

Tesis de Licenciatura

Obtención de una línea celular a partir de un linfoma T murino

Ernst, Glenda M.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ernst, Glenda M.. (). Obtención de una línea celular a partir de un linfoma T murino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000700_Ernst

Cita tipo Chicago:

Ernst, Glenda M.. "Obtención de una línea celular a partir de un linfoma T murino". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000700_Ernst

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS DE LICENCIATURA

AUTORA

Glenda M. Ernst

LU : 844/96

TEMA

"Obtención de una línea celular a partir de un linfoma T murino"

DIRECTORA

Dra. Silvia Hajos

LUGAR DE TRABAJO

LABORATORIO DE INMUNOLOGIA TUMORAL
CATEDRA DE INMUNOLOGIA
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE LA INMUNIDAD HUMORAL
(IDEHU)
UBA-CONICET

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Junín 956, Capital Federal

TE : 49648259

-DICIEMBRE 1999-

Nº 7 00 / *

INDICE

	Páginas
Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes del modelo utilizado	10
Hipótesis	11
Objetivos	12
Materiales y métodos	13
Resultados	22
Resumen de los resultados obtenidos	43
Discusión y conclusiones	44
Bibliografía	47

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el establecimiento de una línea celular a partir de un linfoma T de origen espontáneo, no inmunogénico denominado LB. Luego de 4 meses de pasajes en cultivo se obtuvo una línea celular que permite disponer de un modelo para el estudio de este tumor.

Esta línea está formada por dos subpoblaciones celulares que poseen comportamiento diferente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los análisis inmunobiológicos preliminares sobre la línea en comparación con el tumor a partir del cual se originó demostraron que las células de la línea son susceptibles a la inducción de apoptosis por ciclosporina A, que expresan isoformas de la molécula CD44, al igual que las células LB y que *in vivo* son menos agresivas que el tumor LB ya que ratones inoculados con células de la línea mostraron un tiempo medio de supervivencia 10 días mayor que ratones inoculados con el tumor original.

Por análisis histopatológicos se pudo demostrar que el tumor original además de la infiltración previamente descrita en ganglios, bazo e hígado también lo hace en médula ósea, en timo y en pulmón. La línea celular infiltra estos mismos órganos pero no pulmón.

Todas las células analizadas expresan mRNA para CD44, y expresan esta glicoproteína en su superficie celular, aunque una de las subpoblaciones lo hace en baja proporción.

Se realizaron estudios citogenéticos sobre las células del tumor LB y de las células de la línea, se encontró en todas ellas un número modal de 40 cromosomas con alteraciones en el cariotipo.

INTRODUCCION

BIOLOGIA TUMORAL

Una característica general de los eucariotas superiores es la limitación del tiempo de vida, lo que se extiende a las células somáticas, cuyo crecimiento y división están estrechamente regulados. Las células cancerosas que han perdido el control habitual de crecimiento son una excepción, su capacidad para desarrollarse en lugares inapropiados o para propagarse indefinidamente puede ser letal para el organismo en el que se desarrollan.

Los cambios que tienen lugar cuando una célula se vuelve tumorigena se pueden resumir en 3 etapas: La "inmortalización" que se refiere a la capacidad de crecer indefinidamente, la "transformación" que alude a la incapacidad para obedecer a las limitaciones habituales de crecimiento y la "metástasis" por la cual una célula cancerosa adquiere la capacidad de invadir un tejido normal, de modo que puede escapar de su tejido original y establecer una nueva colonia en cualquier otra parte del cuerpo. La metástasis marca la diferencia entre un tumor clínicamente benigno (que no invade otros tejidos) o un tumor maligno (que sí es capaz de colonizar otros tejidos) (1).

Está demostrado que durante el crecimiento de una célula transformada se puede generar un tumor de células heterogéneas. Algunos tumores luego de un período de tiempo adquieren un mayor potencial maligno y esto se podría deber a una diferenciación secuencial de subpoblaciones celulares con distintos atributos tales como capacidad de invasión, velocidad de crecimiento, respuesta hormonal o susceptibilidad a drogas antineoplásicas. A nivel molecular esta heterogenicidad asociada a la progresión tumoral podría ser provocada por la acumulación de múltiples mutaciones independientes en las células tumorales, lo cual podría generar subclones con distintas características (2). Algunas de estas mutaciones podrían ser letales pero otras podrían afectar proto-oncogenes o genes supresores. Los daños genéticos que producen la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales podrían haber sido generados por mutaciones puntuales o por alteraciones a nivel cromosómico tales como translocaciones, deleciones o duplicaciones que implican alteraciones en el cariotipo (3).

CARCINOGENESIS

El cáncer puede tener muchas causas y puede desencadenarse por uno o por múltiples sucesos. Diversos agentes aumentan la frecuencia con que las células adquieren el estado transformado, de dichos agentes se dice que son carcinogénicos. Los carcinógenos suelen dividirse en dos tipos, los que "inician" y los que "favorecen" la formación de tumores, lo que implica que el desarrollo de un tumor tiene varias etapas (1).

El concepto de carcinogénesis involucra la alteración genética de células cuya progenie constituirá la masa tumoral, este proceso involucra 3 etapas: **iniciación** donde ocurren alteraciones no reversibles en el genoma; **promoción** dada por cambios en la expresión genética y finalmente **progresión** en la cual se producen una serie de anormalidades que se manifiestan por un mayor índice de crecimiento, invasión y metástasis (4).

MECANISMOS DE INVASION Y METASTASIS

La diseminación de las células tumorales es un proceso complejo y selectivo que comienza con la vascularización de los tumores o angiogénesis. Esta vascularización facilita la diseminación de las células malignas.

La cascada metastásica se divide en dos etapas, una primera de **invasión** de la matriz extracelular y otra de **diseminación** de las células tumorales en tejidos u órganos distantes.

La matriz extracelular (MEC) está constituida por una membrana basal y tejido conectivo, sus componentes básicamente son colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. La **invasión** de la misma está determinada por un proceso secuencial de dos pasos, en primer lugar las células tumorales sufren una pérdida de adhesividad del tumor o "detachment", y a continuación se produce un "attachment" a la MEC con la posterior degradación de algunos de sus componentes, a través de enzimas proteolíticas que pueden ser secretadas por las mismas células tumorales o por fibroblastos o macrófagos inducidos por las células del tumor, entre estas enzimas se encuentran por ejemplo ciertas metaloproteasas de matriz que contribuyen a la degradación de la membrana basal y la MEC permitiendo la extravasación de las células tumorales al torrente sanguíneo. Previa a la infiltración de la MEC, éstas se

adhieren a sus componentes lo que pone en evidencia la existencia de receptores que mediarían el " attachment" de las células tumorales a componentes de la MEC como fibronectina y laminina (5). Además las células tumorales expresan integrinas que pueden servir como receptores para algunos componentes de la MEC incluyendo fibronectina, colágeno, laminina y vitronectina (6).

Una vez que las células tumorales llegan a la circulación comienza su **diseminación**, y son más vulnerables a la destrucción por parte del sistema inmune. En los vasos tienden a formar agregados, proceso que está favorecido por moléculas de adhesión homofílicas y heterofílicas entre las células del tumor entre sí, y entre células tumorales y células sanguíneas en particular plaquetas (1). La formación de agregados aumenta la posibilidad del posible foco de diseminación para sobrevivir y llegar a los sitios de infiltración.

La extravasación de células tumorales del tumor a los vasos sanguíneos y luego de los mismos a tejidos distantes, involucra la participación de moléculas de adhesión como integrinas, receptores de laminina y también enzimas proteolíticas. Una molécula de adhesión que participa en estos procesos es la glicoproteína CD44 la cual se expresa en linfocitos T normales y está relacionada con la migración selectiva de los mismos a los tejidos linfoides. Estudios recientes demuestran que células tumorales expresan isoformas variables de CD44 y que éstas contribuirían a la infiltración y metástasis (7).

MOLECULAS DE ADHESION

Las moléculas de adhesión son indispensables para la trans migración a través del endotelio celular, la locomoción en los vasos sanguíneos o linfáticos y en procesos tumorales serían responsables de la navegación selectiva y de la infiltración órgano específica.

Las moléculas de adhesión se clasifican en familias o superfamilias según su estructura. Entre éstas se encuentran:

* La superfamilia de las "integrinas" compuestas por heterodímeros formados por dos subunidades unidas por interacciones no covalentes que participan en procesos de adhesión célula-célula.

* La superfamilia de las "inmunoglobulinas" que son moléculas con un número variable de dominios que se unen a las integrinas y que participan en interacciones heterofílicas proporcionando la fuerza necesaria para mantener el contacto entre las células.

* La superfamilia de las "selectinas" que son proteínas con un dominio semejante a las lectinas de tipo C, un dominio homólogo a una parte del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y varios dominios repetidos en tandem relacionados con proteínas reguladoras con el sistema de complemento.

* Las "mucinas" que son proteínas ricas en serina o treonina y se encuentran altamente glicosiladas y que van a interaccionar con la familia de las selectinas.

* Las "caderinas" que son moléculas dependientes de calcio relacionadas con las interacciones homofílicas entre células vecinas.

* La familia de "CD44" que engloba todas las isoformas de esta molécula, que se clasifica como molécula de transmembrana de tipo I, involucrada en procesos de trans migración, "homing" de receptores, unión de células endoteliales a MEC, tráfico y agregación celular. Es una molécula ubicua que se expresa en la mayoría de las células del sistema hematopoyético (timocitos, linfocitos, granulocitos, macrófagos y hematíes), en algunas células epiteliales, keratinocitos, células endoteliales y algunas células del sistema nervioso central.

CD44 es una glicoproteína generada por modificaciones postraduccionales (fundamentalmente glucosilaciones) y por un "splicing" alternativo de alguno de sus exones. El gen que codifica para CD44 se localiza en humanos en el cromosoma 11 y en ratón en el 2, en ambos la organización genómica es de 20 exones siendo los 5 primeros y los 5 últimos constantes y los 10 restantes variables, es decir que pueden formar o no parte de la molécula dependiendo del proceso de "splicing". Los exones 1 al 17 codifican para la región extracelular, el 18 para la región de transmembrana y el 19 y 20 para la región citoplasmática.

La forma más abundante de CD44 es la estándar, que no contiene ningún exón variable y está expresada fundamentalmente en el sistema hematopoyético, por lo que

es conocida como CD44H. Las demás isoformas de CD44 difieren en su estructura primaria y en sus características de adhesión dependiendo de las combinaciones de los exones variables que se expresen. Si bien por combinatoria de los 10 exones variables que se expresen se podrían generar un gran número de isoformas, sólo se han descrito 30 (8). Se ha sugerido que la expresión de algunas isoformas estarían relacionadas con procesos tumorales (9).

INMUNIDAD TUMORAL

La noción de una respuesta inmune tumoral surgió paralelamente al concepto de inmunidad desarrollada contra infecciones. En 1909 se postulaba que si no fuese por la presencia del sistema inmune que remueve a las células propias aberrantes todos los seres humanos morirían a causa de tumores (10).

El desconocimiento en esa época de los requerimientos de histocompatibilidad entre los tejidos y la realización de trabajos de investigación en animales no endocriados, llevó a confundir a la inmunidad antitumoral con la desarrollada en los trasplantes heterólogos. Esto llevó a que los trabajos tendientes a demostrar la presencia de una respuesta inmune inducida por las células tumorales carecieran de valor hasta tanto se comenzó con la endocría de animales de laboratorio y estudios del complejo mayor de histocompatibilidad o del sistema H-2 en ratón (11).

En la década del 60 se postuló la teoría de vigilancia inmunológica. Los fundamentos de esta teoría sostienen que las células efectoras del sistema inmune del huésped (linfocitos B, T, y células NK) deben ser capaces de reconocer "antígenos tumorales" y de destruir las células autólogas aberrantes que los contienen (12). Esta teoría hoy día está cuestionada ya que se contrapone a ella el hecho de que individuos inmunocompetentes puedan desarrollar tumores, por lo que podría existir un mecanismo de escape de los tumores al sistema inmune (13).

LINEAS CELULARES

Para caracterizar los sucesos aberrantes que hacen que las células eludan el control habitual y que produzcan tumores, es necesario disponer de un sistema que reproduzca fielmente el crecimiento celular *in vitro*. Hasta ahora hay dos opciones: las células primarias provenientes del tumor que pueden reproducir fielmente el fenotipo

tumoral *in vivo*, pero sólo pueden sobrevivir un período de tiempo relativamente corto y las líneas celulares. Las células que se han establecido para formar una línea celular se pueden perpetuar indefinidamente, aunque durante el proceso de adaptación al cultivo pueden sufrir algunos cambios.

Por definición una línea celular se ha establecido cuando se ha vuelto inmortal, sin embargo las líneas celulares establecidas no tumorigénicas siguen teniendo control de crecimiento y muestran una serie de rasgos típicos como los siguientes:

- Dependencia de anclaje, necesitan una superficie firme para que las células se adhieran.
- Dependencia de suero, al contrario de las células tumorales que pueden crecer en concentraciones muy bajas de suero.
- Inhibición por densidad, las células sólo crecen hasta alcanzar una determinada densidad por tanto el crecimiento está limitado por mecanismos quizás relacionados con el contacto entre las células.

Estas propiedades sirven como parámetros por los cuales se puede juzgar la normalidad de las células.

A diferencia de las líneas de células normales, las células cultivadas a partir de tumores muestran cambios en todas o en algunas de esas propiedades. Han pasado a una segunda fase de conversión y se dice que han sido transformadas (1). Sus características son:

- Crecimiento poco restringido.
- Se dividen con mucha mayor frecuencia que las células no transformadas.
- Pueden no necesitar una superficie sólida a la cual adherirse.
- Las células muestran una superficie redondeada a diferencia de las células normales que crecen extendidas en la superficie.
- Puede haber una dependencia reducida de suero.
- Pueden apilarse unas encima de otras formando masas celulares llamadas focos, en lugar de restringir su crecimiento a la formación de monocapas sobre la superficie.
- Finalmente pueden inducir tumores cuando se inyectan en animales apropiados.

ANTECEDENTES DEL MODELO UTILIZADO

El tumor murino denominado LB, se originó como una leucemia linfoide de origen espontáneo en un ratón BALB/c macho de seis meses de edad, en el Bioterio de la Sección Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina (Bs.As.) y es mantenido desde entonces por pasajes subcutáneos (tumor sólido) y/o intraperitoneales (tumor ascítico) en ratones singeneicos (14).

Cuando se inocularon extractos acelulares obtenidos a partir de las células LB en ratones BALB/c intraperitonealmente, éstos no fueron capaces de inducir un proceso maligno en 15 meses de observación, lo que sugirió la ausencia de un virus relacionado con esta leucemia (15).

Se ha demostrado que este tumor presenta una inmunidad concomitante, de origen no inmunológico. Es decir que tumores primarios inhiben el crecimiento de un implante secundario de tumor; y este proceso no está mediado por macrófagos, ni es dependiente de células T provenientes del timo (15).

En 1.985 se describieron los sitios donde el tumor LB hace metástasis, para ello éste se inoculó en ratones BALB/c singeneicos de 6 meses de edad, se realizaron las autopsias correspondientes y se encontraron metástasis en nódulos linfáticos, en hígado y en bazo (16).

Cuando se realizó la caracterización de los marcadores de membrana que expresan las células LB por citometría de flujo (FACS) se pudo determinar que está constituido por linfocitos T que no expresan proteínas virales gp-70 en su membrana, pero sí marcadores de células citotóxicas (CD8). Además, presentan el receptor para IL-2 (CD25) y antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase I, pero no el de clase II (17). También se ha demostrado que las células LB expresan el marcador de superficie CD44 y una integrina β_2 (CD18) que podrían estar involucrados en los procesos de metástasis en nódulos linfáticos y bazo respectivamente (18).

En función de que esta leucemia murina expresa constitutivamente el CD25 se propuso que podría proveer un modelo experimental para el estudio de leucemias T humanas (ATL) u otras enfermedades malignas que expresen este receptor (19).

La ausencia de antígenos de clase II en la superficie celular podría estar asociada con la falta de capacidad de las células tumorales de activar el sistema inmune y el deterioro de los controles internos y externos del crecimiento celular, posiblemente relacionados con el establecimiento del estado maligno de las células LB (14).

En estadios tempranos de la evolución de los linfocitos T, éstos migran de la médula ósea (donde se originan) al timo (donde maduran). Una de las funciones de CD44 es el homing de linfocitos T al timo, se ha demostrado la participación de CD44 en este proceso. Linfocitos T inmaduros, CD44+ pueden volver al timo, pero linfocitos T maduros CD44- no lo pueden hacer (20). La evolución de los linfocitos T en etapas tempranas de su maduración en el timo comprende 4 estadios. En el primer estadio los linfocitos expresan CD44 pero no CD25, en el segundo expresan CD44 y CD25, en el tercero no expresan CD44 pero sí CD25, y en el cuarto no expresan CD44 ni CD25 cuando completan el procesos de maduración.

Ha sido sugerido que la transformación al estado maligno de las células LB tuvo lugar en una fase temprana de la maduración de las células, en un estadio en que son Thy-1+, CD8+, B₂A₂ +, CD4-, CD3-, antes del reordenamiento del receptor de reconocimiento antigénico de las células T (14), y además las células de este tumor son CD44+ y CD25+ , por lo que suponemos que este tumor se originó en el segundo estadio de diferenciación en el timo.

En función de estos antecedentes las hipótesis planteadas son:

- a) A partir de este tumor debería ser posible establecer una línea celular que permita el estudio *in vitro* del comportamiento, agresividad y resistencia de este tumor.
- b) Considerando que en general los tumores están formados por poblaciones heterogeneas de células, durante el establecimiento de la línea se podría seleccionar más de una subpoblación con comportamientos biológicos diferentes. El comportamiento de la línea celular y de las posibles subpoblaciones derivadas de la misma podría ser distinto al del tumor original.
- c) La expresión de CD44 en las células de la línea y de las subpoblaciones podría no ser el mismo.

- d) La respuesta a diferentes drogas que modulan la proliferación celular podrían estar relacionada con procesos de apoptosis, o de activación linfocitaria.
- e) La línea celular y las subpoblaciones obtenidas a partir de la misma podrían tener un cariotipo diferente al del tumor original.

A partir de estas hipótesis se plantearon los siguientes **objetivos:**

- (1) Proceder al establecimiento de una línea celular a partir de una leucemia T murina espontánea llamada LB.
- (2) Separar las subpoblaciones presentes en la línea en función de sus características de crecimiento *in vitro*.
- (3) Realizar estudios inmunobiológicos de la línea en forma comparativa con el tumor que le dió origen evaluando los siguientes parámetros :
 - a) Comportamiento *in vivo* del tumor y de la línea.
 - b) Comportamiento *in vitro* de las subpoblaciones presentes en la línea celular.
 - c) Determinación de apoptosis.
 - d) Expresión del mensajero y de la proteína de CD44.
 - e) Análisis cariotípico del tumor, y de las subpoblaciones de la línea.

MATERIALES Y METODOS

1) ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR

Se partió de células ascíticas de un ratón BALB/c inoculado con el tumor LB (ip.), que fueron extraídas en esterilidad y cultivadas en una concentración inicial de 2.5×10^6 células/ml a 37°C en presencia de 5% de CO₂, en medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con L-glutamina 2mM, buffer HEPES 25mM, 1% aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, 0.5 mM de 2-β mercaptoetanol, penicilina (100µg/ml), estreptomycin (100µg/ml), adicionado de 10% suero fetal bovino (SFB) descomplementado.

La concentración y la viabilidad celular se determinaron por conteo en cámara de Neubauer, utilizando el método de exclusión con azul Tripán.

En las primeras semanas de cultivo las células se repicaron cada 2 ó 3 días diluyéndolas a 1×10^6 células/ml, a partir del mes y medio se diluyeron a 0.5×10^6 células/ml y después de los cuatro meses se mantuvieron en concentraciones entre 5×10^4 y 1×10^5 células/ml.

El primer año de cultivo la línea (LT-LBL) se mantuvo en 10% de suero fetal bovino, pero actualmente las células están estabilizadas en 5% (la viabilidad se mantiene por encima del 90%). La posibilidad de diluir más las células y de cultivarlas a una baja concentración de suero permite que actualmente se repiquen sólo dos veces por semana.

Desde el 8º mes en la línea LT-LBL se diferenciaron 2 subtipos de células, que se enriquecieron por repiques diferenciales separando las que crecen en suspensión de las adheridas al frasco de cultivo. Para esto se utilizó Tripsina-EDTA 0.25%.

A partir del pasaje 18 fue posible criopreservar las células, pudiendo recuperarlas al descongelarse con buena viabilidad.

Las células se chequearon con un kit de detección de micoplasmas por PCR en dos oportunidades.

(2) DETERMINACION DEL TIEMPO DE DUPLICACION CELULAR

Se utilizó un ensayo colorimétrico con XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenil)-2H-tetrazolium-5-carboxinilide) que se oxida en las células viables generando un producto coloreado soluble que puede ser medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490nm. Para que la oxidación ocurra se debe agregar un activador que es PMS (phenazine methosulfate).

En una placa de 96 pocillos se cultivaron durante 4 horas las distintas células en concentraciones entre 1×10^5 y 1×10^7 células/ml, con 50 μ l de una mezcla filtrada de 5ml de una solución de XTT (1mg/ml) y 25 μ l de una solución de PMS (1.53mg/ml). Posteriormente se midió la DO en un contador de ELISA a 490nm. Con estos datos se realizaron curvas de DO en función de la concentración para cada tipo de células que fueron utilizadas en la región lineal para extrapolar las DO de células incubadas 24 hs y calcular el tiempo de duplicación.

También se calculó el tiempo de duplicación por conteo en una cámara de Neubauer.

(3) ENSAYOS DE PROLIFERACION

En una placa de 96 pocillos se incubaron 5×10^5 células/ml de la línea con diferentes agentes que inhiben o estimulan la proliferación, luego de 24 horas en cultivo con los diferentes tratamientos se agregó en cada pocillo timidina tritiada (1 μ Ci/200 μ l), o la solución de colorantes de XTT. Las células se cosecharon a las 20 horas para ser contadas en un contador β de centelleo líquido o para ser leídas en un contador de Elisa respectivamente.

(4) DETERMINACION DE APOPTISIS

Análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN por electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizó Ciclosporina A (CsA) para inducir la apoptosis en las células, para esto se resuspendió 5µl de CsA (50mg/ml) en 45µl de etanol y esta solución se homogenizó en 4.95ml de RPMI. Se utilizaron las siguientes células:

-LT-LBL: línea celular obtenida del tumor LB

-LT-LBLg: subpoblación de la línea LT-LBL que crece en suspensión formando grumos.

-LT-LBLp: subpoblación de la línea LT-LBL que crece adherida al frasco de cultivo.

Se cultivaron las distintas células a 37°C, en 5% de CO₂ con RPMI en 7% suero fetal bovino, durante 20 horas en presencia o ausencia de 1µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.1µg/ml de CsA. Se realizó un control con etanol ya que éste se utilizó como diluyente de la CsA.

Extracción del ADN.

Luego de cada tratamiento se centrifugaron los tubos con 2×10^6 células a 6.500 rpm, 1 minuto, se agregó al pellet Buffer de lisis TTE (Tris-HCl/Tritón/EDTA), se centrifugó a 13.000 rpm 10 minutos, se mezcló el sobrenadante (donde queda el ADN apoptótico) con NaCl 5N y con isopropanol, se dejaron las muestras a -20° C 48 horas para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Luego se centrifugó a 13.000 rpm, se lavó el pellet con etanol 70%, se agregó Buffer TE (Tris-HCl/EDTA) , se dejó 4 días en un homogenizador a temperatura ambiente.

Electroforesis en geles de agarosa.

Las muestras se corrieron a voltaje constante (60V) en un gel de agarosa 1%, con buffer TAE (tris-acetato/EDTA) y bromuro de etidio. Se utilizó un patrón de peso molecular de 1KB DNA -ladder (GIBCO/BRL). A cada muestra se le agregó 1µl de RNasa (1mg/ml). Las bandas se visualizaron en un transiluminador de UV en presencia de bromuro de etidio.

Coloración con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio.

Se preparó una solución de naranja de acridina (100µg/ml) y bromuro de etidio (100µg/ml), y se resuspendió 1µl en 25µl de una suspensión de 1×10^6 células/ml, éstas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia y se contaron 200 células discriminando las viables normales, viables apoptóticas, no viables normales y no viables apoptóticas.

(5) CURVAS DE SOBREVIVENCIA

Se inyectaron (ip.) ratones BALB/c endocriados, entre 2 y 4 meses de edad con diluciones seriadas al décimo entre 1×10^6 células/ml y 1×10^3 células/ml suspendidas en 1 ml de RPMI. Luego se observaron los días en que los ratones iban muriendo y se graficaron las curvas como el % de supervivencia en función del tiempo.

(6) TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS

Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/c de un mes de vida con 1×10^6 células LB ó LT-LBL resuspendidas en un 1ml de RPMI, diez días después se sacrificaron y se les extrajo el timo que fue macerado en un Mesh y las células obtenidas a partir de cada uno se inocularon (ip.) en ratones BALB/c. Se observó si desarrollaban ascitis y el tiempo de supervivencia de los animales.

(7) ANALISIS HISTOPATOLOGICO

Se inyectaron ratones BALB/c endocriados de 1 mes de edad con 1×10^6 células LB y células de la línea en la misma concentración, en forma subcutánea (0,2 ml), e intraperitoneal (1ml). Luego de diez días posteriores a la inyección se sacrificaron y sus órganos fueron conservados en formol al 10% para su posterior análisis histopatológico. Como controles se utilizaron ratones normales y ratones inyectados con solución fisiológica.

También se realizó una cinética sacrificando a los animales a diferentes tiempos, cuando empieza a notarse el tumor, cuando está por morir y en un punto intermedio.

Este análisis histopatológico lo realizó la Dra Alicia Inés Bravo, en la sección de Patología del Hospital Castex.

(8) EXPRESION DE CD44

a) EXPRESION DEL MENSAJERO PARA CD44

Extracción del ARN total con TRIzol™ (GIBCO BRL).

Las células o los tejidos disgregados se homogenizaron con 1 ml de TRIZOL (reactivo a base de isotiocianato de guanidinio y fenol ácido). Se incubó 5 minutos para que se disgreguen las células, se separaron las fases con 0.2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente y se incubó 3 minutos, se centrifugó 15 minutos a 12000g a 4°C y se tomó la fase acuosa donde se encuentra el ARN, se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó 20 minutos a 4°C, se lavó con etanol 70%, se resuspendió el pellet con agua DEPC (agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato).

Se midió la concentración de ARN, por medición de la absorbancia a 260 nm y utilizando la fórmula

$$\mu\text{g ARN}/\mu\text{l} = \text{D.O} \times \text{dilución} \times 0.04$$

Se realizaron las diluciones adecuadas para disponer de igual concentración de ARN en cada tubo.

Reacción de transcripción reversa utilizando la " Transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina" (MMLV-RT).

Se utilizó como primer el iniciador Oligo(dT)₁₅ [específico para la cola de poli-A de los ARN mensajeros]. Se agregó 1μg de Oligo(dT) a 2μg de ARN, dNTPs (desoxiribonucleótidos: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y buffer RT (Promega), se incubó la solución 10 minutos a 70°C para desnaturalizar el ARN y permitir la hibridación con el iniciador.

Luego de enfriar la solución se agregaron 20 unidades de Rnasin (Promega), 200 unidades de la enzima MMLV-RT, y agua DEPC. Se incubó 90 min. A 37°C, y el cDNA obtenido se conservó a -20°C.

PCR: Primer amplificación.

* Amplificación de CD44:

A 5 μ l del cDNA sintetizado en la transcripción reversa se le agregaron dNTPs (50 μ M), primers antisentido y primers sentido (S1) para CD44 (20 pmoles de cada uno), buffer PCR, ClMg₂ (2mM) y Taq polimerasa (2 unidades).

La amplificación se realizó en un ciclador Perkin-Elmer modelo 480. El cDNA se amplificó a una temperatura de desnaturalización de 94°C 20 seg; una temperatura de annealing o hibridización de 55°C durante 60 seg; y una temperatura de extensión de 72°C durante 120 seg. Se realizaron 35 ciclos y una extensión final de 10 minutos.

*Amplificación de β actina:

A 1 μ l del cDNA se le agregaron buffer PCR, ClMg₂ (25mM), primers sentido (50 μ M), primers antisentido (50 μ M), dNTPs (10mM), agua DEPC, y Taq Polimerasa (5u/ μ l).

En este caso el cDNA se amplificó en 25 ciclos de 94°C de 1 min., 52°C 1 min., 72°C 1 min., y una extensión final de 10 min. A 72°C.

Primers para CD44

Nombre del iniciador	Secuencia de 5' a 3' (21)
CD441 ^b	ACC CCA GAA GGC TAC ATT TTG C
CD442a ^a	CTC ATA GGA CCA GAA GTT GTG G

Primers para β actina

Nombre del iniciador	Secuencia de 5' a 3'
β actina A	ATG GAT GAC GAT ATC GCT
β actina B	ATG AGG TAG TCT GTC AGG T

Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis se realizó según la técnica de Sambrook (22). Se preparó un gel de agarosa al 2% en buffer TAE, se sembraron 16 μ l de cada muestra con 4 μ l de "buffer loading", se corrió a 75V y las bandas se visualizaron en un transiluminador U.V en presencia de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

Amplificación exón específica.

Luego de la primera amplificación se realizó una segunda amplificación exón específica, en un volumen final de 100 μ l.

La mezcla de la reacción se preparó con dNTPs, buffer 10x Tac pol (Promega), Cl_2Mg (25mM), 0,2 pmoles del iniciador sentido y antisentido, Tac pol. y agua DEPC. Se utilizó como iniciador CD44s1 (sentido) con los iniciadores específicos (v1-v10).

Exón variable	Secuencia 5'-3' (21)	Exón complementario
V1	CTG TAG TTG CAG TCG TGG GC	6
V2	CAG CGA TCT TCG TTG TTC TAT CAA	7
V3	CTT CAT CAT CAT CAA TGC CTG ATC C	8
V4	ATC CTG GTG GTT GTC TGG AGT AGT	9
V5	TIG TAG CAT GTG GGG TCT CCT CTT	10
V6	CCT TCT GTC ACA TGG GAG TCT TCA	11
V7	GAT GAC CTT GTC CCA TTG GAT GTG	12
V8	CAC TGA AGG TGG TCC TGT CCT GTT	13
V9	TGG CAG AAT AGA AGT TGT TGG ATG G	14
V10	CTG GTA AGG AGC CAT CAA CAT TAA C	15

b) CITOMETRIA DE FLUJO: Detección de CD44 utilizando un anticuerpo específico.

Se utilizaron 1×10^6 células lavadas con PBS sobre las cuales se agregó 100 μ l del anticuerpo anti-CD44 de rata (Pharmigen) y se incubó 45 minutos a 4°C. Se lavó 3 veces las células, y se agregó 100 μ l del anticuerpo conjugado (anti-Ig de rata marcado con isotiocianato de fluoresceína FITC) (Pharmigen) y se volvió a incubar 45 minutos a 4°C en oscuridad. Se realizaron 3 lavados nuevamente y se resuspendieron las células en 1 ml de buffer PBS para realizar la lectura en el citómetro de flujo. Para el control de isotipo se utilizó un suero de rata diluido 500 veces.

(9) ESTUDIO CITOGENETICO

Se trataron las células con colchicina (0.1 ug/ml) durante 3 horas a 37°C, se centrifugaron 5 minutos a 5000 RPM y el pellet se resuspendió en una solución hipotónica de KCl 0.07M. Se incubó 7 minutos a 37°C. Se eliminó la hipotonía por centrifugación y el pellet se fijó con metanol, se dejó 30 minutos en frío. Se lavó con solución fijadora y se realizaron los extendidos. Se colorearon con Giemsa 3% para contar el número de cromosomas presentes en cada metafase y así poder determinar el número modal. El cariotipo se realizó por técnicas de bandeo G y C.

Este estudio se realizó en colaboración con la Dra Susana Merani y la Licenciada Victoria Fabris de la Cátedra de Citología Humana de la Facultad de Medicina (UBA).

RESULTADOS

1) ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR

Inicialmente las células LB en cultivo sufrieron una fase de adaptación que duró hasta el cuarto mes de cultivo cuando el ritmo de crecimiento se estabilizó y la viabilidad se mantuvo por encima del 85%. En el cuarto mes de cultivo quedó establecida la línea celular LT-LBL, la que estaba formada por 2 subpoblaciones celulares, una que crecía adherida al frasco de cultivo, y otra que crecía en suspensión (Fig.1-a)

A partir del 8^{vo} mes de cultivo las subpoblaciones se separaron, las células que crecían en suspensión empezaron a formar grumos y fueron llamadas LT-LBLg (Fig.1-b) y las que crecían adheridas al frasco de cultivo se las llamó LT-LBLp (Fig.1-c)

Actualmente la línea celular que ya lleva mas de 140 pasajes en un año y medio de cultivo, y las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp que llevan más de 8 meses, son repicadas 2 veces por semana y crecen con RPMI-C adicionado con 5% de SFB. El porcentaje de suero se ha podido disminuir a la mitad del inicial, lo que muestra que la línea celular y sus subpoblaciones dependen menos del agregado de factores de crecimiento externos.

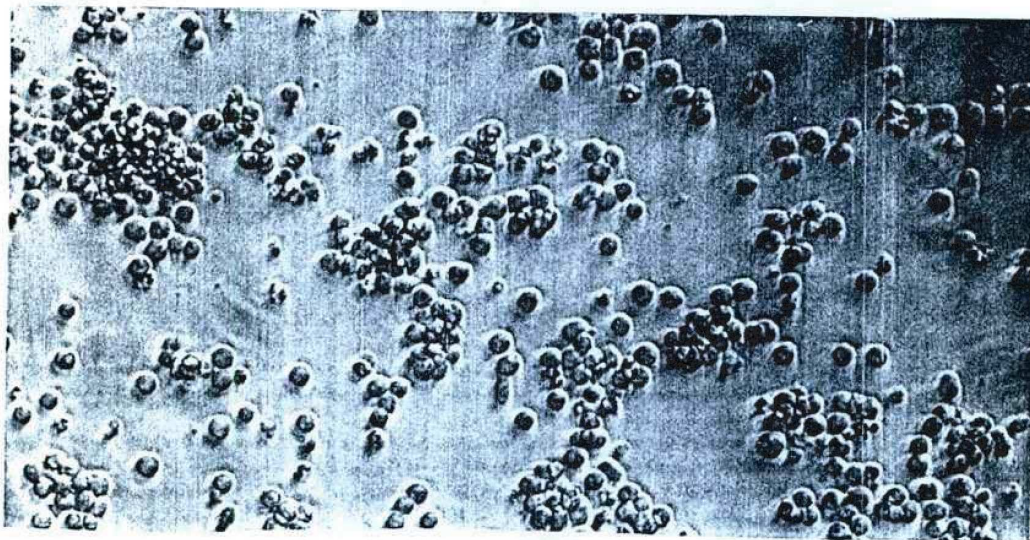


Figura 1-(a)

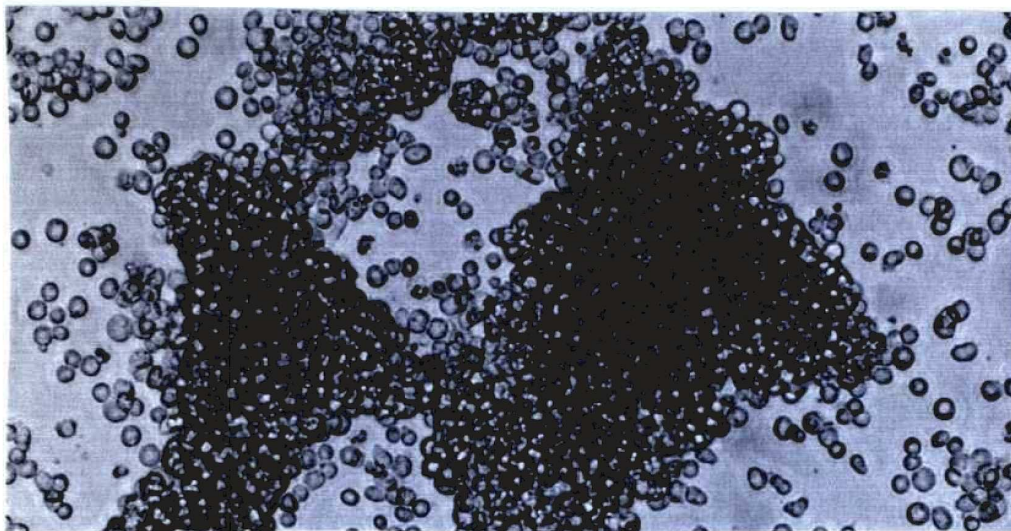


Figura 1-(b)

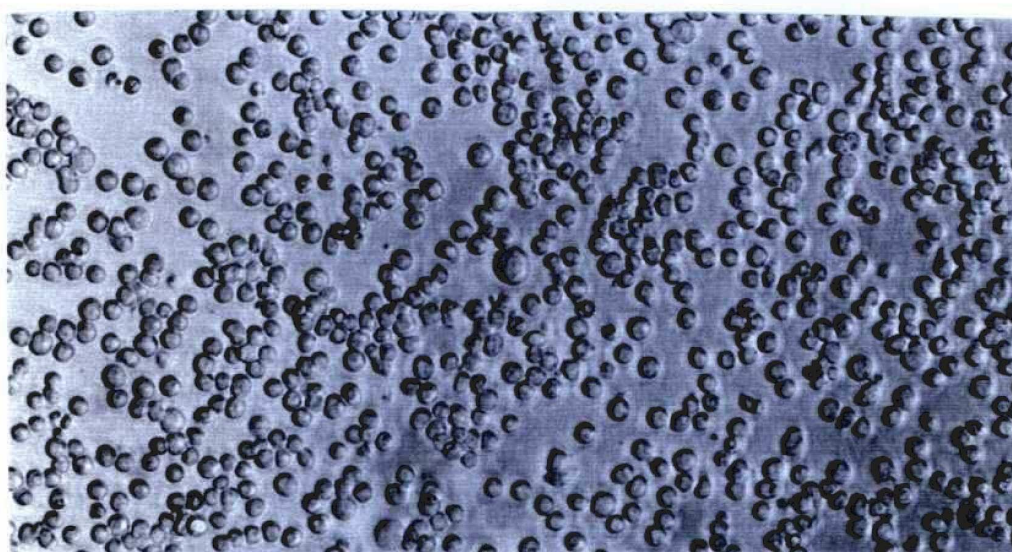


Figura 1-(c)

Figura 1: Fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 20X. En la figura (a) se observan las células de la línea LT-LBL, hay algunas células que están en suspensión agrupadas y otras adheridas al frasco. En (b) se observa la subpoblación LT-LBLg cuyas células crecen formando grumos en suspensión y en la figura (c) se muestra la subpoblación LT-LBLp, en ella se ven las células adheridas al frasco y en algunos casos extendidas sobre la superficie.

2) TIEMPO DE DUPLICACION CELULAR

Mediante un ensayo de XTT, se obtuvieron curvas que relacionan la densidad óptica a 490 nm y la concentración celular. Se construyó una curva para cada subpoblación celular. Para ello se incubaron las distintas células en concentraciones entre 1×10^6 y 1×10^5 células/ml con la solución de colorantes y se leyó a las 4 horas según lo descrito en materiales y métodos. Luego se cultivó 1×10^6 células/ml de la línea y las subpoblaciones durante 24 horas, se agregó el colorante y se leyeron los resultados. Estos datos de D.O fueron extrapolados en sus correspondientes curvas en la zona lineal para determinar la concentración celular y calcular el tiempo de duplicación (T_d).

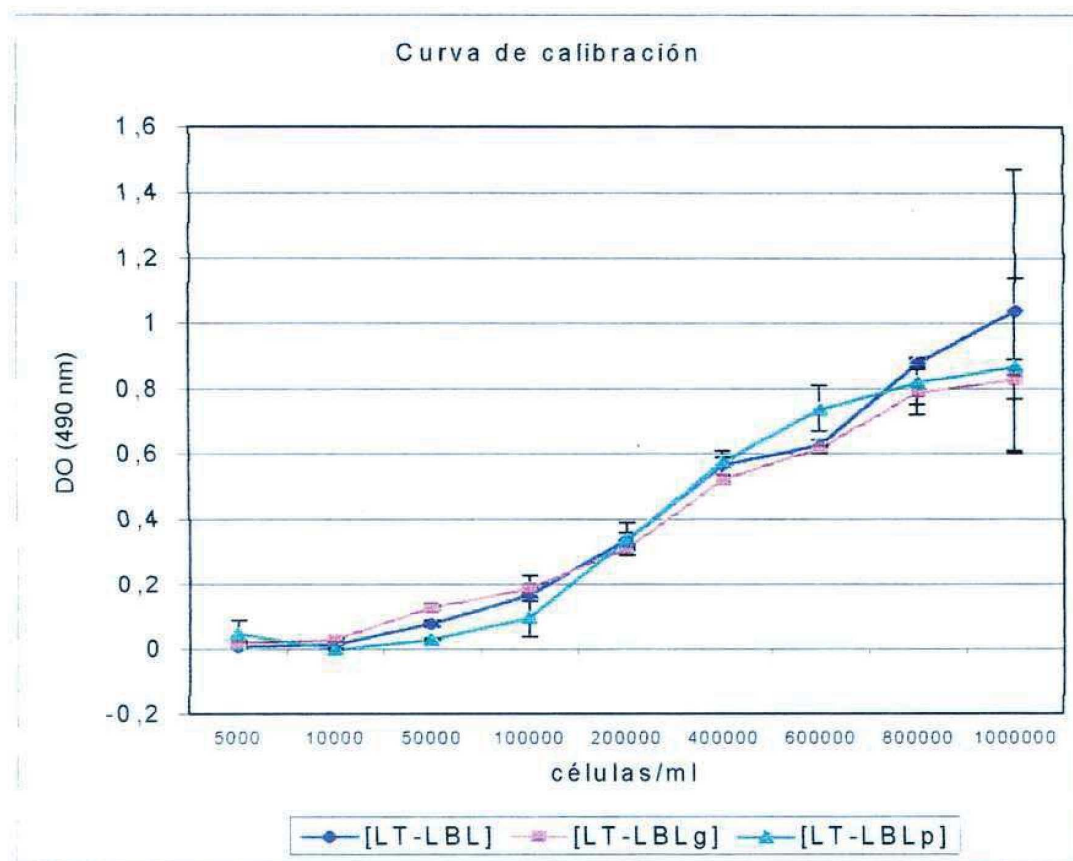


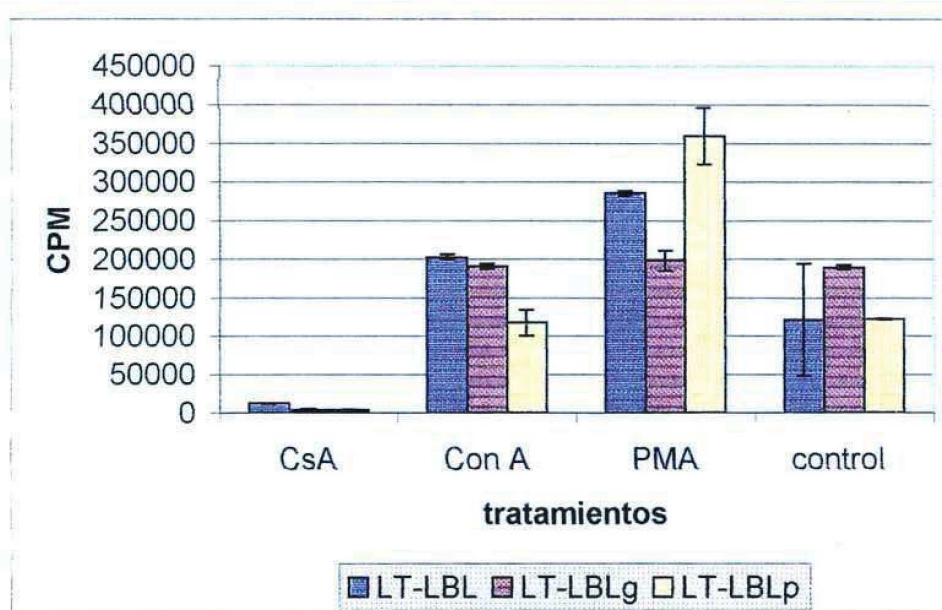
Figura 2: Se realizó una curva de calibración para cada una de las subpoblaciones celulares utilizando un ensayo colorimétrico XTT. Se utilizaron estas curvas para medir la concentración celular luego de 20 hs en cultivo y calcular el tiempo de duplicación según la fórmula: $T_d = (0.693 \cdot t) / \ln(N/n)$, donde t =tiempo, N =conc. final, n =conc. inicial. Los tiempos de duplicación fueron: T_d (LT-LBL)= 24 hs, T_d (LT-LBLg)= 24 hs, T_d (LT-LBLp)= 19hs.

3) ENSAYO DE PROLIFERACION

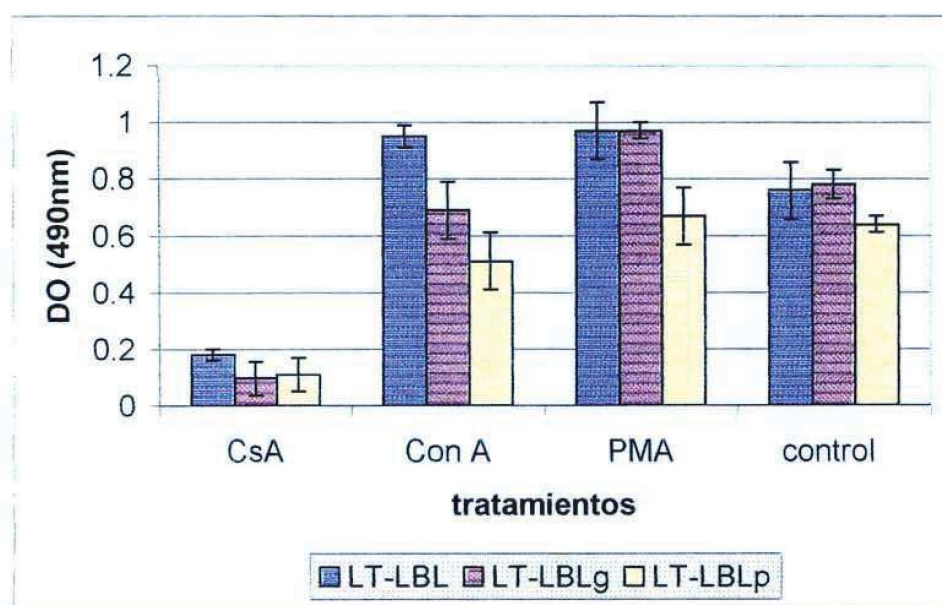
Para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre la proliferación celular de la línea LT-LBL y de las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp, se incubaron 5×10^5 células/ml con CsA ($0.5 \mu\text{g/ml}$), Concanavalina A (conA) (2 mg/ml) o PMA (éster de forbol) (0.02 mM). Luego de 24 horas se les agregó Timidina ^3H , o los colorantes del XTT.

En las células del tumor LB $0.5 \mu\text{g/ml}$ de CsA inhibió la proliferación casi completamente, y el tratamiento con Con A o con PMA estimuló la proliferación celular en un alto porcentaje con respecto al control. A partir de estos antecedentes se evaluó el comportamiento de la línea LT-LBL y de las subpoblaciones derivadas de la misma en respuesta a los mencionados tratamientos.

En la Figura 3 se observa que la CsA inhibió la proliferación celular en un alto porcentaje en todas las subpoblaciones celulares analizadas y que el PMA la estimuló, en cambio la concanavalina A no modificó el crecimiento celular.



(a)



(b)

Figura 3: Se observa el efecto sobre la proliferación celular de cada tratamiento. En el panel (a) la proliferación se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada y en el panel (b) la misma se midió por XTT. Se observa que la CsA inhibió en un alto porcentaje la proliferación, la concanavalina A la estimuló parcialmente y el PMA también la estimuló con respecto al control.

(4) CURVAS DE MUERTE

Se realizaron dos curvas de muerte utilizando ratones inoculados con la línea LT-LBL y ratones inoculados con el tumor original LB. Para la primera se utilizó el repique N° 38 de la línea celular que correspondía a tres meses de cultivo, es decir antes de que la línea estuviese establecida como tal. La segunda curva se realizó con el repique N° 96 que correspondía a los ocho meses de cultivo, es decir posterior al establecimiento de la línea. Los resultados se muestran en la Figura 4, donde se observa que previo al establecimiento de la línea no había diferencia en el tiempo medio de sobrevida de los ratones inoculados con células del tumor LB y los inoculados con la misma cantidad de células LT-LBL.

Cuando se pudo separar las dos subpoblaciones de la línea en LT-LBLg y LT-LBLp, se realizaron curvas de muerte para estudiar si había diferencias en el comportamiento *in vivo*. Estas curvas se realizaron con diferentes diluciones seriadas al décimo de las células (entre 1×10^6 y 1×10^4 suspendidas en 1ml de solución fisiológica). Los resultados se muestran en la Figura 5 en la cual se puede observar que para todas las diluciones los ratones inoculados con la subpoblación que crece formando grumos tiene un tiempo de sobrevida entre 4 y 6 días superior al de los ratones inoculados con la subpoblación que crece adherida al frasco de cultivo, y que estos últimos presentan una cinética similar a las ratones inoculados con la línea celular LT-LBL.

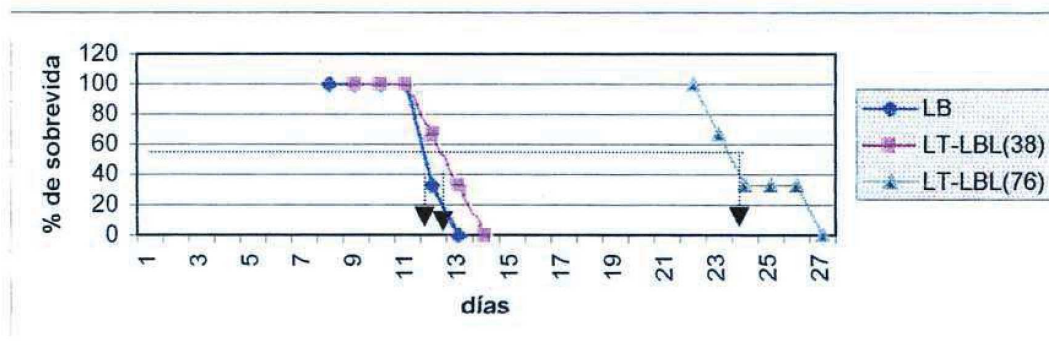


Figura (4): Curvas de muerte realizadas con 6 ratones por lote inoculados ip. con 1×10^6 células. Se realizaron con células del tumor original LB y con células de la línea LT-LBL en el repique 38 (correspondiente al tercer mes de cultivo) y en el repique 76 (correspondiente al octavo mes de cultivo).

Las flechas indican el tiempo medio de supervivencia. Se puede observar que previo al establecimiento de la línea no hubo diferencias con respecto al tiempo medio de supervivencia en los ratones inoculados con el tumor LB o con la línea celular, pero luego de estar establecida la línea LT-LBL, ésta produjo un tiempo de supervivencia de 10 días más que en los ratones inoculados con el tumor original.

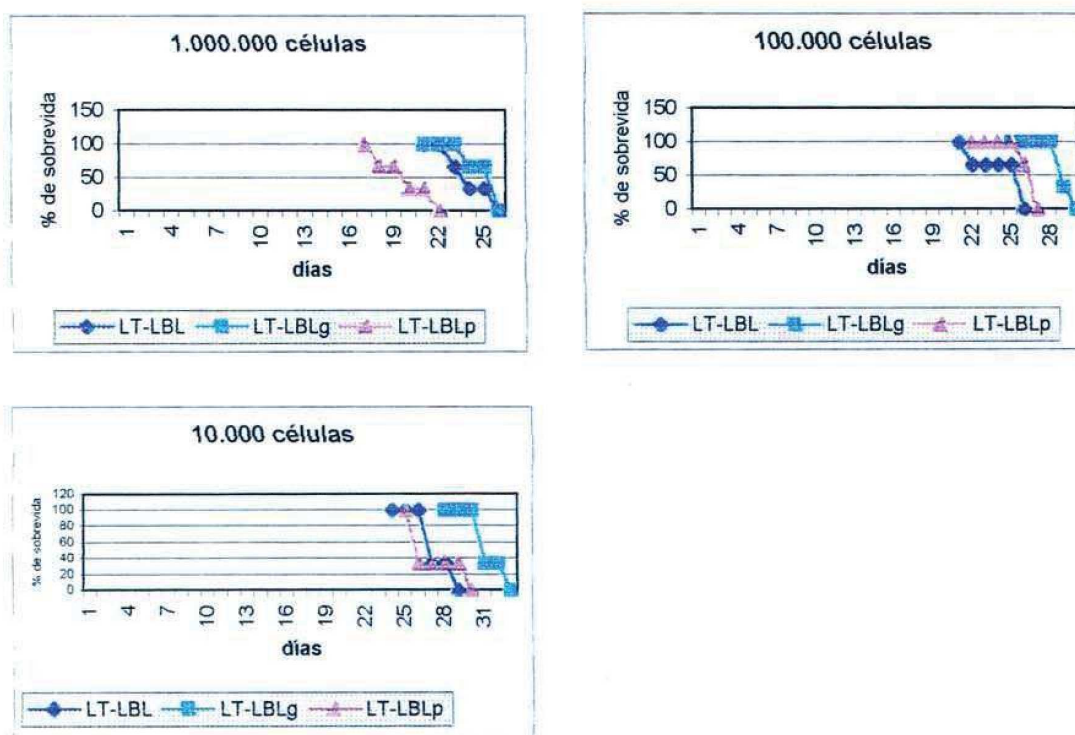


Figura (5): Curvas de muerte realizadas con diferentes concentraciones de cada subpoblación celular pertenecientes a la línea LT-LBL. Se utilizaron 3 ratones por lote. Los resultados corresponden a dos experimentos similares. En todas las diluciones se observa un tiempo mayor de supervivencia para los ratones inoculados con la subpoblación celular LT-LBLg. (entre 4 y 6 días más que las ratones inoculados con las otras dos subpoblaciones celulares)

(5) TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS

Si bien no estaba descripto que el tumor LB podría infiltrar el timo y ante la sospecha de que ésto pudiera ocurrir se realizó la transferencia de timocitos de ratones previamente inoculados con células tumorales (LB y LT-LBL) a ratones normales.

Ambos ratones, el inoculado con LB y con LT-LBL, desarrollaron ascitis, lo que es un fuerte indicio de que los tumores producidos por estas células estarían infiltrando timo ya que timos normales no inducen este efecto.

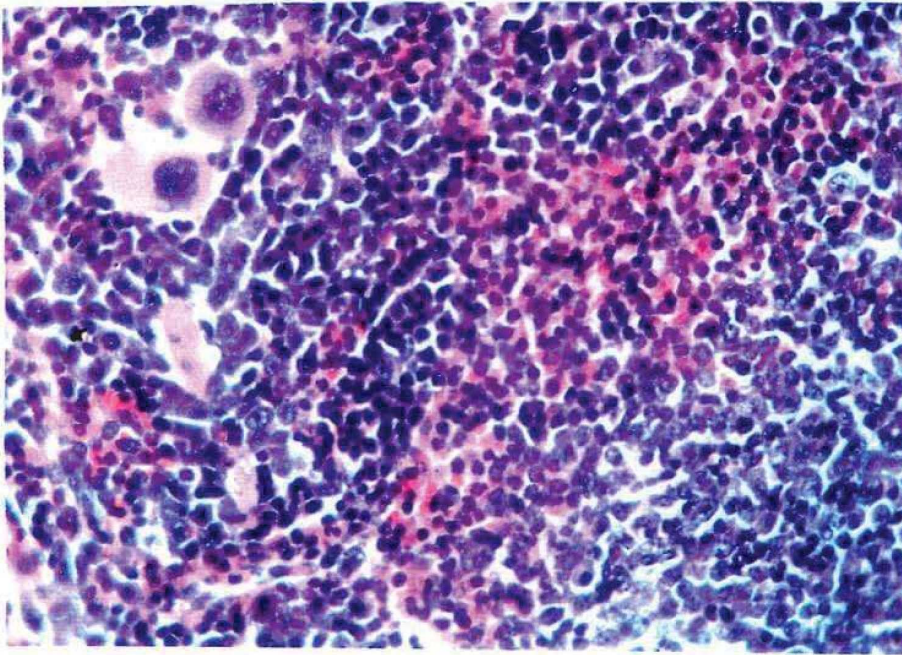
El ratón inoculado con timo infiltrado con LB murió 31 días posteriores a la transferencia, y el inoculado con timo infiltrado con LT-LBL lo hizo a los 18 días, pero estos resultados no nos permitieron hacer comparaciones puesto que no se conoció la concentración de células tumorales obtenidas de los timos infiltrados que fueron inoculadas en cada caso. No se pudo realizar el recuento ya que es imposible diferenciar morfológicamente las células LB o LT-LBL de los timocitos normales.

(6) ANALISIS HISTOPATOLOGICO

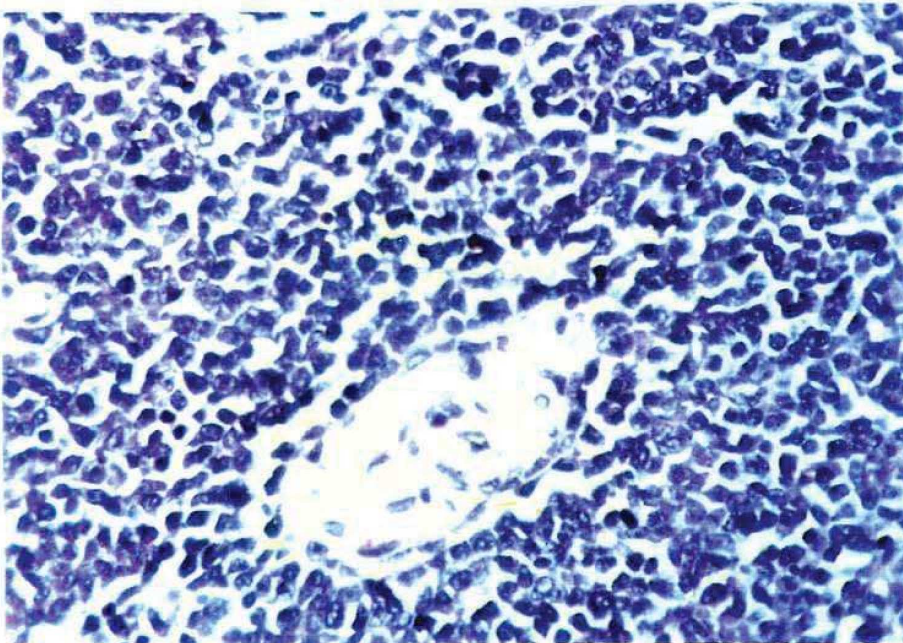
Con el objeto de determinar los órganos de infiltración de la línea tumoral y de verificar los que infiltra el tumor LB, se realizó un análisis histopatológico.

Se encontró que el tumor provocado por la línea LT-LBL produjo metástasis en bazo, hígado, ganglios, timo y médula ósea tal como se observa en la Figura 6 (a-d). Mientras que el tumor LB generó metástasis en estos órganos y también en pulmón (Figura 6-e).

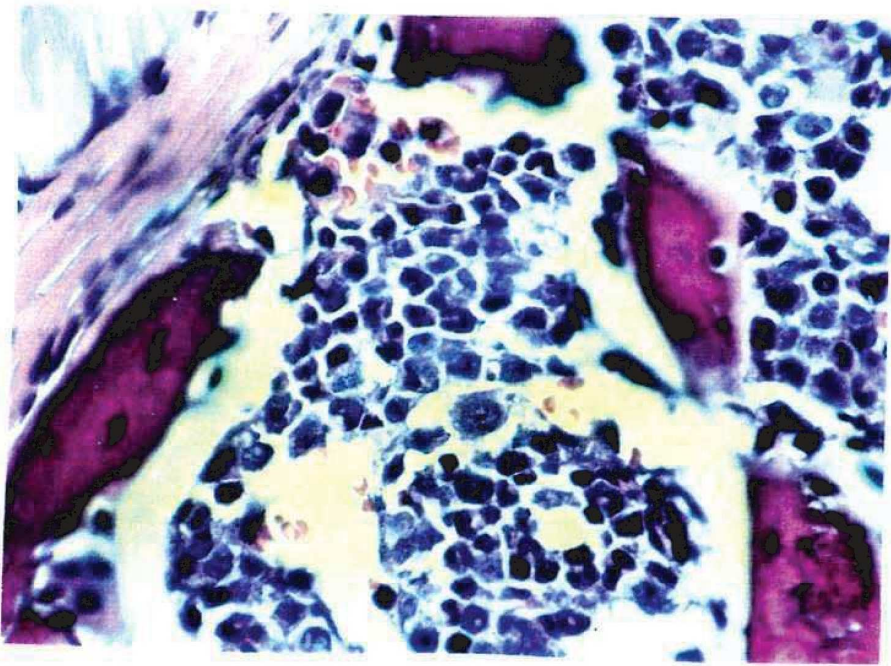
Se realizó una cinética de infiltración y se observó que los ratones inoculados con el tumor LB mostraron una invasión más rápida de los órganos comprometidos que los ratones inoculados con la línea celular. También se observó que en el último punto de esta curva los ratones que recibieron el tumor LB hiperventilaban mucho mientras que los que recibieron células de la línea LT-LBL no mostraron compromiso respiratorio.



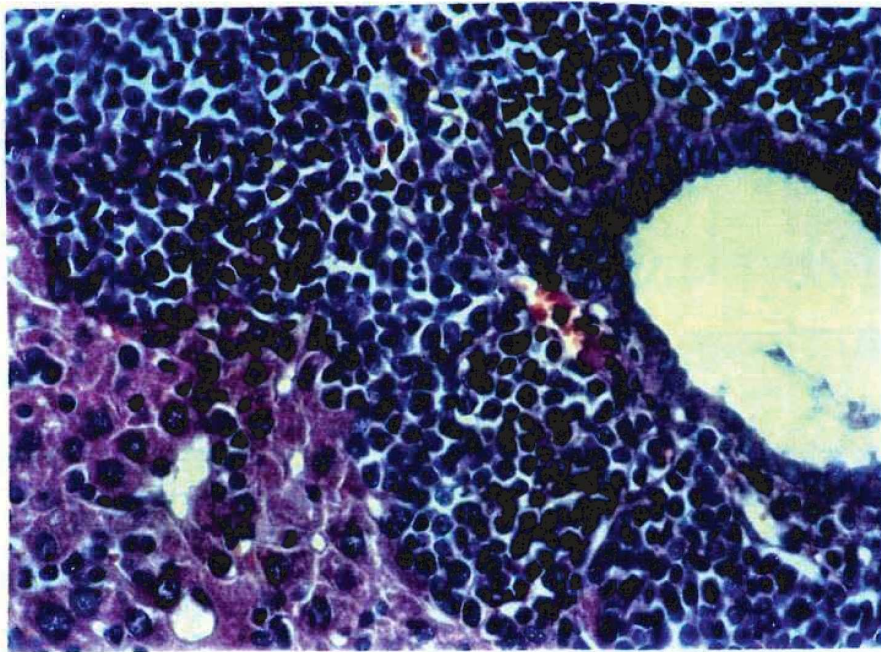
a)



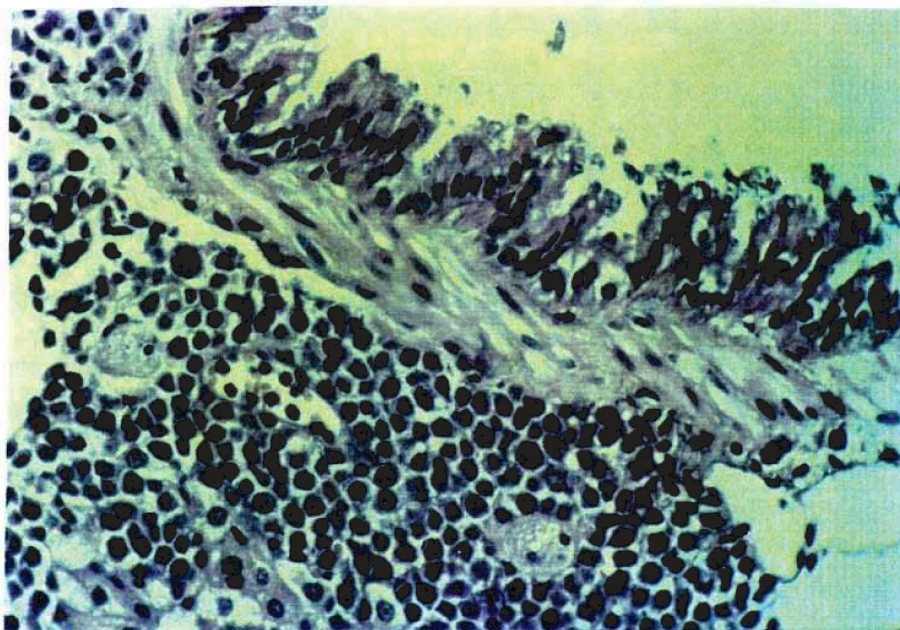
b)



c)



d)



e)

Figura 6: Cortes histológicos de los órganos infiltrados con el tumor teñidos con hematoxilina-eosina. A) bazo, B) timo, C) médula ósea, D) hígado, E) pulmón.

(7) DETERMINACION DE APOPTOSIS

Como la CsA induce apoptosis en las células LB, se quiso determinar si ocurre lo mismo con las células LT-LBL. Para ésto se realizaron estudios de apoptosis en células LT-LBL y en las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp, tratadas y no tratadas con CsA en diferentes concentraciones. La presencia de apoptosis se determinó en geles de agarosa donde se manifiesta formando escaleras de ADN fragmentado ya que el ADN se rompe en fragmentos de 200pb y sus múltiplos (Figura 8) y por la coloración de las células apoptóticas con Naranja de Acridina (Figura 9).

Calles :
 1-Marcador de PM
 2-Control (células sin ningún tratamiento)
 3-CsA (1 μ g/ml)
 4-CsA (0,5 μ g/ml)
 5-CsA (0,1 μ g/ml)
 6-Control (células tratadas con etanol)
 7-Marcador de PM

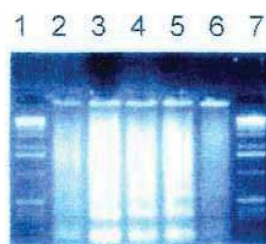


Figura 8: Determinación de apoptosis por análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN. Las LT-LBL, LT-LBLg y LT-LBLp fueron tratadas con diferentes concentraciones de CsA, y se determinó la inducción de apoptosis por la presencia del ADN fragmentado en múltiplos de 200 pb. Para las tres poblaciones celulares el resultado fue el mismo.

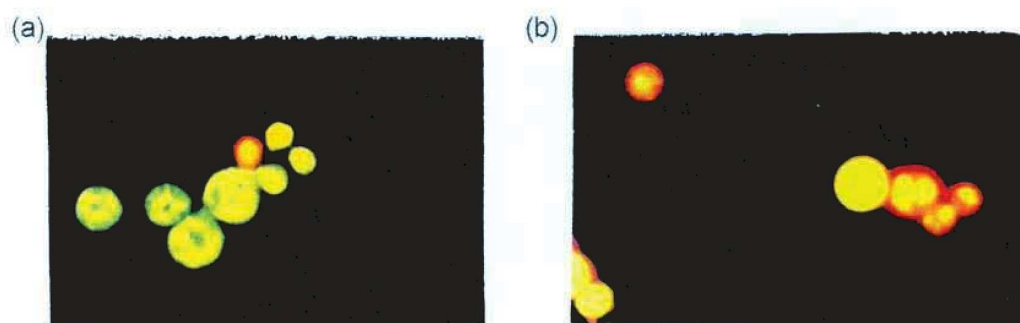


Figura 9: Análisis morfológico por microscopía de fluorescencia: Las células que recibieron los mismos tratamientos indicados en la Figura 8 fueron resuspendidas en una solución de bromuro de etidio y naranja de acridina. En la fotografía tomada en un microscopio de fluorescencia se observa que las células control (panel a) están de color verde y muestran la cromatina organizada, y las células que fueron tratadas con CsA (panel b) están de color naranja y muestran la cromatina fragmentada.

Las células que recibieron los diferentes tratamientos y que luego fueron teñidas con la solución de bromuro de etidio y naranja de acridina se contaron al microscopio de fluorescencia para determinar los porcentajes de células apoptóticas y viables. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tratamientos	Porcentaje de células viables			Porcentaje de células apoptóticas		
	LT-LBL	LT-LBLg	LT-LBLp	LT-LBL	LT-LBLg	LT-LBLp
CsA 1 μ g/ml	11	14	25	89	86	75
CsA 0.5 μ g/ml	18	58	55	82	42	45
CsA 0.1 μ g/ml	41	84	87	59	16	13
Control	88	92	81	12	8	19

Tabla 1: Se contaron 200 células diferenciando las células viables de las apoptóticas y se calcularon los porcentajes mostrados en la tabla. Como se puede observar, 1 μ g/ml de CsA indujo apoptosis en las tres poblaciones celulares, 0.5 μ g/ml indujo apoptosis en la línea LT-LBL y lo hizo parcialmente en las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp y 0,1 μ g/ml sólo indujo apoptosis parcial en LT-LBL.

(8) EXPRESION DE CD44

Como las células LB expresan la molécula de CD44 se quiso determinar si las células LT-LBL también lo expresan, y si hay diferencias en la expresión de ésta entre las dos subpoblaciones obtenidas a partir de la línea. La expresión de mensajero de CD44 se determinó en las células de cultivo y en paralelo en células en cultivo con PMA. El PMA (0,02 mM) potencia la expresión de la proteína CD44 en la superficie celular en las células LB (24), como esto podría estar relacionado con un aumento en la cantidad de ARNm, se realizaron las reacciones de RT-PCR en presencia y en ausencia de PMA.

Cuando se amplifica el cDNA de CD44 los primers utilizados amplifican CD44H y también algunas isoformas de mayor PM como se observa en la Figura 10. No se observaron diferencias en la cantidad de mensajero para CD44 en las diferentes poblaciones celulares, y tampoco se vieron diferencias al tratar las mismas con PMA.

(Figura10)

a)

Calles :

1-Marcador de PM

2-LT-LBL

3-LT-LBL + PMA

4-LT-LBLg

5-LT-LBLg + PMA

6-LT-LBLp

7-LT-LBLp + PMA

8-Control negativo

1 2 3 4 5 6 7 8



b)

Calles :

1-Marcador de PM

2-LT-LBL

3-LT-LBL + PMA

4-LT-LBLg

5-LT-LBLg + PMA

6-LT-LBLp

7-LT-LBLp + PMA

8-Control negativo

1 2 3 4 5 6 7 8

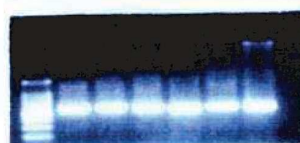


Figura 10: Expresión de CD44 determinado por RT-PCR. En el panel a) se muestra la expresión de CD44, la banda de 230 pb corresponde a CD44H y las de mayor PM a isoformas, en el panel b) se muestra el control de β -actina (banda de 570 pb). No se observan diferencias en la cantidad de mensajero entre las subpoblaciones celulares. Como se puede observar la estimulación "over night" de las células con 0,02mM de PMA no aumentó la expresión de CD44.

Para estudiar si la expresión de esta glicoproteína se modifica *in vivo* se determinó la expresión de CD44 en células obtenidas apartir de la ascitis y de órganos de ratones inoculados con la línea LT-LBL. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Calles :

- 1-Hígado
- 2-Bazo
- 3-Ganglios
- 4-Ascítis
- 5-Timo
- 6-Control negativo

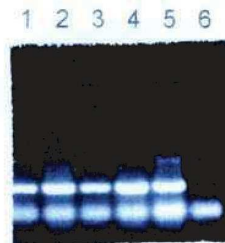
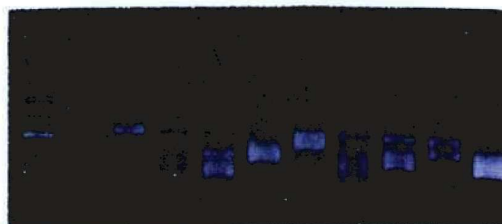


Figura 11): Amplificación del cDNA de CD44 en ascitis y órganos infiltrados de un ratón BALB/c inoculado con la línea celular LT-LBL intraperitonealmente. En todos los órganos y en la ascitis se observa CD44H en 230 pb, y en timo se observan isoformas de mayor PM.

Para determinar qué isoformas se expresan en las células LT-LBLg y LT-LBLp se realizó una segunda amplificación exón específica. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos donde se observa que las células de la subpoblación LT-LBLp presentan las isoformas v4-v6 y v8-v9, y las células de LT-LBLg v 4-v5 y v7-v8.

1-Marcador de PM
 2-exón variable 1
 3-" " 2
 4-" " 3
 5-" " 4
 6-" " 5
 7-" " 6
 8-" " 7
 9-" " 8
 10-" " 9
 11-" " 10



(b)

Calles :
 1-exón variable 1
 2" " 2
 3-" " 3
 4" " 4
 5-" " 5
 6" " 6
 7-" " 7
 8-" " 8
 9-" " 9
 10-" " 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

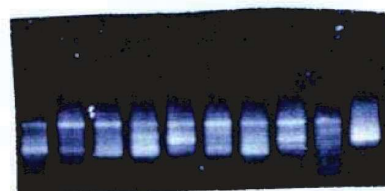
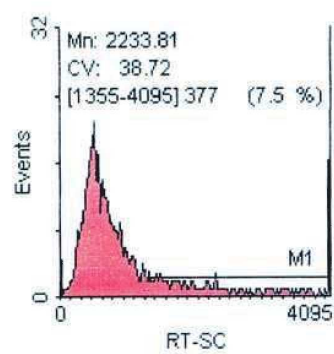


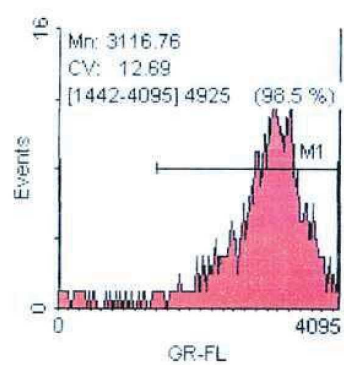
Figura 12: Segunda amplificación exón específica de CD44, el panel a) corresponde a las células LT-LBLg, y el panel b) corresponde a las células LT-LBLp. Se observa

También se estudió la expresión de la proteína de CD44 en la superficie celular por citometría de flujo (FACS) utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce todas las isoformas de CD44. En este ensayo se utilizaron las células LT-LBL, LT-LBLg, y LT-LBLp estimuladas y sin estimular con 0,02mM PMA "over night". Como se observa en la Figura 13 las células LT-LBL y LT-LBLp mostraron una alta intensidad de fluorescencia, y un alto porcentaje de células positivas, es decir que las células de estas dos subpoblaciones celulares tienen alta expresión de CD44 en su superficie. Estas expresan la molécula de adhesión CD44 basalmente, por lo que prácticamente no mostraron una mayor expresión al estimularse con PMA. En cambio en las células LT-LBLg se observó una baja expresión de CD44 en la superficie por célula, y cuando se las estimuló con PMA la expresión aumentó.

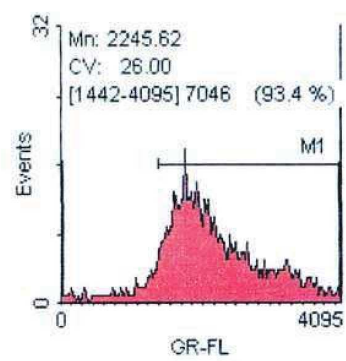
Los resultados de la citometría de flujo se muestran en la Figura 13 y fueron procesados en la Figura 14.



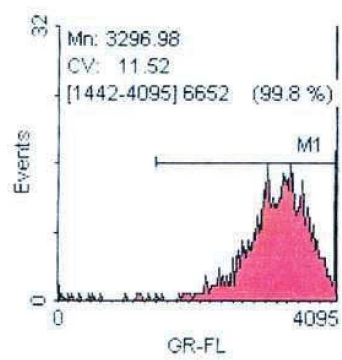
a) Control de isotipo.



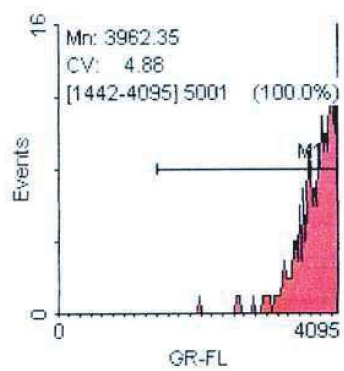
b) LT-LBL



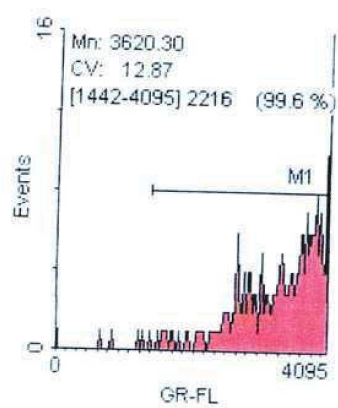
c) LT-LBLg



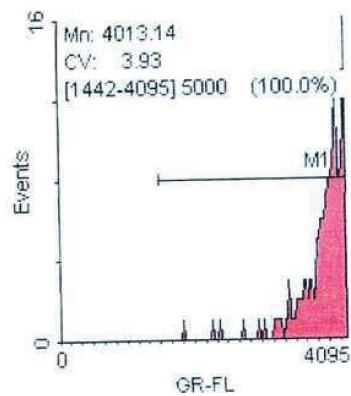
d) LT-LBLp



e) LT-LBL + PMA



f) LT-LBLg + PMA



g) LT-LBLp + PMA

Figura 13: Citometría de flujo realizadas utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce el dominio extracelular constante de CD44. El control de isotipo se realizó utilizando un suero de rata normal. Como se observa en el panel c) las células LT-LBLg expresan la proteína CD44 en baja proporción por células, éstas mostraron una baja intensidad de fluorescencia.

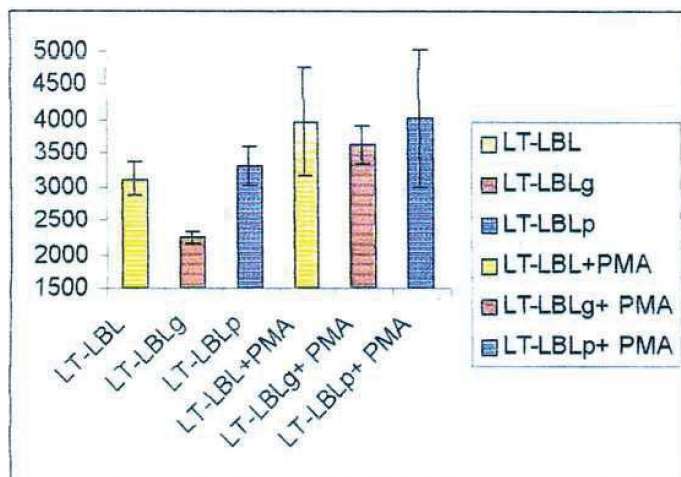


Figura 14: Los resultados de la citometría fueron procesados en este gráfico donde se muestran los "mean fluorescence channel", es decir la intensidad medio en promedio por célula. En las células sin activar se observan diferencias significativas entre la subpoblación LT-LBLg y las demás poblaciones. Al estimular las células con PMA aumentó la expresión de la molécula de CD44 en la superficie de todas las subpoblaciones celulares, aunque esto es menos notorio en LT-LBL y en LT-LBLp ya que éstas están activadas "per sé".

(9) ESTUDIO CITOGENETICO

Es conocido que muchas leucemias presentan alteraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales, por lo que se está realizando el análisis cariotípico tanto del tumor, como de la línea celular. El cariotipo en una línea puede variar en los distintos pasajes, y puede ser diferente del cariotipo de las células que le dieron origen.

Las alteraciones que se producen se van acumulando, y en general aumentan a medida que aumenta el número de eventos mitóticos de las células. Por esto se empezó evaluando el cariotipo de células de los últimos pasajes.

Algunas veces el cariotipo de las células que se adhieren a una superficie es diferente al de las que no lo hacen. Por lo que también se estudió las células LT-LBLg que crecen en suspensión y de las LT-LBLp que crecen adheridas al frasco.

En todas las células estudiadas el número modal ($2n$) fué 40 con un rango de 35 a 42 cromosomas, todos acrocéntricos. El análisis de las metafases con bandeo G mostró alteraciones numéricas respecto al cariotipo normal para el ratón. Las

metafases del tumor LB presentaron monosomías de los cromosomas 5, 13 y 16 y trisomías de los cromosomas 3, 14 y 17 (Figura 15-a). El 90% de las metafases analizadas de la línea celular y de ambas subpoblaciones presentaron una trisomía del cromosoma 14 y la pérdida del cromosoma sexual.

Las dos subpoblaciones no presentaron características cromosómicas que permitan diferenciarlas.(figura 15-b)



Figura 14: Cariotipo obtenido por bandeo G. Panel a) tumor LB donde se observan monosomías en los cromosomas 5, 13 y 16, y trisomías en los cromosomas 3,14 y 17. Panel b) Línea celular LT-LBL donde se observan la pérdida del cromosoma sexual y, una trisomía en el cromosoma 14.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Tumor LB:

Se demostró que además de infiltrar bazo, hígados y ganglios, también infiltra médula ósea, timo y pulmón hecho que hasta hoy no estaba descrito.

Se estableció por primera vez su cariotipo determinando cuales son las alteraciones cromosómicas características de este tumor.

Línea celular LT-LBL:

Se estableció la línea celular LT-LBL a partir del tumor LB luego de un cultivo prolongado. Se determinó que la misma está constituida por dos poblaciones celulares que se comportan diferente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Actualmente las células de la línea LT-LBL que llevan más de 130 pasajes se cultivan con la mitad del porcentaje de suero que el que necesitaban inicialmente, lo que muestra que se está independizando del agregado de factores externos.

Las células de la línea celular son menos agresivas que el tumor original, ratones inoculados con células de la línea muestran un tiempo medio de supervivencia mayor que ratones inoculados con el tumor original y los ratones inoculados con la línea no presentaron infiltración en pulmón.

Al igual que las células del tumor LB, 1 µg/ml de CsA induce apoptosis en las células de la línea LT-LBL y en las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp, aunque a menores concentraciones las subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp fueron menos sensibles que las células LT-LBL.

Al igual que el tumor original las células de la línea LT-LBL expresan mRNA de CD44 y la molécula CD44 en la superficie celular. Si bien todas las subpoblaciones expresan la misma cantidad de mRNA, la subpoblación LT-LBLg expresa una menor proporción de proteína.

Todas las poblaciones celulares derivadas de la línea mostraron un número modal de 40 cromosomas y las mismas alteraciones en el cariotipo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES FINALES

El objetivo principal de esta tesina fue establecer una línea celular a partir del tumor LB, para contar con un modelo experimental para comprender mejor el comportamiento y las propiedades del tumor original.

En este trabajo se realizaron estudios inmunobiológicos preliminares en la línea celular en paralelo con el tumor, de este modo se hallaron características de este linfoma T que no estaban descriptas. Por ejemplo se conocía que éste sólo infiltraba bazo, hígado y ganglios, pero nosotros sospechábamos la posibilidad de que infiltrara timo ya que siendo un linfoma T no sería de extrañar que esos linfocitos volvieran a su órgano de origen. Teniendo en cuenta que los ratones portadores del tumor hiperventilaban constantemente los días previos a morir existía la posibilidad de que el pulmón pudiera estar infiltrado. Estas sospechas fueron confirmadas primero con el ensayo de transferencia pasiva de células descripta en esta tesis, y luego por los análisis histopatológicos realizados.

Este linfoma es un muy agresivo, posee una capacidad de duplicación muy alta en un hésped singeneico, mientras que la línea celular obtenida posee una menor agresividad ya que permite una mayor sobrevida en los animales portadores.

El tumor LB es heterogéneo, es decir que estaría formado por más de un tipo de células, por lo tanto en una línea celular derivada a partir del mismo se pueden seleccionar distintos tipos de células. Desde los primeros pasajes la línea LT-LBL presentó células adheridas al frasco de cultivo y otras que crecían en suspensión, en ese momento se desconocía si la línea necesitaba de ambas subpoblaciones ya que éstas podrían estar liberando productos al medio que fueran indispensables para la sobrevida de las células. Es por ello que se tuvo la precaución de raspar la superficie del frasco de cultivo y homogenizar las células despegadas con las suspendidas al ser repicadas.

En los sucesivos repiques se fueron seleccionando las células que crecían adheridas y las que lo hacían en suspensión formando grumos. Cuando se estableció la línea se logró primero enriquecer y luego separar las dos subpoblaciones LT-LBLg y LT-LBLp, las que hoy en día podemos decir que forman dos líneas celulares obtenidas a partir de la línea LT-LBL. En los resultados de este trabajo se mostró que estas líneas tienen ritmos de crecimiento diferente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Teniendo en cuenta que las dos subpoblaciones mostraron un cariotipo similar descartamos que las diferencias de comportamiento se deban a alteraciones cromosómicas.

Una manera de caracterizar a las líneas celulares es a través de la respuesta proliferativa frente a diversos agentes que modulan el mecanismo de crecimiento celular.

La elección de mitógenos como concanavalina A se debió a su capacidad para estimular el crecimiento de células T, el uso de activadores linfocitarios como PMA (éster de forbol) por su propiedad de modular la proliferación celular. También se utilizó ciclosporina A ya que fue descrito previamente en nuestro laboratorio que en las células LB inhibe la expresión del receptor de IL-2, y del gen de IL-2 (23) y además induce apoptosis.

Las células LB son muy sensibles a la concanavalina A y al PMA, al estimularlas con éstos, los índices de proliferación aumentan. Las células de la línea mostraron que al cultivarlas con PMA se estimulan, pero responden pobremente a la concanavalina A.

Para realizar los estudios de proliferación celular se emplearon dos técnicas, la incorporación de timidina tritiada y un ensayo colorimétrico de XTT. Si bien la primera es más sensible, el ensayo de XTT es más sencillo, económico y menos riesgoso ya que no utiliza material radiactivo.

Las moléculas de adhesión que participan en procesos fisiológicos normales como desarrollo embriogénico, reparación de tejidos, angiogénesis y migración celular, permiten la adhesión de las células a otras células o a ligandos de la matriz extracelular. Las células tumorales utilizan estos procesos fisiológicos para desprenderse de su sitio de origen, migrar y colonizar diferentes tejidos generando metástasis.

El CD44 es un glicoproteína de superficie altamente heterogénea, asociada a procesos de metástasis. Está descrito que el tumor LB presenta una desregulación en la expresión de esta molécula y que la ausencia de mRNA de ésta en tejidos normales, permite detectar la infiltración del tumor en los órganos donde se produce metástasis.

Las dos subpoblaciones LT-LBLg LT-LBLp mostraron diferencias en la expresión de la proteína CD44 en la superficie celular, esto podría estar asociado a su diferente agresividad *in vivo*, ya que este tipo de moléculas de adhesión se regulan aumentando o disminuyendo su expresión y se sabe que esto está relacionado con la migración y capacidad metastásica de las células.

Si bien está claro que las características de malignidad y capacidad metastásica de un tumor resultan de la suma de muchos factores, CD44 cumpliría un importante rol, como lo hacen la mayoría de las moléculas de adhesión.


Cuando se hace una amplificación exón específica del cDNA de CD44, se amplifican las respectivas isoformas pero también CD44H, por lo que aparece más de una banda por cada exón hecho que, en este modelo, no permite sacar conclusiones precisas, por este motivo se realizarán "southern blot" para determinar que isoformas se encuentran presentes en las células LT-LBLg y LT-LBLp.

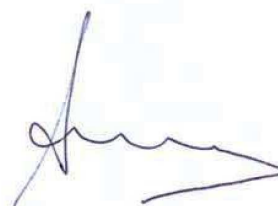
En esta tesis de licenciatura se describió el establecimiento y caracterización inmunobiológica de esta línea celular tumoral de origen murino y se las dos sublíneas con características diferentes, a partir de la primera. Estas líneas ofrecen la posibilidad de contar con células tumorales en un medio definido, experimentalmente manejable, para estudiar los estímulos y señales de activación relacionados con el desarrollo tumoral y la diferenciación linfocitaria, como así también su comportamiento frente a drogas anti-neoplásicas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lewin B : GENES IV, segunda edición . Editorial Reverté 1049, 1994 .
- (2) Weinber, RA : The integration of molecular genetics into cancer managment. Cancer 70: 1653,1991.
- (3) Salomon, E et al: Chromosome aberration and cancer. Science 254:1153,1991.
- (4) Berenblum I, and Shubik P: The role of croton oil applications, associaayed with sing painting of carcinogen, in tumor inducton of the mouse´s skin. Br J Cancer 1: 379,1947.
- (5) Cioce V, et al: Increseased expresion of laminin receptor in human colon cancer. J Nat. Cancer Inst. 83: 29,1991.
- (6) Albelda SM: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progresion and metastases. Lab. Invest. 68:4,1993.
- (7) Kahn, P: Adhesion protein studies provide new clue to metastases. Science 257: 614,1992.
- (8) Lesley J, Hyman R and Kinca PW: CD44 and interaction with extracellular and molecular biology of cancer. Adv. Immunol. 54: 271,1993.
- (9) Naor D, Sionov RV and Ish- Shalom D: CD44 structure, function and association with malignant process. Adv. Cancer Res.71:241,1997.
- (10) Beverley PCL. Immunology of cancer. Imtroduction to the celular and molecular biology of cancer. Oxoford Universite Pres. New York:414,1991
- (11) Klein J. Brother Juniper´s inocclusive experiment: a poetic hhistory of the H-2 complex. H-2 antigens: Genes, molecules, function. Plenun Pres, New York 13,1993.
- (12) Burnet FM. Immunological aspect of desease. Lancet 1: 1171,1967.
- (13) Burnet FM: Immunological survelliane in neoplasia: Transplant Rev. 7: 3,1970.
- (14) Hajos S., Mongini C., Waldner C., Sanchez M., Gravisaco M.J., Roig I., Fernandez T., Alvarez E.: Caracterización inmunobiológica de la leucemia murina LB y la línea celular LBc. Medicina 56, 45, 1996.
- (15) Ruggiero R.A, Bustuoabad O.D, Bonfil R.D, Meiss R., Pascualini C.D.:Concomitant immunity murine tumors of non-detectable immunogenicity.Br. J. Cancer 51, 37, 1985.
- (16) Meiss R., Bonfil R.D., Ruggiero R.A., Pascualini C.D,: Histologic aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors.JNCI, vol 76, nº 6, 1163, 1990.

- (17) Alvarez E., Waldner C., Mongini C., Fernandez T., Hajos S : Marcadores de superficie y factores humorales en una leucemia murina espontánea. Medicina 49, 253, 1989.
- (18) Zahalka M., Okon E., Gasslor V., Holzmann B., Naor D.: Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44 and Hyaluronate-Dependent. The Journal of immunology 154, 1995.
- (19) Lugasi H., Hajos S., Murphy J.R., Strom T.B., Nichols J., Peñarroja C., Naor D: Murine spontaneous T-cell leukemia constitutively expressing IL2-receptor. Int. J. Cancer 45, 163, 1990.
- (20) Malek T., Porter B.O, Wen He Y.: Multiples δ c- dependent cytokines regulate T-cell development. Immunology Today, vol 20,72, 1999.
- (21) Hirano H et al : CD44 isoform expression mediated by alternative splicing : tissue-specific regulation in mice. Int. Imm.6 (1), 49, 1993.
- (22) Sambrook J, Fritsh EFF and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2^{do} edition . Cold Spring Harbor-1991.


Grinda Ernst



DRA. SILVIA E. HAJOS
PROFESORA TITULAR
INMUNOLOGIA

FCE y N BIBLIOTECA