKEZHAN, K.A. (1980): Serum factors modify the cellular requirement for Ca^{+2} , K^{+} , Mg^{+2} , phosphate ions, and 2-oxocarboxylic acids for multiplication of normal human fibroblasts. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 3417-3421.

MEANS, A.R. and DEDMAN, J.R. (1980): Calmodulin: an intracellular calcium receptor. Nature, 285, 73-77.

MICKSCHE, M., COLOT, M., KOKOSCHKA, E.M., MOSER, K. and RAINER, H. (1982): Plasmapheresis in patients with advanced malignant disease: a pilot study. Oncology, 39, 146-151.

MOHAGHEGHPOUR, N., PARHAMI, B., DOWLATSHAHI, K., KADJEHNOURI, D., ELDER, J.H. and CHISARI, F.V. (1979): Immunoregulatory properties of human esophageal tumor extract. J. Immunol., 122, 1350-1358.

NAIDITCH, W.P. and CUNNINGHAM, D.D. (1977): Hexose uptake and control of fibroblast proliferation. J. Cell Physiol., 92, 319-322.

NELSON, D.S., HOPPER, K.E., BLANDEN, R.V., GARNER, I.D. and KEARNEY, R. (1978): Failure of immunogenic tumours to elicit cytolytic T cells in syngeneis host. Cancer Letters, 5, 61-67.

NELSON, D.S., NELSON, M. and HOPPER, K.E. (1979): Mechanism of resistance of mice to syngeneic methylcholanthrene induced fibrosarcomas. Adv. Exp. Med. Biol., 121B, 541-549.

OH, SE-K and MOOLTEN, F.L. (1981a): Nonspecific immunosuppressive factors in malignant ascites: further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. J. Immunol., 127, 2300-2307.

OH, SE-K and MOOLTEN, F. (1981b): Purification and characterization of an immunosuppressive factor from ovarian cancer ascites fluid. Eur. J. Immunol., 11, 780-788.

OLD, L.J., BOYSE, E.A. and STOCKERT, E. (1964): Typing of mouse leukemias by serological methods. Nature, 25, 813-815.

- PARMIANI, G., COLOMBO, M. and BALLINARI, D. (1980): Expression of alien minor histocompatibility antigens distinct from tumor-specific transplantation antigen on a murine fibrosarcoma. Int. J. Cancer, 26, 461-465.
- PASTAN, I. (1979): Cell transformation in Jakoby, W.B. Pastan, I.H. (eds.): "Methods in Enzymology. Vol. LVII, Cell Culture". pp. 368-370. Academic Press. N.Y.
- PASTAN, I. and JOHNSON, G.S. (1974): Cyclic AMP and the transformation of fibroblast. Adv. Cancer Res., 19, 303-329.
- PATRONE, F., DALLEGRI, F., GREMMO, A., BONVINI, E., MIGLIORINI, P., CANTERELLA, S., FERRARINI, M. and SACCHETTI, C. (1981): Serum-associated inhibition of neurotrophin Fc receptors in cancer patients. J. Natl. Cancer Inst., 67, 803-807.
- PELUS, L.M. (1982): Antigenic and humoral control of normal and leukemic human myelopoiesis prostaglandins and cancer: First International Conference, pp. 399-413. Alan R. Liss. N.Y.
- PERRY, L.L., BENACERRAF, B., McCLUSKEY, R.T. and GREENE, M.I. (1978): Enhanced syngeneic tumour destruction by "in vivo" inhibition of suppressor T cells using anti-I-J allo-antiserum. Am. J. Pathol., 92, 491-506.



PERRY, L.L. and GREENE, M.I. (1981): T cell subset interaction in the regulation of syngeneic tumor immunity. Federation Proc., 40, 39-44.

PESSINA, A., BRANDILLA, P., VILLA, S. and MOCARELLI, P. (1982): CFU-5 and CFU-c proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. Oncology; 39, 391-395.

PIERCE, G.D. (1982): Embryological control of carcinoma. Discurso en el acto de investidura Dr. "Honoris Causa". Universidad de Granada.

PIERCE, G.D., SHIKES, R. and FINK, L.M. (1978): A problem of developmental biology. pp. 68-87. Englewood cliffs, Prentice-Hall. New Jersey.

PLEDGER, W.J., HART, C.A., LOCATELL, K.L. and SCHER, C.D. (1981): Platelet-derived growth factor modulated proteins: constitutive synthesis by a transformed cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 4358-4362.

PLEDGER, W.J., STILES, C.D., ANTONIADES, H.N. and SCHER, C.D. (1977): Induction of DNA synthesis in BALB/c-3T3 cells by serum components: Reevaluation of the commitment process. Proc. Natl. Sci. U.S.A., 74, 4481-4485.

POMMIER, G.J., REMACLE-BONNET, M.M., RANCE, R.J. and DEPIEDS, R.C. (1981): Nonspecific inhibitory activity of soluble human colon carcinoma extracts: tentative mechanism of action. J. Natl. Cancer Inst., 67, 791-802.

PORTOVKALIAN, J., ZWIGELSTEIN, G., ABDUL-MALAK, N. and DORE, J.-F (1978): Alterations of gangliosides in plasma and red cells of humans bearing melanoma tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 916-920.

PREHN, R.T. (1976): Do tumours grow because of the immune response of the host?. Transpl. Rev., 28, 34-42.

PREHN, R.T. and MAIN, J.M. (1957): Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Nat. Cancer Inst., 18, 769-774.

PRESCOTT, D.M. (1976): The cell cycle and the control of cellular reproduction. Adv. Genet., 18, 99-177.

QUASH, G., KELOUANGKHOT, T. GAZZOLO, L., RIPOLL, H. and SAEZ, S. (1979): Diamine oxidase and polyamine oxidase activities in normal and transformed cells. Biochem. J., 177, 275-282.

RATTLE, H.W.E., KNEALE, G.G., BALDWIN, J.P. (1978): Histone complexes, nucleosomes, chromatin and cell-cycle dependent modification of histones. In: Chromatin Structure and Function. pp. 451-513. Nicolini, C.A. (ed.). Plenum Press., N.Y.

REBHUN, L.I. (1977): Cyclic nucleotides, calcium and cell division. Int. Rev. Cytol., 49, 1-54.

REDDY, E.P., REYNOLDS, R.K., SANTOS, E. and BARBACID, M. (1982): A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature, 300, 149-152.

REES, R.C., PRICE, M.R., BALDWIN, R.W. and SHAH, L.P. (1974): Inhibition of rat lymph node cell cytotoxicity by hepatoma-associated embryonic antigen. Nature, 252, 751-753.

REMACLE-BONNET, M.M., POMMIER, G.J., KAPLANSKI, S., RANCE, R.J. and DEPIEDS, R.C. (1976): Inhibition of normal allogenic lymphocyte mitogenesis by a soluble inhibitor extracted from human colonic carcinoma. J. Immunol., 117, 1145-1151.

REMACLE-BONNET, M.M., POMMIER, G.J., LUC, C., RANCE, R.J. and DEPIEDS, R.C. (1978): Nonspecific suppressive and cytostatic activities mediated by human colonic carcinoma tissue or cultured cell extract. J. Immunol., 121, 44-52.

ROGERS, M.J., LAW, L.W., APELLA, E., OROSZLAN, S. and TING, C. (1977): Solubilized TSTA and the major structural proteins, gp70 and gp30, in the immune response to murine leukemias induced by Friend, and Rauscher virus. Int. J. Cancer, 20, 303-308.

ROHRSCHEIDER, L.R., EISENMAN, R.N. and LEITCH, C.R. (1979): Identification of a Rous sarcoma virus transformation-related protein in normal avian and mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 4479-4483.

ROTH, J.A., GRIMM, E.A., GUPTA, R.J. and AMES, R.S. (1982): Immunoregulatory factors derived from human tumors. I. Immunologic and biochemical characterization of factors that suppressor lymphocyte proliferative and cytotoxic responses "in vitro". J. Immunol., 128, 1955-1962.

ROTH, J.A., OSBORNE, B.A. and AMES, R.S. (1983): Immunoregulatory factors derived from human tumors. II. Partial purification and further immunobiochemical characterization of a human sarcoma-derived immunosuppressive factor expressing HLA-DR and immunoglobulin-related determinants. J. Immunol., 130, 303-308.

RUSSEL, D.H. (1973): Polyamines in normal and neoplastic growth. New York: Raven.

RYGAARD, J. and POULSON (1974): The mutant nude mouse does not develop spontaneous tumors. An argument against immunological surveillance. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 82, 99-106.

SAIZ GARCIA, F. and RODRIGUEZ VALVERDE, V. (1981): Serum factors inhibiting E-rosette formation in patients with lung malignancies. Bull. Cancer, 68, 346-349.

SALINAS CARMONA; M.C., GERY, I., RUSSELL, P. and NUSSENBLATT, R.B. (1982): Mitogen-induced suppressor factor (s) from human lymphocytes: Effects on lymphoid and nonlymphoid cells and biophysical properties. Cell Immunol., 71, 44-53.

SAMUELSSON, B., GOLDYNE, M., GRANSTROM, S. and MALMSTEN, C. (1979): Prostaglandins and thromboxanes. Ann. Rev. Biochem., 47, 997-1025.

SATO, G.H. and ROSS, R. (1979): Hormones and cell culture: A and B. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.

SAVAGE, C.R. Jr and COHEN, S. (1972): Epidermal growth factor and a new derivative: Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. J. Biol. Chem., 247, 7609-7611.

SCHER, C.D., DICK, R.L., LOCATELL, K.L. and STILES, C.D. (1982): Platelet derived growth factor action: A molecular analysis of BALB/c-3T3 and transformed BALB/c-3T3 cells. Prostaglandins and cancer: first International Conference, pp. 291-296. Alan R. Liss.

SCHER, C.D., HENDRICKSON, S.L., WHIPPLE, A.P., GOTTESMAN, M.M. and PLEDGER, W.J. (1981). Constitutive synthesis of platelet-derived growth factor modulated proteins by a tumorigenic cell line. In: Sirbasku D., Pardee, A.B. (eds.). "Ninth Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation Growth of Cells in Hormonally Defined Media". N.Y. Cold Spring Harbor Press.

SCHUBERT, D. (1984): Developmental biology of cultured nerve, muscle and glia, pp. 130-155, Ed. Wiley J. and sons.

SCHULTZ, G., HARDMAN, J.G., SCHULTZ, K., BAIRD, C.E. and SUTHERLAND, E.W. (1973): The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3889-3893.

SCOTT, R.E., FLORINE, D.L., WILLE, J.J. Jr and YUN, K. (1982a): Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G_1 phase of the cell cycle: G_D . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 845-849.

SCOTT, R.E. , HOERL, B.J., WILLE, J.J.Jr., FLORINE, D.L., KRAWISZ, B.R. and YUN, K. (1982b): Coupling of proadipocyte growth arrest and differentiation. II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation. J. Cell Biol., 94, 400-405.

SCOTT, R.E., MARJORIE, L.W. and WILLE, J.J.Jr. (1984): Mechanisms for the initiation and promotion of carcinogenesis: A review and a new concept. Mayo Clin. Proc., 59, 107-117.

SEKAS, G. and COOK, R.T. (1976): The isolation of a low molecular weight inhibitor of ³H-thymidine incorporation into hepatic DNA. Exp. Cell Res., 102, 422-425.

SHAPOT, V.S. (1980): Biochemical aspects of tumour growth. MIR. Moscow.

SIMON, J.D., FREED, B.M., DAVIGNON, D. and ALBALA, M.M. (1983): Identification and characterization of a soluble suppressor factor(s) in the serum of AKR mice bearing lymphocytic leukaemia. Cell. Immunol., 82, 163-173.

SMITH, R.J. and IGNARRO, L.J. (1975): Bioregulation of lysosomal enzyme secretion from human neutrophils: Roles of guanosine 3'-5'-monophosphate and calcium stimulus-secretion coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 108-112.

SMITH, C.J., MASCHLER; R., MAURER, H.R. and ALLEN, J.C. (1983): Inhibition of cells in culture by polyamines does not depend on the presence of ruminant serum. Cell Tissue Kinet, 16, 269-276.

STILES, C.D., CAPONE, G.T., SCHER, C.D. ANTONIADES, H.N., VAN WYK; J.J. and PLEDGER, W.J. (1979): Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, 1279-1283.

STILES, C.D., DEMON, W., CHUMAN, L.M., SATO, G. and SAIER, J. (1976): Growth regulation of heterologous tissue culture cells in the congenitally athymic nude mice. II. Relationship of growth behaviour "in vitro" to tumorigenicity. Cancer Res., 36, 3300-3305.

STOKER; M.G.P. (1973): Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. Nature, 246, 200-203.

SZURO-SUDOL, A. and NATHANS, C.F. (1982): Suppression of macrophage oxidative metabolism by products of malignant and nonmalignant cells. J. Exp. Med., 156, 945-961.

TABOR, C.W. and TABOR, H. (1976): 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. Ann. Rev. Biochem., 918, 285-306.

TALMADGE, J.E., MEYERS, K.M., PRIEUR, D.J. and STARKEY, F.R. (1980): Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. Nature, 284, 622-624.

TAUB, R., KIRSCH, I., MORTON, C., LENOIR, G., SWAN, D., TRONICK, S., AARONSON, S. and LEDER, P. (1982): Translocation of the cMyc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 7837-7841.

TERSKIKH, V.V. (1973): Periods of rest in normal and malignant cell systems. In. Cellular Cycle. pp. 165-193. Moscow, Nauka.

THOMAS; L. (1959): Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity states. Cassell, London, 529-532.

TING, C.C. and HEBERMAN, R.B. (1974): Serological analysis of immune response to friend virus-induced leukaemia. Cancer Res., 34, 1676-1683.

TODARO, G.J. and GREEN, H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol., 17, 299-313.

TODARO, G.J., MARQUARDT, H., TWARDZIK, D.R., JOHNSON, P.A., FRYELING, C.H. and DE LARCO, J.E. (1982): Transforming growth factors produced by tumor cells. In: tumor Cell Heterogeneity. pp. 205-223. Academic Press.

TOMAS, C.D. (1978): Clinics in haematology: Aplastic anaemia. Londres, W.B. Saunders.

TROYE, M., HANSSON, Y., PAULIE, S., PERLMANN, P., BLOMGREN, H. and JOHANSSON, B. (1980): Lymphocyte mediated lysis of tumor cell "in vitro" (ADCC), induced by serum antibodies from patients with urinary bladder carcinoma or from controls. Int. J. Cancer, 25, 45-51.

TRUCCO, M., ROVERA, G. and FERRERO, D. (1984): A novel human lymphokine that inhibits haematopoietic progenitor cell proliferation. Nature, 309, 166-168.

TURNER, W.A., TAYLOR, J.D. and HONN, K.V. (1982): Effects of prostaglandin "A" series on tumor cells "in vitro". Prostaglandins and Cancer: First International Conference, pp. 369-373. Alan R. Liss.

VAN WYK, J.J. and UNDERWOOD, L.E. (1978): The somatomedins and their actions. In litwach G. (ed): "Biochemical Actions of Hormones", N.Y.: Academic Press, pp. 101.

- WALSH, J.D., and GECZY, C. (1982): Inhibition of the lymphocyte blastogenic response to antigen by serum-free culture supernatants of leukemic B cells. Cell. Immunol., 67, 241-254.
- WARNER, J.F. and DENNERT, G. (1982): Effects of a cloned cell line with N K activity on bone marrow transplants, tumor development and metastasis "in vivo". Nature, 300, 31-34.
- WATSON, J. (1975): Cyclic nucleotides as intracellular mediators of B cell activation. Transplant. Rev., 23, 223-249.
- WEINSTEIN, Y., MELMON, K.L. and SEGAL, S. (1976): Cyclic nucleotide effects on the mitogenesis of splenic B and T lymphocytes. Mitogens in Immunobiology., N.Y. Academic Press, 119-134.
- WEISS, D.W. (1977): The questionable immunogenicity of certain neoplasm: what then the prospects for immunological intervention in malignant disease?. Cancer Immunol. Immunother, 2, 11-17.
- WHITFIELD, J.F., BOYNTON, A.L., MACMANUS, J.P., RISON, R.H., SKORSKA, M., TSANG, B., WALKER, P.R. and SWIERENGA, S.H. (1980): The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. N.Y. Acad. Sci., 339, 216-240.

WIER, M.L., HOERL, B.J. and SCOTT, R.E. (1983): The integrated control of stem cell proliferation and differentiation (abstract). Fed. Proc., 42, 388-392.

WILKINS, J.A., SIGURDSON, S.L., RUTHERFORD, W.J., JORDAN, Y. and WARRINGTON, R.J. (1983a): The production of immunoregulatory factors by human macrophage-like cell line. I. Characterization of a inhibitor of lymphocyte DNA synthesis. Cell. Immunol., 75, 328-336.

WILKINS, J.A., SIGURDSON, L., JORDAN, Y., RUTHERFORD, W.J. and WARRINGTON, R.J. (1983b): Immunoregulatory factors from a human macrophage-like cell line. II. A human T-cell lymphokine-induced suppressor factor for lymphocyte proliferation. Cell Immunol., 77, 329-337

WINN, H.J. (1959): The immune response and the homograft reaction. Natl. Cancer Inst. Monag., 2, 113-119.

WOLF, R.L. and ANDREONI, J. (1982): Soluble inhibitory factor (SIF) in normal human serum. Cell. Immunol., 67, 299-311.

WOLF, R.L., ILEKIS, J. and BENVENISTE, R. (1983): Characterization of an immune suppressor from transformed human trophoblastic JEG-3 cells. Cell. Immunol., 78, 356-367.

- WOLF, R.L. and MERLER, E. (1979): Role of lipids in the immune response. I. Localization to a lipid-containing fraction of the active moiety of an inhibitor (SIF) of lymphocyte proliferation. J. Immunol., 123, 1169-1174.
- WOLF, R.L., PINCUS, S.H., MERLER, E. and ROSEN, F.S. (1981): A diffuse cutaneous lymphoma secreting a potent immunosuppressant. Clin. Immunol. Immunopathol., 18, 351-361.
- WOLF, R.L., WHITSED, H., ROSEN, F.S. and MERLER, E. (1978): A soluble inhibitor of B and T cell proliferation and antibody synthesis produced by dividing human T cells. Cell. Immunol., 36, 231-241.
- WOODRUFF, M. (1982): Interaction of cancer and host. Br. J. Cancer, 46, 313-322.
- YUN, K., HOERL, B.J. and SCOTT, R.E. (1983): Efficient differentiation of proadipocyte stem cells on nonadherent surfaces: evidence for differentiation without DNA synthesis. J. Cell. Physiol., 117, 249-259.
- ZINKERNAGEL, R.M. and DOTHERTY, P.C. (1979): MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of the polymorphic major transplantation antigens determining T cells restriction-specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol., 27, 51-177.

ZUCKER, S., LYSIK, R.M. and FRIEDMAN, S. (1974): Bone marrow erythropoiesis in the anemia of infection, inflammation and malignancy. J. Clin. Invest., 53, 1132-1138.