

Tesis de Posgrado

Factores citoplasmáticos linfoides que controlan la división celular

Fejes, Marcela Elena

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Fejes, Marcela Elena. (1983). Factores citoplasmáticos linfoides que controlan la división celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1819_Fejes.pdf

Cita tipo Chicago:

Fejes, Marcela Elena. "Factores citoplasmáticos linfoides que controlan la división celular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1819_Fejes.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FACTORES CITOPLASMATICOS LINFOIDES QUE CONTROLAN

LA DIVISION CELULAR

AUTOR : Lic.MARCELA ELENA FEJES

DIRECTOR: Dr.ALOIS E. BACHMANN[†]

DIRECTORA SUSTITUTA:Dra.MARIA MARTA DE E. DE BRACCO

LUGAR DE TRABAJO:SECCION INMUNOLOGIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN

CIENCIAS QUIMICAS

- 1983 -

- 1819
Ej. 2

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo reconocimiento al Dr. Alois E. Bachmann quien me recibió en su Sección y me brindó la oportunidad y el apoyo de perfeccionarme en la investigación e iniciarme en mi trabajo de Tesis.

Agradezco la dirección de la Dra. María Marta de E. de Bracco con cuyo apoyo humano y científico me fue posible concretar este trabajo.

Asimismo agradezco a la Dra. Ana María Brunengo su valiosa cooperación como mi Consejera de Estudios.

Deseo agradecer especialmente a mis compañeras de laboratorio sin cuyo apoyo y afecto me hubiera sido difícil el trabajo diario.

Agradezco la colaboración de la Sección Leucemia Experimental y en especial al Sr. Juan Portaluppi por la dedicación puesta en mis experimentos con animales.

Finalmente, vaya mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas sin cuyo apoyo económico hubiera sido imposible la realización de esta Tesis.

I N D I C E

	Pag.
Introducción.....	1
A.- Mecanismos que controlan la división celular normal.....	2
B.- Estructura y caminos metabólicos de la célula normal.....	5
B I.-Propiedades de la membrana celular.....	5
B II.- Organización y distribución de la red enzimática.....	8
B III.- Fenómenos de replicación.....	10
C.- Las alteraciones estructurales y metabólicas de la célula maligna.....	15
C I.-Alteraciones en la membrana celular.....	17
C II.-Alteraciones en la red enzimática.....	21
C III.-Alteraciones en la replicación del ADN.....	22
D.- Linfocito normal y transformado.....	22
E.- Inhibidores celulares endógenos: Las chalonas: I Origen, pro- piedades y mecanismos de acción.....	26
E II.-Uso clínico de las chalonas.....	32
F.- Modelo de estudio elegido.....	35
Materiales y métodos.....	38
1.- Preparación de linfocitos de sangre periférica humana.....	38
2.- Preparación de linfocitos murinos.....	38
3.- Obtención de linfocitos de timo, amígdala y ganglio humano.	38
4.- Obtención de linfocitos de médula ósea humana.....	39
5.- Obtención de linfocitos leucémicos.....	39
6.- Cultivo de líneas celulares.....	39
7.- Ensayos para comprobar pureza e identificación de los linfo- citos obtenidos.....	39

	Pag.
8.- Cultivo de linfocitos.....	40
9.- Estimulación blástica de linfocitos.....	40
10.- Función supresora T-T inducida por Con-A.....	41
11.- Cultivo de líneas celulares.....	42
12.- Preparación de núcleos aislados.....	42
13.- Medida de la síntesis de ADN.....	43
i) Para células enteras.....	43
ii) Para núcleos aislados.....	43
14.- Extracción del ADN.....	43
15.- Caracterización del ADN obtenido.....	44
i) Enzimática.....	44
ii)Análisis del tipo de ADN.....	44
iii)Gradientes de QCs(Cloruro de Cesio).....	44
iv)Gradientes de sacarosa.....	45
16.- Preparación de extractos citoplasmáticos (Chalonas) (EC).....	45
17.- Caracterización del extracto citoplasmático obtenido.....	45
i) Enzimáticas.....	45
ii)Electroforéticas.....	46
iii)Columnas de Sephadex.....	46
18.- Ensayos de actividad de extractos citoplasmáticos.....	46
19.- Ensayos de efecto biológico del extracto citoplasmático.....	46
i) Efecto sobre la incidencia de un tumor alogeneico.....	46
ii)Medida de citotoxicidad "in vitro".....	47
iii)Medida de hipersensibilidad tardía.....	47
iv) Reacción de injerto contra huesped.....	48
v) Efecto de E.C. sobre la incidencia,latencia y sobrevida de tumores.....	48
Resultados.....	49
I.- Comparación entre la síntesis de ADN de linfocitos humanos en reposo,linfocitos humanos estimulados inespecíficamente y líneas celulares linfoblastoides importantes.....	49

	Pag.
1.- Estudio en células enteras.....	49
2.- Estudio en núcleos aislados.....	49
3.- Análisis enzimático del ADN sintetizado en los 3 sistemas.....	49
4.- Análisis del tamaño de ADN sintetizado.....	49
5.- Puntos de replicación "in vivo" e "in vitro".....	49
II.-Efecto de factores celulares solubles endógenos de origen lin- foide humano sobre la síntesis de ADN.....	52
1.- Efecto de extractos citoplasmáticos (EC _L) de linfocitos norma- les en reposo sobre distintas células.....	52
2.- Dosis de EC _L vs. efecto sobre la actividad mitótica.....	53
3.- Características del extracto citoplasmático linfoide normal EC _L	53
4.- Reversibilidad del efecto inhibitorio.....	54
5.- Efecto producido por extractos citoplasmáticos humanos de dis- tintos orígenes tisulares sobre células linfoides.....	55
6.- Diferencias entre los EC _L normales y neoplásicos.....	55
III.Efecto de extractos citoplasmáticos murinos "in vitro".....	56
IV.-Efecto de extractos citoplasmáticos "in vivo".....	56
1.- Efecto sobre el crecimiento de un tumor alogeneico.....	56
2.- Efecto sobre los fenómenos de citotoxicidad.....	57
3.- Efecto sobre reacciones de hipersensibilidad tardía.....	58
4.- Efecto sobre reacciones de injerto contra huésped.....	58
5.- Efecto sobre crecimiento tumoral linfoide:incidencia,latencia y sobrevida.....	59
6.- Efecto sobre un tumor no linfoide murino.....	60
V.- Efecto de extractos citoplasmáticos sobre poblaciones linfoides identificadas.....	61
1.- Efecto sobre linfocitos murinos estimulados "in vitro".....	61
2.- Efecto sobre poblaciones reguladoras: linfocitos supresores...	61
Tablas y Figuras.....	
Tabla I.....	63

	Pag.
Figura 1.....	64
Figura 2.....	65
Tabla II.....	66
Figura 3.....	67
Figura 4.....	68
Tabla III.....	69
Figura 5.....	70
Tabla IV.....	71
Figura 6.....	72
Tabla V.....	73
Tabla VI.....	74
Figura 7.....	75
Tabla VII.....	76
Tabla VIII.....	77
Tabla IX.....	78
Tabla X.....	79
Tabla XI.....	80
Tabla XII.....	81
Figura 8.....	82
Figura 9.....	83
Figura 10.....	84
Tabla XIII.....	85
Tabla XIV.....	86
Discusión.....	87
Conclusiones.....	101
Bibliografía.....	

INTRODUCCION

Los seres vivos se distinguen de los objetos inanimados fundamentalmente por dos características: la posibilidad de aumentar su tamaño utilizando energía como sustrato y la capacidad de replicarse. Como resultado, pueden crecer y proliferar. Los seres vivos están compuestos por células. Una población celular normal, aumenta de tamaño dentro de límites claros, en los cuales está determinado cuán seguido puede una célula dividirse sin crecer y cuánto puede crecer sin dividirse. El crecimiento ordenado y controlado es esencial para el desarrollo y mantenimiento de un animal normal.

En organismos unicelulares, la velocidad de crecimiento y proliferación puede responder directamente a variaciones en los nutrientes esenciales que toman del medio ambiente. Pero en criaturas más complejas, como los mamíferos, los niveles de nutrientes extracelulares son relativamente invariables y existen otros controles que regulan el crecimiento y la proliferación.

Los tejidos y órganos normales de un mamífero, mantiene una masa uniforme a lo largo de la vida adulta; esto implica que existe un balance entre la renovación y la muerte celular y además que el número de células funcionales es directamente proporcional a su demanda. Los mecanismos que regulan este proceso controlado, son muchos y son selectivos para las distintas células del organismo. La ausencia o falla de una regulación apropiada puede dar lugar a un crecimiento descontrolado y a malignidad.

Considerar los mecanismos que regulan el crecimiento normal nos lleva inevitablemente a especular sobre: cómo y por qué fallan estos mecanismos durante los procesos neoplásicos? Para ello es necesario conocer:

- A.- Los mecanismos que controlan la división celular normal
- B.- La estructura y los caminos metabólicos de la célula normal.

C.- Las alteraciones estructurales y metabólicas de la célula maligna.

A.- MECANISMOS QUE CONTROLAN LA DIVISION CELULAR NORMAL

En condiciones normales, las poblaciones celulares se pueden dividir en tres tipos, de acuerdo a su comportamiento mitótico. En primer lugar, se encuentran los tejidos estáticos (neuronas y células musculares es triadas), que son incapaces de proliferar. En segundo lugar, se encuentran los tejidos en expansión (hígado, riñón, etc.), que poseen un pequeño número de células en mitosis. La cantidad de células que pueden dividirse, disminuye con la edad y el nivel de las mismas es bajo en el adulto, cuando el crecimiento de los órganos ha cesado. En tercer lugar, están los tejidos en renovación (epidermis, células hematopoyéticas y gametas); tienen como característica fundamental, la capacidad de proliferar continuamente y dar origen a células diferenciadas que pasan al compartimento funcional de los tejidos. En los tejidos mitóticos, aquellos que están en renovación o expansión, la producción de células nuevas se balancea con la pérdida de un número equivalente, ya sea a través de mecanismos de migración o de degeneración.

La homeostasis tisular, tiende a mantener la masa invariable utilizando mecanismos de regulación que deben ser sensibles y precisos. La esencia de estos mecanismos se desconoce, pero se admite que están basados en fenómenos de retroalimentación permanente, realizando un equilibrio entre células que maduran y aquellas que mueren. Se han descrito dos mecanismos de retroalimentación o "feedback". De los estudios en piel, hígado y riñón, surgió hace un tiempo una hipótesis que explicaba el control mitótico a través de un feedback positivo y se propuso que los tejidos residuales producirían sustancias capaces de estimular la mitosis de una manera específica (1), Los datos experimentales no han aportado argumentos que favorezcan esta hipótesis. en especial la ausencia de alguna sustancia endógena que pudiera considerarse como hormona estimulante de la regenera-

ción de tejidos y órganos. El advenimiento de técnicas como el cultivo de tejidos y establecimiento de líneas celulares, permitió avanzar mucho en el control del crecimiento celular (2-9). Las células no transformadas poseen una regulación dependiente de la densidad. Esto significa que las células tienden a crecer hasta una densidad saturante y luego se detienen. Esta regulación sería independiente de los requerimientos nutritivos del medio en que se encuentran las células.

Inicialmente se pensó que la regulación densidad-dependiente podría atribuirse a fenómenos de inhibición por contacto. Sin embargo es mayor la evidencia a favor de una regulación a través de factores macromoleculares del suero o nutrientes de bajo peso molecular. A medida que aumenta la densidad celular la presencia de estos factores se hace necesaria. Además de ser fundamental la superficie disponible para el crecimiento celular, se han descrito factores hormonales como insulina, hidrocortisona, factores de crecimiento fibroblástico, y epidérmico, prostaglandinas, nucleótidos cíclicos, iones calcio, aminoácidos y enzimas proteolíticas, (10) como factores endógenos capaces de controlar el crecimiento celular.

Existe un grupo de mediadores químicos que ejercen fenómenos de regulación extracelular específica (12). Son factores biológicamente activos fundamentales en las interacciones celulares efectivas. Según su origen se las llama linfoquinas, monoquinas o citoquinas y afectan a distintos tipos de células, especialmente a aquellas involucradas en la respuesta inmunológica. Entre sus funciones se encuentran estimular y/o inhibir el crecimiento celular, aumentar y/o disminuir ciertas respuestas y ser citotóxicas ya sea directa o indirectamente. Ejemplos de estas sustancias hay muchos. Entre ellos: TCGF (T cell growth factor), IDS (inhibitor of DNA synthesis), MF (mitogenic factor), interferon, etc.

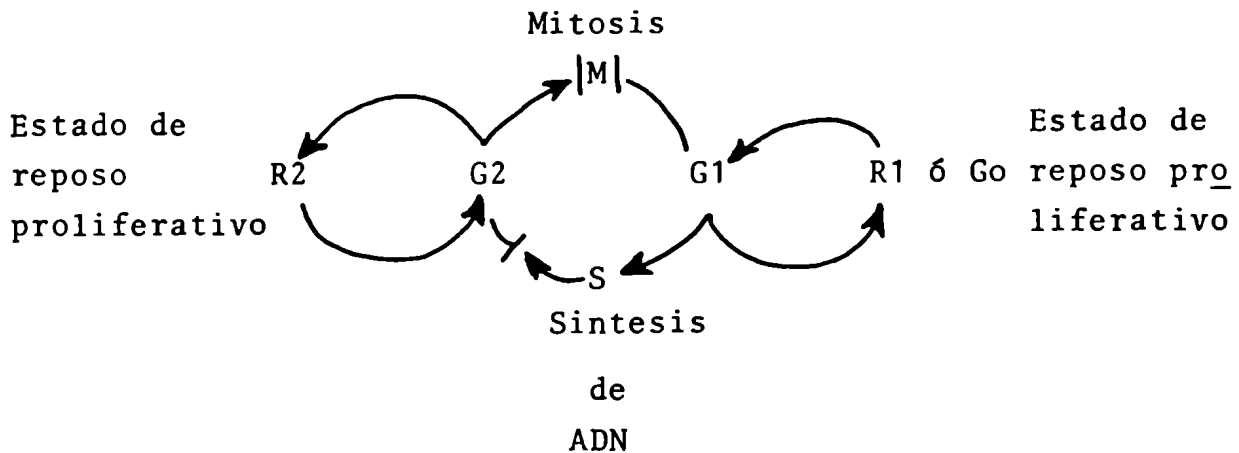
Varias teorías actuales sugieren que la actividad mitótica de los tejidos es controlada por un mecanismo de retroalimentación

negativo. En estos modelos se postula que las células diferenciadas o terminales producen mensajeros químicos capaces de inhibir la proliferación de las células progenitoras potenciales del mismo tejido. Estos inhibidores endógenos actuarían deteniendo transitoriamente la progresión de las células a lo largo del ciclo celular y ejercerían un control local fino sobre la actividad proliferativa de los tejidos mitóticos (12).

Como se puede ver en la Figura a, cualquier punto en el cual actúe un inhibidor traería como consecuencia directa la imposibilidad de continuar el proceso de división celular; se puede estimular a las células a pasar del ciclo mitótico a estados de reposo mitótico (de G1 a R1 y de G2 a R2), aumentando la duración de las fases G1 o G2 y posiblemente de la fase S, etc.

Dado que este es el tema central de mi tesis se verá en forma más extensa en los capítulos siguientes.

FIGURA a



B.- ESTRUCTURA Y CAMINOS METABOLICOS DE LA CELULA NORMAL

El intento breve de describir aspectos dinámicos de la organización celular involucra fundamentalmente: I) propiedades de la membrana celular; II) organización y distribución de la red enzimática y III) aspectos vinculados a los fenómenos de replicación.

Cualquier cambio en la superficie celular, alteración en las enzimas claves de los caminos metabólicos y en el ordenamiento genético por daño o error de información que altere la expresión genética, causará como efecto directo que las células normales escapen a ese control a la cual están sujetas.

B I.- Propiedades de la membrana celular:

Las membranas celulares están compuestas por lípidos, proteínas oligosacáridos y polisacáridos (13). La distribución de estos componentes está hecha de tal manera que sea máxima la energía libre que rodea a cada constituyente. Para los lípidos (como los fosfolípidos), que presentan una estructura asimétrica tanto en su porción hidrofílica como en la hidrofóbica, los residuos de hidratos de carbono en solución tienden a asociarse y excluir agua, mientras que las cabezas iónicas tienden a buscar interacciones con la fase acuosa. Estas interacciones favorecen la formación de una doble capa lipídica continua que secuestra los residuos de los hidratos de carbono de la fase acuosa (13,15). Los lípidos pueden formar dominios específicos y asociarse a proteínas de la membrana, formando complejos lipoproteicos (14). Pese a que los lípidos pueden encontrarse en estado de "congelamiento", la mayoría de las moléculas lipídicas se encuentran en un estado fluído y difunden en forma libre en el plano de la membrana.

Respecto a las proteínas de la membrana, existen básicamente dos tipos: aquellas estabilizadas en la membrana por interacciones hidrofóbicas y aquellas estabilizadas en la membrana por interacciones hidrofílicas. Las primeras son llamadas proteínas integrales de la membrana

y están involucradas en fenómenos de transporte (de iones y metabolitos) (13,14). Las proteínas son globulares e interaccionan tanto con la parte hidrofílica como con la hidrofóbica de la membrana. Se encuentran intercaladas dentro de una doble capa fluída lipídica a distintas profundidades, dependiendo de la secuencia de aminoácidos y del plegamiento tridimensional. Algunas proteínas integrales pueden atravesar la membrana, dejando secuencias de péptidos hidrofílicos tanto del lado externo como del lado citoplasmático.

El segundo tipo de proteínas se denomina proteínas periféricas de membrana y no parecen ser esenciales para las funciones estructurales básicas. Generalmente están asociadas a proteínas integrales y glicolípidos a través de interacciones iónicas que pueden romperse con altas concentraciones salinas o con agentes quelantes. Así como la remoción de proteínas periféricas de membrana no da lugar a destrucción o solubilización de las membranas, la de las proteínas integrales se acompaña generalmente de una disolución de la estructura de la membrana.

La membrana celular en su forma más simple puede considerarse como una solución bidimensional de un mosaico de proteínas integrales de la membrana dentro de una bicapa fluida lipídica. Este concepto de la arquitectura de la membrana tiene gran implicancia en la comprensión de sus funciones. Puede haber reordenamiento de los componentes. Por ejemplo: glicoproteína y glicolípidos de membrana pueden disponerse de tal forma que los residuos de hidratos de carbono queden expuestos exclusivamente hacia la cara externa de la membrana celular donde funcionarían como receptores específicos de, anticuerpos, hormonas, lectinas, virus y otros agentes (14).

Otro detalle importante en la organización de la membrana es que los componentes pueden difundir lateralmente dentro del plano de la membrana. Esta difusión ofrece un mecanismo potencial de cambios rápidos y reversibles en la topografía de algunos componentes específicos.

Algunas proteínas y glicoproteínas pueden difundir lateralmente; otras parecen inmóviles o "ancladas" dentro de la membrana (16). Las distintas movilidades descritas dentro de la membrana plasmática, sugieren que la célula poseería un mecanismo de control que restringe la movilidad de ciertos componentes para mantener una distribución topográfica ordenada de las moléculas de la superficie celular. Este modelo de organización puede ser altamente específico, difiriendo cada tipo de célula y en regiones específicas de la misma célula, y puede variar durante los distintos estadios de la actividad celular. Los patrones de distribución topográficos moleculares deben ser fundamentales en la especificidad inherente a la organización celular. Deben ser importantes en los eventos que determinen el contacto celular, en fenómenos de reconocimiento y en la transmisión de información dentro de los tejidos. La redistribución de los componentes superficiales puede ocurrir como respuesta a estímulos del medio ambiente (mitógenos, factores séricos, hormonas, lectinas y anticuerpos).

La movilidad traslacional de ciertas clases de proteínas integrales está controlada por elementos del esqueleto citoplasmático compuesto por microtúbulos y microfilamentos que aparecen ligados de alguna manera a las proteínas integrales (13,14,16,17). Este concepto se denomina control cito-esquelético trans-membrana.

Los microtúbulos son estructuras rígidas tubulares formados predominantemente por una subunidad proteica llamada tubulina y pueden encontrarse en el núcleo y en citoplasma de la célula (18). Pueden reordenarse en forma rápida y reversible en presencia de iones calcio y de nucleótidos cíclicos. Se pueden disociar con presión y con bajas temperaturas. Su asociación se impide en presencia de alcaloides como la colchicina y la vinblastina.

Los microfilamentos son estructuras finas de doble hélice que se asocian a la cara interna de la membrana. La presencia de actina, miosina y tropomiosina han contribuido a la certificación de que se trata de elementos contráctiles importantes en la locomoción celular, en los cambios de

forma celular, en el movimiento de componentes de la membrana plasmática y en el flujo citoplasmático.

Aunque los microtúbulos y los microfilamentos no son verdaderos componentes de la membrana celular, su control sobre la movilidad y la distribución de ciertos receptores superficiales, indica que de alguna manera son componentes ligados a la trans-membrana y por esa característica se los clasifica como componentes asociados a la membrana.

El conocimiento del control de los receptores de la superficie celular a través del sistema citoesquelético trans-membrana, permitió evaluar los mecanismos de acción de distintos agentes. A tono de ejemplo: se sabe que los anestésicos locales afectan los microtúbulos y microfilamentos intracelulares a través de su asociación con fosfolípidos acídicos. Así aumentan la aglutinabilidad por lectinas, redistribuyen los receptores para lectinas e inhiben el fenómeno de "capping" en células linfoides (19).

Los cambios en las propiedades de la superficie de la célula tumoral pueden contribuir a que la misma evada los muchos controles y restricciones a las cuales están sujetas las células normales.

B II.- Organización y distribución de la red enzimática.

La organización de la red enzimática de la célula normal pudo aclararse y evaluarse gracias a tres avances científicos importantes: i) el concepto de correlación molecular (20), ii) el uso de modelos experimentales biológicos (21) e iii) el concepto de las enzimas claves de los caminos metabólicos (22,23).

i) El genoma de los mamíferos es una entidad replicativa auto-instructiva que contiene toda la información para dirigir e integrar la síntesis de macromoléculas. El concepto de correlación molecular propuso que la estrategia bioquímica del genoma neoplásico podía identificarse dilucidando el perfil de la expresión genética revelada por la actividad, concentración y el aspecto isoenzimático de las enzimas claves.

Se probaron ciertas hipótesis en modelos experimentales usando hepatomas con distintas velocidades de crecimiento. Asumiendo que las actividades enzimáticas medidas correspondían a enzimas claves y que los ensayos reproducían las condiciones cinéticas del hígado, cambios en la actividad enzimática deberían demostrar variaciones en la concentración enzimática final. De esta manera, estudiando el producto final de la expresión del programa genético (concentración de una enzima específica), se podrían determinar alteraciones cuali y cuantitativas de la estrategia de esa expresión. Así se encontraron alteraciones ligadas a la progresión maligna (expresiones de malignidad en distintos estadios), alteraciones ligadas a la transformación y alteraciones circunstanciales (sin relación alguna con malignidad).

ii) A través de hepatomas transplantables inducidos químicamente, se obtuvieron tumores del mismo origen celular pero con distintos grados de malignidad. Estos modelos permitieron investigar la transformación y la progresión desde el punto de vista bioquímico (21). Para ello se utilizaron diversas técnicas independientes: biológicas (tamaño y volumen tumoral), citológicas (recuentos mitóticos), histológicas (grados de diferenciación) y bioquímicas (degradación de timidina) (24). Otros modelos desarrollados fueron los tumores renales (25) y otras neoplasias (26).

iii) Las enzimas claves son aquellas que controlan la velocidad y la dirección del flujo de caminos metabólicos sintéticos y catabólicos opuestos y competitivos. La regulación de la expresión genética y su reprogramación en las células neoplásicas se realiza a través de estas enzimas claves. Los criterios principales para identificar estas enzimas son los siguientes: su papel biológico, su ubicación en el camino metabólico y sus propiedades regulatorias. Como ejemplos se pueden citar: timidina quinasa, enzimas gluconeogénicas, ADN y ARN polimerasas, inosina monofosfato dehidroquinasa, piruvato quinasa, etc.

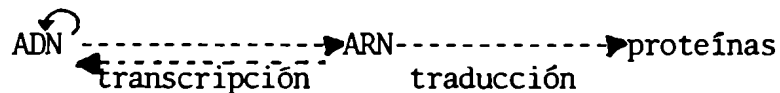
Existen otras enzimas que no son claves, ya que no son limitantes. Generalmente están presentes en exceso y su actividad no se altera por ningún

tipo de regulación endócrina o nutricional. Tampoco se correlacionan con procesos de transformación o progresión neoplásica. Ejemplos de ellas son: fosfohexosa-isomerasa, aldolasa, GMP-quinasa, dihidro-ortooxidasa, etc.

Es de esperar que no todas las enzimas estén ligadas a procesos de transformación porque la integración de la expresión genética opera a través de un control sobre un número relativamente pequeño de enzimas claves. El análisis de las propiedades y el comportamiento de las enzimas claves y su relación con el grado de malignidad ha permitido correlacionar las alteraciones bioquímicas con el comportamiento biológico de los tumores.

B III.- Fenómenos de replicación

Como ya se mencionó, para que el proceso de división celular se desarrolle normalmente, es necesario que todos los pasos involucrados en él, se realicen correctamente. Es así como debe cumplirse con el dogma de la biología molecular sintetizado en :



(esquema que marca la autoduplicación del ADN y la posibilidad de reversión ARN/ADN gracias a la transcriptasa reversa.).

El primer evento que conduce a la división, es la replicación del material que lleva la información genética de una célula contenida en el ácido deoxiribonucleico (ADN). Si existen fallas en la replicación de ese material, se transcribirán y traducirán fallas a lo largo de todo el proceso de división, dando lugar a una célula hija distinta o a un proceso abortivo.

El ADN es metabólicamente estable y se encuentra en el núcleo celular. La cantidad de ADN por número diploide de cromosomas en un organismo es constante y es igual al doble de ADN que posee una célula espermatozoide. Frente a lesiones o degradaciones, la célula posee mecanismos de reparación; pero una vez incorporado el precursor, es difícil que lo

abandone. De allí que la mayoría de los citostáticos utilizados (ej.:arabinosilcitosina) actúen de manera competitiva con los precursores del ADN. La molécula de ADN es una doble hélice cuyas cadenas, dispuestas en forma antiparalela, están unidas por puentes de hidrógeno. Las cadenas están formadas por polinucleótidos cuyos azúcares están unidos a través de grupos fosfato (27). Los nucleótidos pueden ser de base purínica (adenosina y guanina) o pirimidínica (citosina y timina). llevan adosado una deoxirribosa que unen también con grupos fosfato. La adenina es complementaria a la timina y la guanina a la citosina. Por lo tanto en cualquier célula se debe cumplir que la relación G/C sea unitaria. Las variaciones en la relación $A + T/G + C$ confieren propiedades variables a la molécula de ADN.

Se han descripto tres mecanismos de replicación posibles: conservativa, semiconservativa y difusa. Gracias a los experimentos de Messel-son y Stahl (28) se vió que las moléculas hijas resultantes de la duplicación de ADN contienen una hebra de la madre y una hebra sintetizada de novo durante la replicación. Por lo tanto la duplicación del ADN se califica como semiconservativa.

La unión de los distintos precursores del ADN se realiza a través de una enzima clave: la ADN-polimerasa-ADN-dependiente. La misma cataliza la síntesis de los enlaces internucleotídicos del ADN a partir de una mezcla de nucleótidos trifosfato, con la consiguiente liberación de fósforo y energía al medio. Se han descripto varios tipos de ADN-polimerasas tanto ARN-dependientes como ADN-dependientes (31,33,34). Durante los procesos de replicación la actividad de esta enzima aumenta de 30 a 220 veces. La magnitud de este aumento ha permitido realizar estudios sobre los eventos moleculares que conducen a la inducción de la polimerasa (29).

La posibilidad de inhibir la enzima con distintos agentes "in vitro" (30,31) ha permitido demostrar que la inducción de ADN polimerasa es esencial para la división celular y que además el fenómeno de inducción

es dependiente de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) (32). Además de la ADN polimerasa son esenciales otras enzimas como la ADN-ligasa y la endonucleasa, para la síntesis del ADN.

Una mutación puntual en la síntesis del ADN, da lugar a un cambio de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de una proteína. Pauling en 1955, demostró como la anemia falciforme se debía a una alteración en la molécula de hemoglobina. Esa alteración consiste en un cambio de valina por ácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina normal.

Las mutaciones en el ADN hijo pueden deberse a distintos motivos: radiación, análogos de los nucleótidos, carcinógenos químicos varios, infecciones virales, agentes alquilantes, antibióticos y/o producirse espontáneamente. Los daños producidos pueden ser formaciones de mellas en una de las hebras de ADN o producción de dímeros pirimidínicos (timidínicos). Ambos daños bloquean la replicación normal. Sin embargo, la célula tiene un mecanismo capaz de reparar los daños producidos ya sea por ruptura de cadenas, producción de espacios ("gaps") o cambios de bases por medio de un sistema enzimático. No se interrumpe totalmente la replicación del ADN por existir fallas en él. El proceso de reparación post-replicacional puede realizarse de dos maneras: i) por fotoreactivación se pueden romper los dímeros pirimidínicos in situ e ii) por reparación de corte, el proceso de llenado de los espacios se realiza mediante la información proveniente de la hebra hermana que se recombina. El trozo de hebra paterna de esa hebra hermana que contiene la secuencia de nucleótidos que falta, se inserta enzimáticamente en el vacío opuesto al dímero. Existen patologías como la Xeroderma pigmentosa en la cual se forman dímeros de timina por efecto de la luz solar, que inducen carcinomas "in situ". Esto ocurre porque fallan los mecanismos de reparación post-replicacional.

La célula resuelve el problema de transmitir su información cifrada en el ADN nuclear, transcribiéndola a un ARN que actúa como mensaje

ro, llevando esta información a los ribosomas citoplasmáticos donde se realiza la síntesis de proteínas. El ARN mensajero es heterogéneo y es complementario de las cadenas nucleotídicas del ADN. La enzima que realiza la transcripción fue descubierta por Weiss (35) y se denomina ARN-polimerasa. La compleja estructura de la enzima, que contiene cuatro tipos de subunidades, parece reflejar la variedad de funciones que esta proteína desempeña en el proceso de transcripción. A diferencia de la polinucleótido-sintetasa, requiere además de ADN como matriz, la presencia simultánea de los cuatro ribonucleótidos trifosfato. La rifampicina, antibiótico de gran utilidad, inhibe la iniciación de la transcripción por su unión directa a la ARN polimerasa (36). Su uso en estudios "in vitro" ha permitido dilucidar el mecanismo de la transcripción.

El ARN mensajero (ARN m) sintetizado tiene las siguientes propiedades: i) es de rápida síntesis y degradación, ii) se sintetiza sobre una matriz de ADN reflejando en su estructura la del ADN que le dio origen, iii) se asocia a ribosomas y dirige la síntesis proteica y iv) corresponde a una clase heterogénea de moléculas dado que contiene los mensajes de muchas proteínas de peso molecular variable. La actinomicina D inhibe específicamente la síntesis de ARN por medio de su unión a los residuos deoxiguanídicos del ADN.

Los virus oncogénicos, que tienen ARN como material genético, contienen entre sus proteínas virales la enzima ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa reversa. La enzima cataliza la síntesis de una hebra de ADN complementaria al ARN viral a partir de deoxinucleótidos trifosfatos y luego otra enzima cataliza la síntesis de la segunda hebra de ADN utilizando el híbrido ARN-ADN como matriz. De esta manera el ADN con la información viral se incorpora al genoma del huésped y conjuntamente con éste, se transmite de generación en generación.

En cuanto a la traducción de la información genética del ARN m a los ribosomas, la misma se realiza a través de un "adaptador" que mole-

cularmente consta de dos partes: una polinucleotídica y otra aminoacídica. Este ARN adaptador se denomina aminoacil-tARN. La síntesis de proteínas a partir de un aminoácido activado, se realiza sobre los ribosomas. La activación de los aminoácidos ocurre entre el citoplasma por efecto de las aminoacil t-ARN sintetetas. Para cada aminoácido hay más de un t-ARN.

El proceso de traducción consta de una fase de iniciación, un ciclo de prolongación y una terminación de la síntesis de cadenas polipeptídicas. En la misma se traduce el mensaje del ARNm a proteína involucrando la presencia del mensajero, el adaptador activado, los aminoácidos, los ribosomas, las enzimas correspondientes (aminoacil sintetasa y peptidil transferasa) y fuentes energéticas en forma de ATP ya que cada enlace peptídico necesita tres enlaces fosfato. El mensaje del ARN cifrado en un lenguaje de cuatro letras (4 ácidos nucleicos) se traduce así a un lenguaje de 20, dado que ese es el número de aminoácidos que en distintas combinaciones da origen a todas las proteínas existentes. Es así como cada uno de los aminoácidos está representado en el ARN por un triplete de nucleótidos llamado codón. Esos tripletes de nucleótidos se alinean sucesivamente para componer el ADN y luego el ARN transcripto. El código generado por los aminoácidos es universal o sea que es especie inespecífico.

Como todo proceso biológico, la replicación debe tener también un mecanismo de regulación acoplado a ella de manera tal que la célula pueda disponer de las cantidades proteicas necesarias, en calidad, cantidad y en tiempo. Esta regulación es fundamental en la diferenciación celular. Para ello la célula dispone de mecanismos de inducción y de represión enzimática a través de las enzimas correspondientes. Existen así enzimas inducibles como la β galactosidasa, enzimas represoras que proporcionan mecanismos de represión coordinada y enzimas constitutivas que no son reguladoras sino estructurales.

Gracias a los estudios de Jacob y Monod (37) sobre la inducción de β galactosidasa en *E. coli* se obtuvo el primer modelo de regulación genética.

Se definieron 3 tipos de genes: un gen estructural cuya función es la de codificar la secuencia de aminoácidos de una determinada proteína, un gen regulador que codifica a la proteína represora y un gen operador que se une al represor. Al unirse un inductor a un represor, se rompe la unión de éste con el operador y se permite la transcripción del gen estructural. Cada uno de estos grupos de genes relacionados se denomina operón. Cada célula tiene la información genética completa. Se admite que la diferenciación celular es el resultado de un proceso de desrepresión que ha sido programada por los diferentes operones.

C.- LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y METABOLICAS DE LA CELULA MALIGNA.

Las características fundamentales que distinguen las células tumorales de las normales son: su capacidad de proliferar en forma descontrolada, invadir tejidos normales y dar metástasis a distancia. No necesariamente se verifican las tres propiedades simultáneamente. La transformación y la progresión son términos importantes en la definición neoplásica. Se la podría definir como "un cambio inducido heredable en las propiedades de una célula, acompañado de la pérdida de los controles regulatorios de su crecimiento celular". Es así como se puede hablar de un paralelo entre la pérdida de los controles y la tumorigenicidad in vivo. Evidentemente, cambios en el comportamiento celular de tal magnitud, deben obedecer a alteraciones estructurales y/o metabólicas que la célula normal necesariamente debe haber sufrido.

Es cada vez más aceptado, que la célula neoplásica no es necesariamente una monstruosidad que tiene poco o nada de semejanza a las células normales que la originaron; al contrario, su grado de semejanza es destacable. Los fenotipos neoplásicos que parecen ser aberrantes, pueden ser similares a algunas células normales, aunque anomalías originadas en el estado neoplásico no pueden ser excluidas hasta el presente. Sería el caso de la leucemia linfática crónica, donde los linfocitos que expresan inmunoglobulinas de superficie también expresan un antígeno presente

en la subpoblación de linfocitos T.

Los términos "tumor" y "neoplasia" centralizan la atención sobre la proliferación anormal como proceso patológico fundamental en las enfermedades malignas. Sin embargo, desde el punto de vista de la diferenciación celular, una falla de ésta a partir de la célula madre (stem cell) o una precursora, puede explicar la acumulación de un número anormal de células inmaduras de un determinado tipo en el desarrollo de un linfoma. O sea, que no son necesarios aumentos en la velocidad proliferativa comparada con la célula normal.

La célula madre "stem cell", puede tener varios atributos, entre los cuales los más importantes son la capacidad de autorrenovación, la habilidad de responder a una demanda de más células progenitoras y, desde ya, la tendencia a diferenciarse. Se da por seguro que los controles de retroalimentación positivos y negativos gobiernan la proliferación de la célula madre (stem cell) y que además, la dirección de la diferenciación de las células multipotenciales debe estar influida por factores externos. Es importante establecer que la pérdida celular en un determinado estadio de la diferenciación puede ser solamente por maduración, con lo cual entran en el estadio siguiente, ó por muerte celular.

Puede darse una acumulación de células inmaduras en cualquier estadio de diferenciación, sean éstas capaces o no de renovarse, si la porción de células madres en fase proliferativa es aumentada; con lo cual, se produciría sólo un pequeño aumento en los estadios más inmaduros, dada la continua pérdida celular por diferenciación. Puede ser también, que la tendencia a la diferenciación se reduzca o elimine; en este caso la velocidad de la proliferación influye en la rapidez con la que se acumulan las células; además como la célula madre aún bajo circunstancias normales, puede tener ciclos cortos, la acumulación puede ser rápida aún cuando la cinética de proliferación no se altere. Cuando la porción de células proliferantes de un compartimento aumenta pero la diferenciación procede normalmente,

como resultado de la expansión de un solo clon, todos los estadios siguientes de diferenciación también van a aumentar el número celular. Una expansión clonal de este tipo, mantendrá la relación numérica entre un estadio y otro de la diferenciación, o sea el aumento absoluto será mucho mayor en los estados más diferenciados.

Por esto, en los desórdenes provocados por alteraciones en la célula madre, stem cell, la expresión predominante de éstos, se observa en los estadios celulares más diferenciados. Además no pueden ser excluidas alteraciones adicionales; de hecho, se observan en los linfomas centrofoli-
culares, variaciones morfológicas en diferentes lugares de la enfermedad ó a través de la evolución de la misma. La transformación en este caso, y probablemente en otros linfomas malignos, sugiere que la manifestación celular del tumor es influenciada por factores externos o por nuevas anomalías que se expresan en el control genético del fenotipo tumoral.

C I.- Alteraciones en la membrana celular

De acuerdo al esquema de Nicolson (38), las alteraciones a nivel de membrana durante la transformación neoplásica serían las siguientes:

- i.- enzimas de superficie alteradas
- ii.- aumento de la aglutinabilidad por lectinas
- iii.- alteración de la movilidad de los componentes de membrana
- iv.- variaciones en la comunicación intercelular
- v.- variaciones en las propiedades de inhibición del crecimiento por densidad y contacto.
- vi.- cambios en las propiedades de transporte y permeabilidad
- vii.- alteración de propiedades fagocíticas y endocíticas
- viii.- pérdida o modificación de glicoproteínas y glicolípidos
- ix.- pérdida o adquisición de antígenos
- x.- cambios en la densidad de carga citoplasmática

Las modificaciones que ocurren durante la transformación tanto en la estructura como el contenido glicolípido, han sido descritas en detalle por Hakomori (39). En general se ha encontrado que la cantidad de glicolípidos más complejos disminuye y que existen deleciones en los residuos sacáridos terminales de los mismos.

Se ha observado un aumento marcado en la facilidad que poseen esos glicolípidos de pegarse a anticuerpos, lectinas y enzimas. Puede ocurrir que una glicoproteína asociada a la membrana haya variado su orientación sobre la superficie celular y que no pueda establecer un enlace correcto con los elementos citoesqueléticos citoplasmáticos.

Varias observaciones sugieren que la transformación resulta en un aumento en el nivel celular de enzimas degradativas como proteasas o glicosidasas (38). Lamentablemente muchos de estos estudios fueron realizados sin distinguir entre enzimas superficiales, secretadas o nivel enzimático total. Pero en sistemas de cultivo de tejidos, la transformación siempre está acompañada de un aumento del nivel de estas enzimas. Tal es así que las proteasas han sido implicadas en la pérdida de la regulación del crecimiento normal y en las alteraciones en la movilidad de los componentes de la superficie celular, en la aglutinabilidad por lectinas, en el transporte de azúcares y fosfato y en la capacidad de reaccionar frente a anticuerpos (38,40).

Se ha podido demostrar que ciertas anomalías de crecimiento en células transformadas *in vitro* y algunas de las alteraciones en las propiedades de superficie podían modificarse si se añade a los cultivos inhibidores de proteasas (38).

Como ya se mencionó, el transporte de ciertos azúcares es mayor en la célula neoplásica; también aumenta considerablemente la incorporación de ciertos aminoácidos y sus análogos. Simultáneamente a estos cambios de transporte, se observó un rápido aumento en los niveles de nucleótidos cíclicos, especialmente GMP cíclico (41,42).

Se ha propuesto que los niveles celulares de nucleótidos cíclicos determinan la permanencia o no de células normales en estado de reposo y de células transformadas en estado de crecimiento descontrolado. Los nucleótidos cíclicos sirven como mensajeros intracelulares que alteran las enzimas citoplasmáticas, los sistemas de transporte y quizás directamente regulen la síntesis de ADN. De allí la importancia que tienen las variaciones en su concentración.

El contenido y la organización de componentes citoesqueléticos asociados a membrana, como los microtúbulos y microfilamentos, se reduce en células transformadas (38). Este hecho podría explicar la pérdida de "capping" de los receptores en pacientes con leucemia linfática crónica y otras neoplasias.

Las células tumorales se caracterizan por poseer neoantígenos asociados al tumor (43,44). Estos antígenos pueden ser fetales o embrionarios, virales o antígenos específicos al estado transformado. Los tumores pueden liberar esos antígenos u otras glicoproteínas al medio y de esta forma esos componentes pueden actuar como factores bloqueantes que pueden interferir con la respuesta inmunológica del huésped hacia el tumor o producir una respuesta humoral débil que de hecho estimule el crecimiento tumoral. Debe recordarse que los requerimientos séricos de las células tumorales para crecer son menores que los de células normales (10).

Habría que ver ahora cuáles de las alteraciones descritas para células neoplásicas se correlacionan funcionalmente con la capacidad que tienen estas células de crecer descontroladamente e invadir otros tejidos, y cuáles están sólo secundariamente relacionadas. Es evidente que las que más interesan son aquellas relacionadas con la dinámica de los receptores de superficie y el control citoplasmático.

El hecho que las células neoplásicas expresen neoantígenos asociados al tumor debería resultar en su reconocimiento y destrucción por el sistema inmunológico del huésped (43,44). Hay muchos mecanismos por los cuales las células tumorales escapan a este control (46,47).

Como determinados antígenos se liberan de la superficie celular o son enmascarados o redistribuídos, la capacidad del sistema inmune en detectar y poder destruir la célula tumoral, se encuentra en estas situaciones disminuída. Las alteraciones en los receptores de superficie puede ayudar al reconocimiento o facilitar el escape a la vigilancia inmunológica (46,48). Se sabe perfectamente que es necesario que exista una correcta distribución y disposición de moléculas de anticuerpo unidas a la superficie para que se fijen a los componentes del complemento. Al existir procesos de redistribución por cambios dinámicos en la superficie de la célula tumoral, los distintos tipos de citotoxicidad como arma inmunológica no pueden actuar o actúan en forma disminuída. También existen fenómenos de bloqueo de antígenos por redistribución o por formación de inmunocomplejos (49,50).

Un ejemplo de falla de la comunicación trans-membrana, es la pérdida de la propiedad de inhibición por contacto luego de la transformación neoplásica. Esto ocurre a expensas de una alteración por redistribución de componentes en el ensamblaje citoesquelético. Esa pérdida de dependencia de unirse a la superficie apropiada para iniciar una proliferación normal, es uno de los criterios para definir tumorigenicidad. También con el mismo criterio, se explica la variación a la respuesta hormonal. Se necesita menor nivel de hormonas y otros mitógenos para estimular a las células tumorales, que lo que necesitan las células normales.

El hecho que aumente la movilidad de los receptores y que se encuentren alteradas las propiedades de superficie de células normales por una incubación breve con proteasas (40), nos da idea de los fenómenos que ocurren en las células transformadas. De modo que las modificaciones observadas durante la transformación se deberían a mecanismos enzimáticos degradativos más que a adquisición o pérdida de antígenos. Este tipo de mecanismos explicaría la similitud que existe entre células transformadas y células tumorales en interfase (51).

C II.- Alteraciones en la red enzimática

Las células tumorales muestran una correlación directa entre el desbalance del metabolismo de las purinas, pirimidinas y del ADN y la transformación y progresión neoplásica. La estrategia bioquímica de la expresión genética de estos metabolismos, se comprende al analizar el balance de caminos metabólicos opuestos y de las enzimas claves de cada camino. Entre ellas se encuentran las quinasas, sintetasas, reductasas y ADN polimerasa. Paralelamente al crecimiento tumoral se observó así un aumento de las enzimas responsables de la biosíntesis del ADN y una disminución de las catabólicas (20,24,25,52,56).

El desbalance enzimático encontrado permitió que se usaran los dosajes de enzimas claves como marcadores neoplásicos con fines diagnósticos y además de pronóstico y seguimiento terapéutico. Ese desbalance en las enzimas claves del metabolismo de purinas y pirimidinas permitió utilizarlas como blanco de la quimioterapia. Es así como hidroxiaurea, los antifolatos, 5-fluorouracilo, arabinosilcitosina, etc., por ejemplo ejercen una acción importante inhibiendo enzimas claves del metabolismo del ADN (60). La evidencia clínica ha demostrado ampliamente que la interferencia de drogas anticancerosas con la biosíntesis de purinas y pirimidinas, ha posibilitado remisiones parciales y totales (61,64).

Se ha visto como en la mayoría de los tumores, aumenta la actividad de UDP quinasa y disminuye la de timidina fosforilasa (23). La relación entre la velocidad de incorporación de timidina al ADN y su velocidad de degradación a dióxido de carbono es una buena medida para correlacionar el crecimiento con la malignidad neoplásica.

Respecto al metabolismo de hidratos de carbono, Warburg (57), demostró que en tumores indiferenciados de crecimiento rápido, se aumentaba la glicólisis aeróbica y disminuía la respiración. Propuso que el cambio neoplásico ocurría cuando se dañaba la respiración celular y que la célula

como respuesta aumentaba su capacidad glicolítica. Sugirió que aquellas células que no se adaptaban a esta situación, morían y aquellas que pudieran aumentar su capacidad glicolítica para producir ATP normalmente, se convertían en tumorales. Sin embargo estas observaciones no se cumplen plenamente en todas las neoplasias (58,59), especialmente en los hepatomas de crecimiento lento. Generalmente, se verifican aumentos en las actividades de enzimas glicolíticas, disminución en las enzimas gluconeogénicas y cambios isoenzimáticos que disminuyen la respuesta regulatoria endócrina y nutricional y afectan los mecanismos de control por retroalimentación. Enzimas fundamentales en el camino metabólico de la ribosa-5-fosfato, esencial precursor del ADN, como la G-6-P-dehidrogenasa, la transaldolasa, la hexoquinasa, la piruvato quinasa y la PRPP sintetasa se encuentran muy aumentadas en los tumores, independientemente del grado de malignidad.

C III.- Alteraciones en la replicación del ADN

El papel del ADN dentro de una célula es más que el de determinar secuencias proteicas. Es el responsable de garantizar una replicación celular idéntica. Es por ello que cualquier deformación ya sea en su estructura como en su velocidad de síntesis, afectan directamente la duplicación normal. Los carcinógenos de cualquier origen, actúan sobre el metabolismo del ADN, como ya se vió. Es así como en las células tumorales, se encuentra un ADN alterado estructuralmente y un mecanismo biosintético anormal. Como consecuencia, se producen clones celulares no programados y una proliferación activa y descontrolada.

D.- LINFOCITO NORMAL Y TRANSFORMADO

Dentro de los componentes del sistema inmunológico, el linfocito ocupa un papel fundamental. En sangre periférica, es esencialmente una célula que no se encuentra en división. Posee un núcleo denso y escaso citoplasma. La cromatina se encuentra en un estado condensado y se visualizan unos

pocos polisomas en el citoplasma. Algunos linfocitos sobreviven en el organismo mucho tiempo y retienen su habilidad de proliferar cuando se los expone a un estímulo antigénico apropiado (65).

Cuando el linfocito de sangre periférica, se cultiva en medios apropiados, continúa su situación de reposo. La síntesis de proteínas,ARN y ADN es baja. Sin embargo, en presencia de sustancias llamadas mitógenos, se activan y pueden proliferar (66). La estimulación da lugar a una serie de cambios moleculares que culminan con la duplicación del ADN, la división celular y cambios morfológicos que caracterizan las formas más indiferenciadas o blásticas de la célula linfoide. Estos cambios se conocen como "transformación blástica" o blastogénesis. Los cambios moleculares que ocurren están relacionados con las funciones inmunológicas de estas células.

Existe un gran número de compuestos no relacionados entre sí, que pueden estimular los linfocitos humanos. Aquellos que estimulan independientemente de haber existido una exposición previa y sin especificidad inmunológica aparente, se denominan mitógenos inespecíficos. Ejemplos de los mismos son: fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con A), pokeweed mitogen (PWM), cationes divalentes, productos bacterianos, anticuerpos y antígenos de histocompatibilidad. El otro tipo de estimulación se denomina específica y puede ocurrir cuando se expone a los linfocitos a algún antígeno hacia el cual hayan sido sensibilizados in vivo.

Cuando la célula linfoide se estimula, aumenta de tamaño, su cromatina es menos condensada, los nucleolos se hacen visibles al microscopio y aumenta el citoplasma al extenderse el retículo endoplásmico. Usando PHA como mitógeno, el 80% de las células en cultivo, responden y luego de 2 o 3 divisiones, revierten al estado quiescente que puede ser nuevamente estimulado. Una de las preguntas más interesantes que pueden formularse es por qué los linfocitos una vez estimulados tienen una división controlada y por qué ciertos virus son capaces de inducir una transformación permanente

dando lugar a líneas celulares linfoblastoides inmortales.

Los cambios moleculares, que ocurren luego de la estimulación inespecífica, pueden detectarse morfológicamente y a nivel bioquímico, de terminándose los niveles de cualquier parámetro que nos interese.

Es así que se puede predecir que los cambios tempranos, involucran metabolismo de la membrana y la activación del ADN. Los cambios que ocurren durante el proceso de transformación pueden dividirse arbitrariamente en cuatro etapas:

1.- Etapa temprana: (primeras 2 horas) Aumento de los eventos asociados a membrana (recambio de fosfolípidos)(67), incorporación de colina a lípidos (68), transporte de aminoácidos(69), facilitación de la difusión de la metilglucosa (70), flujo de K y Ca aumentado (71,72), aumentos en los eventos asociados al núcleo (incorporación de acetato a histonas) (73), fosforilación de histonas y proteínas nucleares, aumento de síntesis de ARN (91) eventos asociados al citoplasma (aumento del consumo de glucógeno)(74), aumento de la glicólisis, aumento del consumo de oxígeno (75) y redistribución de las enzimas lisosomales (76).

2.- Etapa intermedia: (2 a 14 horas) Aumento de la actividad de uridina quinasa (77), aumento de la actividad de ARN polimerasa ADN dependiente (78) y síntesis de ARN ribosomal (79), aumento de la incorporación de aminoácidos a proteínas y de la proporción de ribosomas que sintetizan proteínas(80), aumento de la incorporación de glucosamina a la membrana (81) y de la actividad de la S-adenosilmetionin: decarboxilasa y ornitín decarboxilasa (82).

3.- Eventos tardíos:(16 a 72 horas) Aumentos en las actividades de las enzimas relacionadas con la síntesis de ADN (ADN polimerasa)(83), timidina quinasa (84), deoxicitidina quinasa (85), incorporación de timidina al ADN (86), incorporación de P al ADN (87), aumento del contenido del ADN por célula, alteración del perfil isoenzimático de la láctico dehidrogenasa (88), aumento en la actividad de glucosa-6-fosfatasa y β glucosidasa (89).

4.- Eventos finales: (post 72 horas) Disminución de la incorporación de timidina, de la incorporación de aminoácidos y de la actividad de la ADN polimerasa (90).

La estimulación de los linfocitos producida por la mayoría de los mitógenos conocidos, da lugar a una secuencia de eventos moleculares similares. Sin embargo, hay que hacer notar que algunos mitógenos estimulan poblaciones de linfocitos diferentes. El PWM induce la aparición de células plasmáticas, sugiriendo que este mitógeno soluble causa la diferenciación de linfocitos B en células productoras de anticuerpos. De la misma manera algunos mitógenos favorecen la estimulación específica de linfocitos T.

Existe una enzima que parece encontrarse solamente en células inmunocompetentes y que participaría en un mecanismo generador de la divergencia genética postulada como una de las teorías para explicar la diversidad inmunológica. Se trata de la deoxinucleotidiltransferasa terminal, enzima que cataliza fortuitamente el agregado de nucleótidos a las cadenas de ADN terminales. Es la única enzima perteneciente al metabolismo del ADN que es tejida específica y se la encuentra sólo en el timo ó en células derivadas del mismo. De ahí su uso como marcador de diferenciación de células linfoides.

La estimulación linfoide necesita la interacción de distintas células y sus productos además de la presencia de una sustancia "mitogénica". Pese a que la mayoría de las evidencias llevan a suponer que la interacción entre el mitógeno y la célula se produce a nivel de la membrana celular, no hay que descartar aquellas que sugieren que como los cambios en el metabolismo nuclear son eventos tempranos, debería existir alguna estimulación tipo hormonal hacia el núcleo en forma inmediata. Se ha observado, liberación de enzimas lisosomales intracelulares en la fase temprana de la estimulación (92) y se ha postulado que las mismas migrarían al núcleo para incitar la activación génica. También se ha propuesto que dado que el

AMP cíclico se eleva a los 5 minutos de la estimulación con PHA, sea este el mensajero de la activación nuclear (93). Finalmente hay quienes postulan que los cambios producidos en el transporte de K luego de la estimulación con PHA, podrían ser fundamentales en esta cuestión (94).

Las diferencias entre el linfocito normal y el transformado, como se puede deducir de estos comentarios, son muchas más que las morfológicas que se pueden observar. Hay que considerar que dado que el proceso de diferenciación linfoide es muy complejo y abarca etapas distintas en los distintos tipos de células, las neoplasias de origen linfoide son diversas.

E.- INHIBIDORES CELULARES ENDOGENOS: LAS CHALONAS: I ORIGEN, PROPIEDADES Y MECANISMOS DE ACCION

El crecimiento y la división celular normal se encuentra generalmente bien regulado por la acción de varios agentes endógenos con función estimuladora o inhibidora. Las células neoplásicas por otro lado son relativamente insensibles a factores reguladores y son incapaces de permanecer en el estado quiescente. Uno de los problemas fundamentales al estudiar el control del crecimiento celular es determinar la naturaleza bioquímica y los sitios de acción de aquellos agentes que permiten o inducen el pasaje de células de un estado al otro.

A mediados de la década del 50, Paul Weiss (95), aplicó los conceptos cibernéticos a un problema biológico importante: el control de las células "in vivo". Propuso que dentro de las células o sobre su superficie, pre-existía un inhibidor de retroalimentación negativa (IRN) (Negative feedback inhibitor), que específicamente podía inhibir la mitosis de esas células mientras que no fuera desplazado o destruido. En ausencia de esos IRN, la célula podría entrar en el ciclo mitótico.

Bullough y Lawrence aplicaron este concepto a sus trabajos sobre tejido epidérmico (96,98). Demostraron que como consecuencia de la extirpación de una pequeña área de la epidermis de la oreja del ratón, hay un au-

mento del número de mitosis, no sólo en una zona limitada a los bordes de la herida sino también en epidermis no lesionada del otro lado de la oreja. La distribución de las mitosis era compatible con la disminución de la concentración de un inhibidor mitótico endógeno. Encontraron que extractos de varios tejidos epidérmicos inhibían la mitosis de células epidérmicas "in vivo" e "in vitro" sin inhibir otras células de la piel, como la dermis. La respuesta al extracto era dosis-dependiente; había una relación inversa entre el índice mitótico y la cantidad de epidermis empleada para elaborar el extracto. Extractos de otros tejidos como riñón, hígado, pulmón y cerebro, no afectaron el índice mitótico de la epidermis. Finalmente, encontraron que extractos epidérmicos de conejo, cobayo y rata también indujeron una disminución del índice mitótico de la epidermis del ratón "in vitro".

Como consecuencia postularon que debía existir un mecanismo de control específico que definieron como "una secreción interna producida o sintetizada por un tejido con el propósito de controlar por inhibición, la actividad mitótica de ese mismo tejido" Se denominó al inhibidor: "chalona". Este término fue originalmente usado Schaffer, para sustancias de naturaleza endócrina capaces de oponerse a la acción de hormonas e inhibir funciones celulares. El término chalona, deriva del griego "chalao" que significa arriar ó plegar las velas para aminorar la marcha.

Las 5 características fundamentales de las chalonas son: i) especificidad de tejido, ii) inespecificidad de especie, iii) reversibilidad, iv) ausencia de efecto citotóxico y c) inhibición de la proliferación celular.

Se han descripto hasta el momento chalonas de tejidos diversos: epidérmico (98,102), hepático (103,104), melanocítico (105,106), fibroblástico (107), renal (108,109), granulocítico (110,112) y linfoide (113,115). Además se encuentran en la literatura, chalonas de otros tejidos pero que todavía no han podido caracterizarse parcialmente y que no se han podido purificar hasta un grado razonable como para confiar en sus efectos (116,118).

Ante la dificultad de aislar y caracterizar a las chalonas se ha puesto gran empeño en la determinación de sus pesos moleculares (119). Se han encontrado pesos moleculares diversos para las distintas chalonas. Como ejemplos se puede citar: 2.000 daltons para la hepática y melanocítica, 30.000 a 50.000 para la fibroblástica y linfoide y 5.000 para la granulocítica. Estos valores han disminuído a lo largo de los años gracias a nuevas técnicas más refinadas que se han utilizado en la purificación de la mismas. Actualmente se tiende a admitir que la mayoría de las chalonas tienen pesos moleculares menores que 2.000. Se ha sugerido incluso que las primeras preparaciones debían estar contaminadas con proteínas o glicoproteínas inactivas que estaban asociadas a una pequeña cantidad de chalona a través de uniones inespecíficas no covalentes.

Los progresos en el conocimiento de la composición química de las chalonas, no han sido importantes. De la chalona linfocítica se sabe que es un glicopéptido pequeño que posee una tirosina N-terminal. La granulocítica sería un polipéptido puro que contiene un grupo tiol, dos residuos carboxílicos y un grupo amino que no es N-terminal. Como su actividad biológica es abolida por piroglutamato aminopeptidasa, se admite que posee un residuo piroglutamato N-terminal, similar a varias hormonas peptídicas, lipoproteínas e inmunoglobulinas. En general son resistentes al calor a temperaturas de 56°C.

Respecto a los sitios de acción y a los mecanismos utilizados se sabe que las chalonas no actúan todas sobre la misma fase del ciclo celular. Para estudiar su acción se han empleado distintas técnicas que posibilitan la medición de la tasa mitótica. Entre ellas incorporación de precursores de ADN y ARN radioactivos y posterior revelación por autoradiografía o medición con contador de centelleo líquido, y recuento de células.

Así se ha podido demostrar que existen dos tipos de chalonas: las chalonas G1, que interfieren en la síntesis de ADN actuando en la transición de las fases G1 a S y las chalonas G2, que también inhiben pero al final de la fase G2. Parece posible que algunas chalonas G1 extienden

su efecto también a la fase S del ciclo celular. Ejemplos de la primera son la chalona epidérmica, granulocítica, linfocítica y fibroblástica y ejemplos de la segunda son la melanocítica y también la linfocítica y epidérmica. En algunos sistemas como se puede ver, existen los dos tipos de chalona. Difieren entre sí en especial por su composición química (peso molecular), por su mecanismo de acción y por su origen. La G1 se ha encontrado en la superficie de la membrana epidérmica mientras que la G2 en tejidos basales (123,124).

Las chalona son elaboradas por las células post-mitóticas maduras de cada tejido o línea celular. Un tejido maduro elabora más chalona que uno inmaduro. Sin embargo se presentan algunas dificultades cuando se pretende generalizar estos conceptos. Es curioso que la fuente más importante de chalona linfocitaria sea el timo fetal o maduro, los ganglios linfáticos y el bazo cuando todos ellos poseen linfocitos inmaduros. La fuente más rica deberían ser los linfocitos de sangre periférica que son la expresión más madura. Los eritrocitos anucleados también son la fuente principal de chalona eritrocítica aunque no son capaces de sintetizarla. En este caso se supone que las células indiferenciadas producen una chalona o prochalona inactiva que será activada antes de ser liberada por células maduras. Ensayos realizados en rata muestran que las espermatogonias en renovación producen probablemente la chalona espermatogonial que mantiene a las espermatogonias A₀ en fase G₀ durante largos períodos de tiempo (117). Sin embargo debe destacarse que todas las espermatogonias (A₁-A₄) son células fuente de chalona aún cuando estén comisionadas para convertirse a través del proceso de diferenciación de espermatozoides. Finalmente los medios utilizados para mantener en cultivo células maduras deberían ser una fuente de chalona importante. Sin embargo, no es esto lo que ocurre (120,121).

Las chalona regularían el grado de proliferación celular simplemente modulando la duración del ciclo celular (122). Esto ha sido demostrado con la chalona granulocitaria, que sin bloquear completamente la proliferación celular, prolonga la duración del ciclo celular, principalmente

la fase G1 y parcialmente la S. Al prolongarse el ciclo celular, los componentes celulares sintetizados no se reparten rápidamente entre las células hijas. El proceso de maduración se ve así favorecido por simple prolongación del ciclo celular. Esta acción pone en relieve un importante aspecto de las chalonas; durante la inhibición mitótica inducida por ellas, muchas células alcanzan la etapa post-mitótica de maduración terminal y eventualmente ya no pueden sufrir más mitosis aún cuando las chalonas hayan dejado de actuar. Así, aunque el efecto de las chalonas sea esencialmente reversible, el resultado final en este caso sería irreversible.

Se ha especulado, que algunas células epidérmicas se mantienen en la fase G2 (5-10%), para que en caso de ocurrir una herida, puedan reponerse células epiteliales en forma cuasi inmediata. Este hecho se encuentra apoyado en la observación que las chalonas G1 se encuentra principalmente en la capa superficial y las G2 en la zona basal.

Se ha postulado que las chalonas se fijan a la membrana plasmática de las células blanco, donde serían reconocidas por receptores específicos y actuarían activando un segundo mensajero o alternativamente liberando una molécula inhibidora de la mitosis. La reversibilidad de la acción de las chalonas se explicaría por la extracción o eliminación de esas chalonas fijadas a la membrana plasmática. La sensibilidad disminuida de las células neoplásicas a la acción de las chalonas se debería a una fijación comparativamente menor de éstas a la membrana.

Los niveles de AMP cíclico (AMP-c) se correlacionan con la actividad mitótica de una célula. En las células que se encuentran en división activa y crecimiento franco, las concentraciones de AMP-c encontradas, son bajas (125.126). Attalah propuso que las chalonas podían poseer dos sitios activos, uno específico para su fijación a la membrana celular y otro inespecífico para estimular la adenilciclase (127). Las chalonas, por lo tanto serían las responsables de mantener altos niveles de AMP-c, en células en reposo o cuya actividad mitótica fuera detenida por alguna causa (en este caso por la chalona). Además de un alto nivel de AMP-c se sabe que inhibe

la actividad de la nucleotidil quinasa, enzima necesaria para la síntesis de ADN. Existe evidencia de estos supuestos en los trabajos de Attalah y Houck (128) en el sistema linfóide, donde la conexión entre chalonas y AMP-c ha sido observada. En cultivos estimulados con mitógenos inespecíficos como la fitohemoaglutinina (PHA), se ha observado lo siguiente: 1) la inhibición provocada por la chalona disminuía cuanto mayor era la diferencia entre el agregado de PHA y chalona al cultivo; 2) tanto la chalona como el AMP-c ejercen su efecto sobre la incorporación de timidina previo a la entrada al nucleósido al "pool" de precursores de ADN; 3) la inhibición dependía solamente de la concentración de chalona agregada. Esto último sugiere que una vez que los cambios inducidos por la presencia de chalona hubieran ocurrido, la célula no respondería a nuevos agregados de AMP-c.

Varios investigadores han sugerido que el lugar de acción de la chalona es sobre la membrana celular, especialmente por el fenómeno de inhibición por contacto observado para células normales en cultivo. Aunque se supone que la chalona se encuentra sobre la membrana de una célula individual, la inhibición mitótica solo tendría lugar cuando las células toman contacto superficial unas con otras. Esta es la base de lo que se denominó "modelo puente para las chalonas" (129).

Un mecanismo alternativo propone una relación indirecta entre las chalonas y el AMP-c. Según Gelfant (130), la actividad mitótica puede disminuirse en presencia de inhibidores traslacionales y aumentarse en presencia de Actinomicina D. Como se sabe que la actinomicina D es inhibidor de los represores transcripcionales, se propuso que la chalona G2 actuaría como un represor post-transcripcional de un ARNm que codificaría para una proteína esencial en el proceso mitótico. Podría ser que las altas concentraciones de AMP-c fueran necesarias para activar a las chalonas a través de un mecanismo de fosforilación.

La mayoría de las chalonas G2 requieren adrenalina como co-factor para ejercer su máxima actividad mientras que la G1 es efectiva en ausencia de adrenalina (119,131,132). Otros glucocorticoides también han sido

asociados a la G2. En rigor, la adrenalina es necesaria sólo "in vitro" pues las chalonas G2 "in vivo" son efectivas aún en ausencia de adrenalina.

E.II.- Uso clínico de las chalonas

Una enfermedad caracterizada por un descontrol de la actividad mitótica podría ser una consecuencia de fallas o deficiencias en los mecanismos chalónicos. La introducción de la proteína tejida específica apropiada al organismo podría retornar a una situación normal. De todas las conocidas aquella enfermedad más vinculada con un descontrol en el crecimiento celular, es el cáncer. Indicativo de todos los tumores es que la tasa de producción celular es mayor que la de pérdida. La posibilidad que existan anormalidades en los mecanismos chalónicos ha dado origen a numerosos trabajos de investigación en este campo. Bullough (105) y Rytomaa (133) estudiaron los mecanismos chalónicos en el carcinoma epidermoide del conejo y en la leucemia granulocítica de la rata, respectivamente. En ambos casos la concentración de chalona intracelular fue 10 veces menor o aún menos que la concentración encontrada en tejidos normales utilizados como control. Además la inyección de chalona exógena demostró ser capaz de restituir la inhibición mitótica normal. Estas observaciones fueron confirmadas en otros sistemas como el carcinoma epidermoide del hamster (134), el melanoma de Harding -Passey en el ratón (105), la leucemia linfoblástica (135) y la leucemia granulocítica espontánea (136).

La inyección de chalonas apropiadas ha sido utilizada para frenar y aún revertir ciertos tumores. Rytomaa y Kiviniemi (133) usando chalona granulocítica, lograron luego de 6 semanas de inoculaciones repetidas, frenar la leucemia granulocítica de Shay en la rata. En leucemia dispersa, lograron remisiones completas en 9 animales utilizando una chalona granulocítica bovina. En cuanto a los ensayos en humanos, se obtuvieron remisiones totales y completas en 5/7 casos de leucemia mieloide con chalona granulocítica (106). Además el tratamiento permitió observar una resistencia a la

infección bacteriana aumentada.

Se ha sugerido que las chalonas pueden tener un considerable potencial como agentes antiproliferativos. De esta manera serían un arma útil en conjunción con los quimioterápicos utilizados habitualmente. Como ya se mencionó, el efecto de las chalonas es el de provocar un alargamiento del ciclo celular. Como resultado de ello, las células no avanzan hacia la etapa post-mitótica cuando están en presencia de chalonas y no llegan a la diferenciación terminal. Se aumentan así las posibilidades de ser destruidas antes de llegar a la mitosis y además se dispone de un método que sincroniza las células porque las mantiene arrestadas en algún momento del ciclo, en especial G1. La reducción de la cantidad de chalona lentamente permite que las células prosigan a fase S. Si en este punto se utilizan agentes citostáticos específicos para la fase S, la célula neoplásica será destruida. En esencia el principio básico es análogo a los bacteriostáticos: no siendo citotóxicas, las chalonas no destruyen tumores, sino que su mecanismo de acción inhibitoria de la mitosis favorece el uso de agentes específicos ó los mecanismos defensivos normales del organismo.

Se ha intentado el uso de chalonas obtenidas de músculo liso, en el tratamiento de la esclerosis en placa (137). La actividad inmunosupresora de la chalona linfoide, se ha investigado en los casos de trasplante. Houck (138) intentó prolongar la aceptación de un injerto alogéneo de ratones C3H en ratones C57BL/6. los animales controles rechazaron el injerto en 12 días mientras que aquellos inyectados con chalona linfocítica mantuvieron los injertos por 29 días. Lamentablemente la gran cantidad de chalona necesaria para repetir estos experimentos "in vivo" en animales mayores que el ratón, hace que la investigación sea muy costosa y casi imposible hasta que se obtenga chalona en forma pura.

El modelo de las chalonas podría resultar un avance fundamental en la biología de la regulación celular y en el posible tratamiento de varias enfermedades. Sin embargo hay ciertos problemas técnicos con

los cuales se encuentra cualquier investigador que intente ahondar en este campo. En primer lugar, la contaminación bacteriana que puede existir en las preparaciones de chalonas puede dar falsos positivos en cuanto se ha visto que esa contaminación es capaz de mimificar la acción de la chaluona. Se ha encontrado que esporas de Clostridium encontradas en las preparaciones, inhibían la proliferación celular epidérmica en forma reversible y sin efecto citotóxico concomitante. Otro de los problemas consiste en que si bien los tejidos normales no poseen sustancias citotóxicas, los procedimientos utilizados para la concentración de chalonas pueden originar una cantidad elevada de compuestos dañinos para la viabilidad celular.

A menudo no se tiene en cuenta que cantidades pequeñas de timidina presentes en extractos crudos o parcialmente purificados puede reducir artificialmente la cantidad de timidina radioactiva que se incorpora al ADN, al aumentar el pool de la timidina nativa. Además la timidina puede tener el mismo efecto por un mecanismo de IRN de la enzima timidina quinasa (90).

La hipótesis de las chalonas es simple y atrayente. Desde el punto de vista teórico su importancia radica en explicar de una manera plausible el control de la actividad mitótica y en abrir posibilidades para el uso de las chalonas en la quimioterapia del cáncer. Aunque hasta el presente aparecen descritas unas quince actividades chalónicas de diversos tejidos, sólo en la mitad de los casos se las pudo caracterizar parcialmente, dos fueron purificadas hasta un grado razonable y ninguna ha sido aún aislada en forma pura. Esta situación contrasta marcadamente con las de sustancias de gran importancia fisiológica y médica que fueron postuladas, aisladas y caracterizadas en pocos años. Es probable que en cuanto a purificaciones existan secretos comerciales.

La actividad específica de la chaluona es muy alta y sus niveles tisulares son extremadamente bajos. Es por ello que se requiere manipular enormes cantidades de extractos para obtener cantidades demostrables de

chalonas. Para aislar 110 μ g de chalona granulocítica pura se requieren 1000 Kg de granulocitos o sea aproximadamente 10^6 litros de sangre.

Las pruebas escasas en que se sustenta la hipótesis de las chalonas, ha favorecido una actitud mental negativa en muchos autores. Sin embargo "La falta de una información detallada sobre la naturaleza química de las chalonas no debería ser, per se, suficiente para cuestionar la validez de la hipótesis. Un concepto sobrevive o perece con la demostración de reacciones biológicas específicas: el aislamiento y la caracterización química de la señal de retroalimentación, con ser muy importante no es en modo alguno esencial. Incluso cabría la posibilidad que por su propia naturaleza, por ejemplo una radiación electromagnética no fuera demostrable sin extraerse la señal" (122).

A pesar de todas las críticas mencionadas y justificadas de las que es objeto, la hipótesis de las chalonas constituye aún hoy y con mucho la explicación más simple de la homeostasis tisular.

F.- MODELO DE ESTUDIO ELEGIDO

El propósito de mi Tesis fue ahondar en los mecanismos que regulan los procesos de división celular, por un lado desde el punto de vista puramente cognoscitivo y por el otro con el fin de poder aplicar los resultados obtenidos en ciertos protocolos terapéuticos experimentales y humanos.

Para ello era fundamental establecer un modelo que permitiera estudiar a la célula en sus tres estados fundamentales: reposo, pre-mitosis y mitosis. El linfocito ofrece esta gran posibilidad. Circulando en sangre periférica se encuentra en reposo (Go), activado por mitógenos inespecíficos se encuentra en proliferación activa pero controlada y como linfoblasto leucémico está proliferando descontroladamente como se vió anteriormente. La transformación linfoide es un sistema muy atractivo para estudiar la iniciación de la replicación del ADN en poblaciones celulares

que normalmente no se dividen, porque los cambios post-estimulación pueden evaluarse "in vitro" y además porque se trata de un modelo humano lo cual hace innecesaria cualquier extrapolación.

Resultaría interesante poder estudiar y comparar la regulación de la división celular de una célula como la linfoide y de sus elementos aislados. Es decir, no sólo ver que sucede con la célula entera, sino que sucedería si uno pudiera componer las partes de una célula y observar así su funcionamiento durante ese proceso.

Es así como se pensó en preparar núcleos aislados de los tres estados linfoides mencionados y provocar una síntesis de ADN "in vitro". De esta forma se podría comparar el sistema núcleo aislado-célula entera, en cuanto a la capacidad de síntesis de ADN y al producto obtenido. Además se podrían inferir conclusiones sobre los factores que intervendrían en su regulación.

Como medida de la replicación se utilizó en primera instancia, la propiedad del ADN de incorporar nucleósidos como la timidina. Los linfocitos estimulados inespecíficamente, lo incorporan mientras que los linfocitos en reposo, no. Sin embargo, se observó que esta diferencia desaparecía al trabajar con los núcleos aislados de ambos sistemas, ya que tanto el núcleo del linfocito estimulado como el del no estimulado, eran igualmente capaces de incorporar el nucleótido trifosfato correspondiente (TTP) y sintetizar ADN. Este hecho sugirió que debían existir factores que controlaran la síntesis del ADN fuera del núcleo, es decir, desde el citoplasma o la membrana celular. Los resultados expuestos en esta tesis, apuntan hacia la clarificación de esos factores y a su importancia como reguladores de la división celular.

Para su realización se prepararon extractos citoplasmáticos de tejidos normales y neoplásicos linfoides y no linfoides, humanos y murinos. Se ensayaron los productos obtenidos sobre distintos sistemas "in vitro" e "in vivo" y se estudió el efecto producido por los mismos sobre la res-

puesta inmune y el desarrollo tumoral.

Para verificar el efecto de las chalonas sobre la respuesta inmune, se estudió como actuaban sobre el mecanismo de citotoxicidad mediada por células, reacciones de hipersensibilidad tardía, reacciones de injerto contra huésped, acciones inmunoregulatorias como la supresión por linfocito T supresores y variaciones en la inmunidad humoral específica.

Respecto a la interferencia de las chalonas con el desarrollo tumoral, se estudió el efecto de las mismas sobre la incidencia de un tumor alogeneico, la sobrevida y la latencia tumoral en animales con tumores murinos singeneicos y alogeneicos. Además gracias a la existencia de técnicas de cultivo "in vitro", que permiten el establecimiento de líneas celulares y cultivos cortos de células hematopoyéticas y de cualquier otro tejido, se ha podido estudiar el efecto producido sobre células provenientes de distintas afecciones linfoproliferativas malignas.

Finalmente, se intentó la purificación y caracterización parcial de los inhibidores obtenidos en todos los sistemas estudiados con el fin de observar cuali y cuantitativamente las diferencias y las posibilidades de aplicación terapéutica.

MATERIALES Y METODOS

1.- Preparación de linfocitos de sangre periférica humana

500 ml de sangre desfibrinada con perlas de vidrio se mezclaron con 30 ml de Dextrano T500 (Sigma) al 10%, disuelto en solución fisiológica. Se dejó sedimentar por acción gravitatoria durante 30 minutos. El plasma se cnetrifugó a 100 x g durante 30 minutos y se resuspendió en un volumen conveniente de solución de Hanks a una concentración de $5-6 \times 10^6$ células/ml. Se sembraron 4 ml de la resuspensión celular ($20-30 \times 10^6$ células) sobre 3 ml de un gradiente isopícnico de Ficoll-Hypaque (9%;33%) según técnica de Boylton (109). Se centrifugó 45 minutos a 400 x g. Se tomaron los linfocitos que quedaron en la interfase del gradiente, se diluyeron en Hanks y se lavaron 2 veces. Luego se congelaron los linfocitos a -70°C ó en el caso de utilizarse para cultivos se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado.

2.- Preparación de linfocitos murinos

Se sacrificaron ratones de las cepas BALB,AKR y Swiss de 2-4 meses de edad y se homogeneizaron los bazos correspondientes sobre malla de alambre fino. Se lavaron las células con Hanks y se lisaron los glóbulos rojos con una solución de Tris- ClNH_4 pH 7.2 durante 10 minutos a 37°C . Se realizaron 2 lavados con Hanks y se congelaron las células a -70°C o se cultivaron como se indica más adelante.

3.- Obtención de linfocitos de timo, amígdala y ganglio humano

Se extrajeron células de estos tejidos mediante pasaje de los grumos celulares a través de agujas de calibre decreciente. Se lavaron las células así obtenidas con Hanks 2 veces. Se lisaron los glóbulos rojos con Tris- ClNH_4 como se detalla en 2. Se lavaron los linfocitos en Hanks y se congelaron o se cultivaron.

4.- Obtención de linfocitos de médula ósea humana

Se dejó sedimentar el material obtenido de la punción durante 30 minutos hasta dos horas a 37°C. Se separó el sobrenadante y se lavó con Hanks. Se lisaron los glóbulos rojos con Tris-ClNH₄ como se indica en 2. Se lavó luego con Hanks y se resuspendieron las células a 5 x 10⁶ células/ml en medio RPMI 1640 suplementado.

5.- Obtención de linfocitos leucémicos

En el caso humano se obtuvieron los linfocitos a partir de sangre periférica, médula ósea y ganglio. En el caso murino se obtuvieron a partir de tumores de origen linfoide.

6.- Cultivo de líneas celulares

Se usaron las siguientes líneas celulares:

HR1K: linfoblastoide B derivada de un linfoma de Burkitt productora de virus de Epstein Barr

RAJI: linfoblastoide B derivada de un linfoma de Burkitt no productora de virus.

CCRF-CEM: linfoblastoide T derivada de una leucemia linfoblástica aguda.

Hep.2: derivada de un carcinoma epidermoide laríngeo humano

V 79: línea obtenida de células embrionarias de hamster

NB4 1A3: línea obtenida a partir de un neuroblastoma de ratón

KB: carcinoma epidermoideo humano.

7.- Ensayos para comprobar pureza e identificación de los linfocitos obtenidos.

a) Para verificar la pureza de las preparaciones se realizaron coloraciones con la técnica de May-Grünwald-Giemsa.

b) Para verificar la viabilidad se utilizó la técnica de Azul Tripán.

c) Para identificar las poblaciones linfoides T y B se utilizaron las siguientes técnicas respectivamente: i) Rosetas E a 4°C: Se mezclaron 0.1 ml de linfocitos (5×10^6 células/ml en Hank's) con 0.1 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 1% en Hank's. Luego de una incubación de 15 minutos a 37°C se centrifugaron las células y se las incubó de 2 a 24 horas en heladera a 4°C. Luego de una suave resuspensión, se contaron el número de rosetas y el número de linfocitos por campo hasta llegar a por lo menos 200 linfocitos. Se consideraron rosetas positivas a aquellos linfocitos que tenían adherido a su membrana por lo menos 3 glóbulos rojos (110).

ii) Inmunoglobulinas de superficie: Se incubaron los linfocitos con 40 µl de anti-suero anti-inmunoglobulina humana total conjugado con tiocianato de fluoresceína, producida en conejo, a 4°C durante 30 minutos. Se lavaron las células (1.5×10^6) 3 veces con PBS (buffer fosfato pH 7.2) y al pellet final se lo resuspendió con una gota de buffer glicina pH 8.6 con glicerina al 60%. La lectura se efectuó en un microscopio Zeiss de fluorescencia con epiiluminación, contándose el porcentaje de células positivas que presentaban un anillo fluorescente.

8.- Cultivo de linfocitos

En los casos de cultivo, la separación y procesamiento de linfocitos se realizó en forma estéril. Una vez obtenidos los linfocitos humanos como se indicó en el punto 1, se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 linfocitos/ml de medio de cultivo: RPMI 1640 suplementado con 10% suero humano AB Rh (+) de complementado, gentamicina 50 µg/ml, 1% de anfotericina B y glutamina 1mM. Para los linfocitos murinos se utilizó suero bovino fetal en lugar de suero AB.

9.- Estimulación blástica de linfocitos

Los linfocitos humanos o murinos cultivados en el medio apropiado, se

incubaron en presencia de los siguientes mitógenos en los distintos casos que se verán en los Resultados: Fitohemaglutinina (PHA-P, Difco, 100 µg/ml), Concanavalina A (Con A, Sigma 20 µg/ml), Pokeweed mitogen (PWM, GIBCO , dilución 1/100) y Lipopolisacárido (LPS, Sigma, 100 µg/ml). Los tiempos de incubación a 37°C y en estufa gaseada con 5% de CO₂ y humidificada , fueron de 72 horas para la PHA y el LPS, 96 horas para la Con A y 7 días para el PWM. En todos los casos, 24 horas antes de cosechar, para los linfocitos murinos y 3 horas antes para los linfocitos humanos, se agregó 1 µCi de timidina tritiada (dT-H³) (NEN actividad específica 20 Ci/mmol). El material precipitable por ácido tricloroacético (TCA) al 10% (5% final), se disolvió en un disolvente orgánico NCS (Amersham, Searle) y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Tricarb Packard. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado. En algunos casos los cultivos fueron cosechados sobre papel Whatman GF/A que luego de secarse, se introdujo en viales con mezcla de centelleo (POPOP 5 gr, PPO 0.3 gr, ácido acético 2 ml, tolueno 1 litro) y finalmente se contó en el contador de centelleo líquido. El índice de estimulación blástica (I.E.) se calculó con la siguiente fórmula:

$$I.E. = \frac{\text{c.p.m. cultivo con mitógeno (estimulado)}}{\text{c.p.m. cultivo sin mitógeno (control)}}$$

En todos los casos se realizaron simultáneamente a los cultivos con mitógeno, cultivos control, que son aquellos en los cuales se omitió el mitógeno.

10.- Función supresora T-T inducida por Con A

Los linfocitos se preincubaron 24 horas con Con A (10 µg/ml) en estufa humidificada y con 5% de CO₂ a 37°C. Paralelamente se realizaron controles, preincubando 24 horas sin Con A. Luego de esta incubación ambos cultivos (con y sin Con A) se incubaron con mitomicina C (Sigma,

50 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron 3 veces con RPMI 1640 y se resuspendieron en medio de cultivo completo ajustándose la concentración a 1×10^6 células/ml. Para demostrar el efecto supresor generado durante la preincubación con Con A, se realizaron cultivos autólogos de linfocitos cultivados el día anterior con o sin Con A y tratados con mitomicina C, ambos del mismo dador. Se efectuaron los cultivos en tubos y se utilizaron dos mitógenos para visualizar el efecto supresor: PHA (100 µg/ml) y Con A (20 µg/ml). Luego de 72 horas se procedió igual que en el punto 9. el porcentaje de inhibición se calculó así:

$$\% \text{ Inhibición: } \left(\frac{1 - \Delta \text{c.p.m. linfocitos preincubados con Con A}}{\Delta \text{c.p.m. linfocitos preincubados sin Con A}} \right) \times 100$$

11.- Cultivo de líneas celulares

Las líneas RAJI, CCRF-CEM y HR1K se cultivaron en medio RPMI 1640, 10% suero bovino fetal, glutamina 1mM. gentamicina 50 µg/ml y anfostat al 1%. La línea Hep-2 se mantuvo en medio MEM suplementado con suero bovino fetal al 20%. Las líneas V 79,KB, Neuroblastoma y Hela se mantuvieron en medio 199 suplementado con 20% suero bovino fetal. Los cultivos primarios de fibroblastos se realizaron en MEM. Todas las líneas se mantuvieron a 37°C en estufa humidificada y con 5% CO₂.

12.- Preparación de núcleos aislados

Los cultivos de linfocitos se centrifugaron luego de las 72 horas de estimulación sin el agregado de dT-H³, a 1000 x g durante 10 minutos y fueron resuspendidos en un buffer fosfato 10 mM pH 6.5-Cl₂Mg 10 mM (2 ml por cada 50×10^6 células). Se dejó en hielo durante 20 minutos para permitir que las células se hincharan y la suspensión se homogeneizó 40 veces con un homogeneizador tipo Dounce y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en el mismo volumen de

un buffer fosfato de K pH 7, Cl_2Mg 1mM, sacarosa 0.32 M y 0.3% Tritón 101 (buffer Tritón). Se dejó en hielo 15 minutos y la suspensión se homogeneizó 15 veces con un homogeneizador tipo Dounce. Luego se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos. El precipitado nuclear se resuspendió en un volumen apropiado de buffer A: sacarosa 0.25 M, KCl 6mM Tris 11 mM pH 7.5, MgCl_2 3.3mM, mercaptoetanol 1mM. Se distribuyó en varios tubos y se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos.

13.- Medida de la síntesis de ADN

i) Para células enteras: se agregó 1 μCi de dT-H^3 (NEN ae.esp.20 Ci/mM) a 2 ml de cultivo de linfocitos (1×10^6 células/ml). Después de 3 horas a 37°C las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en agua; se agregaron 0.2 ml de DNA desnaturalizado por calentamiento (2.5 mg/ml en buffer Tris) y se precipitó con tricloroacético al 10%. El precipitado se recogió en filtros Whatman GF/C lavándose con 20 ml de pirofosfato de sodio 0.3 M, 10 ml HCl 0.05 M y 2 ml de etanol. Previo secado se contó en contador de centelleo líquido.

ii) Para núcleos aislados: se determinó la incorporación de nucleótidos trifosfatos. Pellets conteniendo 3-10 x 10^6 núcleos se resuspendieron en 0.3 ml de una mezcla de reacción que contenía: Hepes 50 mM pH 7.2, Cl_2Ca 0.2 mM, Cl_2Mg 8.3 mM, DTT 1 mM, 66 μM en dCTP, dATP y dGTP. Se incubaron con 1000 cpm/pmol de TTP-H^3 (NEN act.esp.40 Ci/mmol) durante 30 minutos a 30°C. Se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en pirofosfato de sodio 0.1 M, 0.2 ml de ADN desnaturalizado (2.5 mg/ml) y 0.9 ml de agua. Se precipitó con perclórico. El precipitado final se resuspendió en NCS (Amersham, Searle) y se contó la radioactividad en contador de centelleo líquido usando como mezcla de centelleo POPOP-PPO-Tolueno acético.

14.- Extracción del ADN

El pellet nuclear se resuspendió en Hepes 0.1 M pH 7.5 y 0.1 ml de

SDS 10%. Se dejó durante 60 minutos y se agregaron 20 μ l de Pronasa (Sigma 2.5 mg/ml en Hepes 50 mM pH 7.5, preincubada 30 min. a 30°C). Se dejó actuar 5 horas y se agregaron 500 μ g de ADN nativo. Se extrajo con una mezcla fenólica, agitando y calentando a 60°C, 10 min. Se centrifugó y la fase inferior se extrajo con 1 ml de Hepes 0.1 M pH 7.2, SDS 0.5%. Se centrifugó nuevamente y se juntaron las fases acuosas que se extrajeron con una mezcla de cloroformo; alcohol isoamílico (99:1). La fase acuosa se precipitó toda la noche con 2 volúmenes de etanol y 0.2 ml de acetato de sodio 0.2 N. Se centrifugó a 3000 x g y se resuspendió el ADN en 1 ml de SSC 0.1 X.

15.- Caracterización del ADN obtenido

i) Enzimática: el ADN extraído se trató con 66 μ g de DNasa pancreática (Sigma), Cl_2Mg 0.1 M y buffer acetato 0.2 M pH 5 (1 h a 37°C) También se trató separadamente con Rnasa pancreática previamente hervida, EDTA 10mM y buffer acetato 0.2 M pH 5. En el segundo caso se incubó 3 horas a 37°C.

ii) Análisis del tipo de ADN: Para ello se recurrió a marcar el ADN con precursores radioactivos. Para obtener ADN liviano, se cultivaron 50×10^6 linfocitos estimulados con PHA (72 horas) en presencia de $dT-C^{14}$ durante 7 horas a 37°C. Se extrajo el ADN como se indicó en el punto 14 (ADN pesado) y para separar ambas hebras se calentó a 100°C durante 10 minutos y se enfrió rápidamente. Para obtener un ADN híbrido, se cultivaron 50×10^6 linfocitos estimulados con PHA (72 horas) con 1 μ Ci/ml de $dT-C^{14}$ y 10 μ g/ml de BrdU (Bromodeoxiuridina, análogo de dT). Se extrajo el ADN como en el punto 14.

iii) Gradientes de ClCs (Cloruro de Cesio): Se utilizaron tubos de nitrocelulosa conteniendo 4.2 g de ClCs/3 ml de "solución". La "solución" consistió en el ADN que se quisiera analizar, resuspendido en Tris 0.05 M pH 7.5, EDTA 1mM y se llevo a volumen con SSC 0.1 X. De

esta manera la densidad de las "soluciones" iniciales fue de 1.730 g/ml. Se dejó correr el gradiente en una ultracentrífuga Spinco con Rotor SW 50.1, 48 horas a 38.000 rpm. Se separaron los gradientes colectando fracciones de 2 gotas por tubo y se midió la radioactividad de cada tubo con la técnica descrita en el punto 13 ii.

iv) Gradientes de sacarosa: Los núcleos aislados se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos y se les agregó SDS al 10% para que quedara 0.3% final y 0.3 ml de Hepes 0.5 M pH 7.5. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se agregó NaOH 0.2 M final y se llevó con Hepes a 0.4 ml. Se prepararon gradientes continuos de sacarosa 5-20% con soluciones de sacarosa al 20% en ClNa 0.8 M y NaOH 0.2 M y la misma con 0% de sacarosa. Se sembraron los 0.4 ml de muestra y se corrió en una ultracentrífuga Spinco con rotor SW 50 a 50.000 rpm durante 3 horas. Se recogieron fracciones de 10 gotas por tubo y se trataron igual que 13 ii.

16.- Preparación de extractos citoplasmáticos (Chalonas) (E.C.)

Los extractos de todos los orígenes se prepararon de la misma forma. Las células ($2-10 \times 10^8$) se resuspendieron en un buffer fosfato 10 mM pH 6.5, Cl_2Mg 10 mM ($2ml/50 \times 10^6$ células). Se dejó en hielo durante 20 minutos y se homogeneizó 40 veces con un homogeneizador tipo Dounce. Se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10.000 x g durante 60 minutos y luego a 105.000 x g durante 60 minutos. Finalmente se esterilizó a través de filtros Millipore HA 0.45 μ M y se distribuyó en varias fracciones, guardándose a -70°C. En todos los casos se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (111).

17.- Caracterización del extracto citoplásmico obtenido

i) Enzimáticas: Alícuotas de 1 ml de E.C. de linfocitos normales en reposo, que contenían 1250 μ g de proteínas, fueron tratadas con 500 μ g de DNasa y RNasa (Sigma) durante 2 horas a 37°C. Luego se ensayó el

efecto como se indica en el punto 18.

ii) Electroforéticas: se realizaron geles de poliacrilamida verticales y con SDS horizontales, con E.C., previamente liofilizado y re-suspendido en 100 μ l de solución fisiológica.

iii) Columnas de Sephadex: Se cargaron 2 mg de proteínas (E.C.) de los distintos extractos en una columna de 1.6 x 14 cm de Sephadex de distintos tamaños G-50 y G-25 (Pharmacia-Uppsala) previamente lavada con buffer fosfato 10 mM pH 6.5 Cl_2Mg 10 mM y calibrada con patrones conocidos. Se eluyó con el mismo buffer recogiendo fracciones de 1.2 ml cuya concentración proteica se determinó por el método de Lowry y absorbancia a 260, 280 y 320 nm. Luego la actividad de cada fracción se determinó como se indica en el punto 18.

18.- Ensayos de actividad de extractos citoplasmáticos

Se utilizaron 400 μ g de proteína/ml de cultivo de células a 1×10^6 /ml. Se realizaron controles paralelos reemplazando el E.C. por un volumen equivalente de buffer fosfato 10mM pH 6.5- Cl_2Mg 10 mM. Los ensayos se hicieron por triplicado sobre las líneas celulares HR1K y RAJI en general y sobre otros sistemas como se verá en los Resultados. La actividad se midió por la inhibición que los E.C. producían sobre la actividad mitótica. Los resultados se compararon con los controles. El porcentaje de inhibición se determinó por diferencias en el recuento celular y por diferencias en la incorporación de $dT-H^3$. Se calculó el % de inhibición como: $\frac{\text{datos con E.C.}}{\text{datos sin E.C.}} \times 100$

datos sin E.C.

donde datos= c.p.m. ó N° de células.

19.- Ensayos de efecto biológico del extracto citoplasmático

i) Efecto sobre la incidencia de un tumor alogeneico: se inoculó

ratones de la cepa BALB/c (machos de 2 meses) con extracto citoplasmático de linfocitos murinos de distintos orígenes (singeneico y alogeneico) en dosis de 400 µg tanto intraperitoneal como "in situ", con un tumor alogeneico AKR, llamado L 15 en cilindro de vidrio como ya se ha descrito (112) , como control se usó buffer fosfato o linfocitos singeneicos viables. Se determinó la incidencia tumoral 30 días después de la inoculación. En cada experimento se utilizaron grupos de 6 ratones.

ii) Medida de citotoxicidad "in vitro" Se utilizaron células L15 como blanco. Se resuspendieron 1×10^8 células en 0.1 ml de medio 199 sin suero y se incubaron 1 hora a 37°C con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$. Se lavaron luego 5 veces con el mismo medio pero con suero bovino fetal y se resuspendieron a 50.000 células/ml. La relación linfocitos: células blanco que se usó fue de 100:1. Manteniendo esta relación , se mezclaron volúmenes iguales y se centrifugaron 15 minutos a 100 x g. Se incubaron 3 horas a 37°C y luego se paró la reacción con una solución salina fría (PBS). Se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos en frío. Se contó la radioactividad del sobrenadante en un contador gamma de pozo. Para calcular la liberación total, se agregó a un tubo con células blanco, agua destilada (1.5 ml) y se las congeló y descongeló 3 veces, permaneciendo luego a 37°C hasta el día siguiente. Las cpm totales son las cpm del sobrenadante más las del pellet. Las cuentas liberadas espontáneamente son las del sobrenadante corregido dividido las totales x 100. Finalmente la citotoxicidad se calcula como=
$$\frac{\text{N}^\circ \text{cpm totales} - \text{N}^\circ \text{cpm espontáneo}}{\text{N}^\circ \text{cpm experim} - \text{N}^\circ \text{cpm control}} \times 100$$

iii) Medida de hipersensibilidad tardía: Se inyectaron 1×10^8 glóbulos rojos de carnero (SRBC) en la pata derecha de machos BALB/c de 6 meses de edad (113). En los casos indicados en los Resultados, se inyectó E.C. de linfocitos BALB/c ($\text{EC}_{\text{Balb/c}}$) i.p (400 µg por ratón) o igual volumen de buffer fosfato como control. Al sexto día se desencadenó la

reacción inyectando 1×10^8 SRBC en la pata izquierda simultáneamente con EC_{Balb/c} o buffer en forma i.p. A las 24 y 48 horas, se leyeron los diámetros de las patas izquierda y derecha/animal con un calibre. Se realizó una determinación de anticuerpos con una prueba de hemaglutinación directa hacia SRBC en cada uno de los sueros de los animales utilizados para los experimentos. Los resultados obtenidos son las medias de grupos de 8 animales en 3 experimentos distintos.

iv) Reacción de injerto contra huésped: Una semana antes, se pre inmunizaron 2 ratones BALB/c, hembras, con linfocitos de la cepa Swiss en presencia de EC_{Balb/c} o con medio MEM como control. Luego se purificaron linfocitos de esos BALB/c y se inyectaron en ratones SWISS recién nacidos teniendo así 2 grupos: aquellos que recibieron linfocitos BALB/c de ratones preinmunizados en presencia de EC_{Balb/c} y aquellos que recibieron linfocitos BALB/c de ratones preinmunizados en ausencia de EC_{Balb/c}. Los bazo se pesaron a los 10 días. Se determinó el índice esplénico haciendo promedios de los pesos de los bazo y de los animales por grupo.

v) Efecto de E.C. sobre la incidencia, latencia y sobrevida de tumores.

Animales:	F1 (Swiss x AKR)	BALB/c	Swiss
Tumor:	L 15 (Linfoma)	Leucemia Crónica Murina	Sarcoma 180
Origen E.C.:	Swiss	Balb/c	Balb/c
Inoculación:	i.p.	i.p.	i.p.
Dosis:	400/800 µg	900 µg	900 µg
Administración:	2-,0,2,4,6,	-2,0,2,4,6,8	idem (días)
Grupos de:	6	18	18 animales

En todos los experimentos se determinó el período de latencia (Tiempo entre inoculación y aparición del tumor), incidencia del tumor (aparición o no del mismo) y la sobrevida (Tiempo entre la inoculación y la muerte).

RESULTADOS

I.- Comparación entre la síntesis de ADN de linfocitos humanos en reposo, linfocitos humanos estimulados inespecíficamente y líneas celulares linfoblastoides importantes

1.- Estudio en células enteras

Para estudiar la síntesis de ADN, se cultivaron linfocitos humanos en ausencia y presencia de PHA como mitógeno y se determinó la incorporación de un nucleótido tritiado ($dT-H^3$) luego de 72 horas de cultivo en los mismos junto a una idéntica determinación en la línea celular linfoblastoide RAJI. Los resultados pueden observarse en la Tabla I en la cual los linfocitos estimulados y la línea celular incorporan el precursor mencionado mientras que el linfocito en reposo, en comparación, prácticamente incorpora muy poco.

2.- Estudio en núcleos aislados

Para tener resultados comparables, fue necesario optimizar el sistema nuclear tomando como base sistemas descritos anteriormente (114) Se obtuvieron así las concentraciones y los tiempos de incubación óptimos tanto para núcleos de linfocitos estimulados como linfocitos sin estimular y de células RAJI. Los resultados se presentan en las figuras 1 y 2. Se consideró que la concentración ideal era 5×10^6 núcleos y el tiempo de incubación óptimo, 30 minutos.

Como se deduce de la Tabla I, los núcleos de linfocitos en reposo (-PHA), los núcleos de linfocitos estimulados (+PHA) y los de células RAJI son igualmente capaces de incorporar $TTP-H^3$ contrariamente a lo que sucede a nivel de célula entera. Este hecho fue el que hizo pensar en la existencia de factores extranucleares que regularan la síntesis de ADN.

3.- Análisis enzimático del ADN sintetizado en los 3 sistemas

Para verificar si el producto nuclear sintetizado "in vivo e in vitro" era efectivamente ADN, una vez aislado el mismo, se procedió a caracterizarlo enzimáticamente. Para ello se trató el ADN con DNasa y RNasa como se indica en materiales y métodos. Observando la Tabla II, el ADN extraído de células enteras, ya sea de linfocitos estimulados con PHA o de células RAJI, es sensible a la DNasa pero no a la RNasa. El análisis de los productos extraídos de núcleos de linfocitos estimulados y no estimulados también muestra alta sensibilidad a la DNasa y baja a la RNasa.

4.- Análisis del tamaño de ADN sintetizado

El tamaño del ADN se dilucidó por medio de gradientes de sacarosa. Para ello se marcó radiosiotópicamente el ADN de linfocitos estimulados con dT-C¹⁴ y se extrajo el ADN. Simultáneamente se obtuvieron núcleos de linfocitos estimulados y no estimulados que se incubaron con la mezcla apropiada de nucleótido trifosfato utilizando como marcador TTP-H³, para lograr síntesis de ADN "in vitro". Se extrajo el ADN en ambos casos y los tres ADN se corrieron en gradientes de sacarosa. Los datos presentados en la Figura 3 revelan que el ADN sintetizado por la célula entera es más pesado que el sintetizado por los núcleos aislados. Por otro lado aquel sintetizado por el núcleo de linfocitos estimulados, es idéntico en tamaño al sintetizado por el núcleo de linfocitos sin estimular.

5.- Puntos de replicación "in vivo" e "in vitro"

Seguidamente fue necesario determinar si la síntesis de ADN determinada en estos ensayos, reflejaba un proceso replicativo o síntesis reparativa. Para ello, se recurrió a análogos de la dT como la bromodeoxiuridina (BrdU) y al análisis de los distintos ADN por medio de gradientes de cloruro de cesio (ClCs). Al incorporarse la BrdU al ADN,

en lugar de la dT, el ADN sintetizado es más pesado que aquel que incorpora solo dT. Si el proceso que ocurre es de síntesis replicativa, el ADN obtenido en presencia de BrdU sería un híbrido cuya densidad de bandeo estaría entre la densidad de bandeo de cadenas de ADN pesadas y livianas dado que la síntesis replicativa es semiconservativa. Además en ausencia de proceso reparativo, el ADN obtenido, bandearía como un único pico y no en varios de densidad distinta. Para identificar la zona de bandeo del ADN, los núcleos aislados se incubaron en presencia de TTP- H^3 junto con los demás nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN en núcleo aislado. Se prepararon marcadores patrones de ADN pesado, híbrido y liviano. Se cultivaron linfocitos humanos en presencia de BrdU y PHA. Se aislaron luego los núcleos y se incubaron en presencia de TTP- H^3 . Finalmente se aisló el ADN y se corrió en gradientes isopícnicos de ClCs. Para asegurar que el ADN patrón utilizado era de la densidad apropiada, se utilizó ADN-P 32 de bacteriófago T4 junto a ADN-C 14 de linfocitos incubados durante 18 horas con dT-C 14 , observándose que la densidad de bandeo de ambos ADN era idéntica. Como se puede apreciar en la Figura 4A, el linfocito estimulado sintetiza un ADN híbrido, en presencia de BrdU, que bandea entre la zona liviana y la pesada, como un pico único. Deducimos así que la síntesis de ADN observada es producto de un proceso replicativo. Al desnaturalizar el ADN y separar ambas hebras (Figura 4B), el gradiente revela la presencia de una hebra liviana y otra pesada. Esta observación descarta que pueda haber ocurrido una sustitución importante en ambas hebras por procesos reparativos pues si así fuera encontraría dos hebras que bandearían entre la zona liviana y pesada y no dos hebras que coinciden una con la zona pesada y otra con la liviana. Finalmente se puede concluir de esta serie de experimentos que los puntos de replicación "in vitro" son una continuación de los preexistentes "in vivo", porque en el caso contrario, deberían haber aparecido picos de densidad liviana, producto de sitios nuevos de replicación que podrían haber surgido en el estado de núcleo aislado.

II.- Efecto de factores celulares solubles endógenos de origen linfoide humano sobre la síntesis de ADN

Como se desprende de los resultados obtenidos en el sistema linfocito en reposo -linfocito estimulado, a nivel de célula entera y núcleo aislado, existiría algún control fuera del núcleo celular, que de alguna manera regularía la síntesis del ADN del linfocito en reposo. Este factor (o factores) podría encontrarse en el citoplasma celular, que la membrana celular o ser extracelular.

Pensando que el citoplasma sería el lugar más indicado, se prepararon extractos citoplasmáticos de distintos orígenes linfoides y se ensayó su poder de inhibición de la actividad mitótica también sobre distintos sistemas.

1.- Efecto de extractos citoplasmáticos (EC_L) de linfocitos normales en reposo sobre distintas células

Se preparó EC_L a partir de linfocitos humanos normales de varios donadores. Se cultivaron células de distintos tipos (2 ml a 10^6 células/ml) durante 24 horas a $37^\circ C$ en presencia de 400 μg de proteínas/ml de cultivo, de EC_L ó con un volumen equivalente de buffer fosfato. Al cabo de ese tiempo, se realizaron recuentos con Azul Tripán y pulsos de $dT-H^3$ para determinar la actividad mitótica. Los resultados se presentan en la Tabla III. Los controles, células incubadas en ausencia de EC_L tuvieron un viabilidad del 92%. Este dato habla en contra de cualquier efecto citotóxico que pudiera ejercer el buffer fosfato. Al incubar las células con EC_L , los porcentajes de viabilidad oscilaron entre 85 y 93%. Nuevamente se descartaría la posibilidad de que el EC_L tuviera algún efecto citotóxico sobre las mismas.

Respecto al efecto inhibitorio sobre la actividad mitótica, se puede observar en la misma tabla, que células linfoides de origen T y B, linfocitos humanos estimulados con PHA, el cultivo mixto de linfocitos y linfoblastos leucémicos obtenidos de sangre periférica

y médula ósea, son inhibidos por EC_L . Células que no sean de origen linfoide (KB, HEP, HELA) no fueron afectadas por la presencia de EC_L .

2.- Dosis de EC_L vs. efecto sobre la actividad mitótica

Se estudió el efecto que producían distintas concentraciones de EC_L sobre la actividad mitótica de una línea celular (HR1K). Se ensayaron las dosis desde 50 μg a 800 μg de proteína /ml de cultivo final, incubándose las células durante 24 horas en presencia de EC_L y con un pulso de $dT-H^3$ de 2 horas previo a la cosecha. Los resultados se presentan en la figura 5. La relación dosis-efecto fue lineal entre 50 y 500 μg pero aún a 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no se logró inhibición total. Además la diferencia del poder inhibitorio que producen 800 μg de EC_L no es el doble que al usar 400 μg ; por lo tanto se decidió utilizar esta última concentración en experimentos futuros.

3.- Características del extracto citoplasmático linfoide normal (EC_L)

Para caracterizar el EC_L se utilizó una misma preparación de extracto obtenido a partir de 2×10^9 linfocitos. Luego de distintos tratamientos a alícuotas similares, se determinó en cada caso, la capacidad residual de inhibir la actividad mitótica de la línea celular HR1K. Los resultados se muestran en la Tabla IV en comparación con EC_L sin tratar. Como se puede apreciar, enzimas como la DNasa y la RNasa no afectaron al extracto mientras que pronasa y tripsina lo inactivaron. Respecto a la estabilidad térmica, el calentamiento a 56° C no afectó al EC_L ; sin embargo descongelamientos sucesivos o la permanencia en estado congelado mayor de 2 meses, inactiva al EC_L . Estos resultados hablan a favor de la composición proteica del EC_L .

Se realizaron corridas electroforéticas del EC_L junto con suero humano normal y patrones de pesos moleculares conocidos (mezcla de Citocromo C, Tripsina, Lactodehidrogenasa y albúmina). Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida verticales y placas de poliacrilamida con SDS. Las bandas obtenidas en ambos sistemas, se encontraron entre

los pesos moleculares 15.000 y 62.000.

Al correrse el EC_L contra antisuero humano total en una micro-immunoelectroforesis, se observaron dos bandas; una coincidente con albúmina sérica y otra con gamma globulina. Para ahondar más en el peso molecular del EC_L , se recurrió a la cromatografía en columna mediante Sephadex G-25. Luego de calíbrar la columna con azul dextrán, se cargaron 2 mg de proteína de EC_L que se eluyeron con buffer fosfato. Se recogieron fracciones de 1.2 ml y se determinó por un lado la concentración proteica de cada fracción y por el otro, la capacidad de inhibir la actividad mitótica. El resultado se puede observar en la Figura 6, en la cual existen 2 picos de actividad proteica, coincidentes con actividad anti-mitótica: el pico S I corresponde a la fracción que no se fijó a la columna y el S II a aquella que corresponde a pesos moleculares menores de 25.000 dado que se incluyó en la columna.

4.- Reversibilidad del efecto inhibitorio

Con el fin de investigar si el efecto del EC_L era reversible, se incubaron células HR1K en presencia de EC_L durante 23 horas. Simultáneamente se cultivaron igual número de células pero sin ningún extracto. Además se cultivaron las mismas células a la misma concentración inicial en presencia de extractos y en ausencia de ellos durante 20 horas, tiempo en el cual se lavaron, se resuspendieron en medio de cultivo fresco y permanecieron en cultivo durante 3 horas más (hasta completar las 23 horas). En ese momento se agregó a todos los cultivos 1 μ Ci de $dT-H^3$ y la incubación se prolongó por 2 horas más. Se determinó (Tabla V) la reversibilidad del efecto inhibitorio a través de recuentos celulares y por la capacidad de incorporar el radioisótopo mencionado. Como controles, se cultivaron células HR1K a la misma concentración inicial en presencia de EC y en ausencia del mismo solamente durante 20 horas y se les dió un pulso de $dT-H^3$ de 2 horas. Los resultados indican que se ha logrado una reversión parcial del efecto

inhibitorio una vez retirado el EC del medio, permitiendo que las células recuperen su velocidad de crecimiento.

5.- Efecto producido por extractos citoplasmáticos humanos de distintos orígenes tisulares sobre células linfoides

Se ensayó el efecto producido por extractos citoplasmáticos de diversos tejidos sobre células linfoides. Para ello se prepararon extractos de : leucemias linfoblásticas agudas (LLA)(T,B y nulas), leucemias linfoides crónicas (LLC), Linfomas Hodgkin y no Hodgkin, células tímicas, linfocitos B a partir de amígdalas, linfocitos normales estimulados con PHA, células de las líneas HR1K, RAJI y CCRF y células Burkitt "like". Los ensayos de actividad de los extractos se realizaron sobre células HR1K. Los resultados se presentan en la Tabla VI. El mayor efecto inhibitorio se logró con células de origen T (LLA T y T/B)(CCRF) Por otro lado células B puras o líneas celulares de origen B tuvieron poco o ningún efecto. Lo mismo sucedió con extractos de ambos tipos de linfomas y con linfocitos estimulados, donde el efecto encontrado fue significativamente menor que el obtenido con linfocitos normales o con linfocitos T.

6.- Diferencias entre los EC_L normales y neoplásicos

Al observar que las LLA poseían un factor inhibitorio que aparentemente no funcionaría "in vivo", se intentó verificar si existían diferencias, en cuanto al peso molecular, entre los extractos leucémicos y los normales. Al mismo tiempo se estudiaron de igual manera aquellos obtenidos de células tímicas, linfomas Hodgkin y de leucemias linfoides crónicas. Los perfiles de Sephadex G-25 realizados en todos ellos, se pueden observar en la figura 7 (A,B,C,D). Para la LLA, se detectaron 3 picos, 2 coincidentes con el EC_L y uno menor, pero todos de actividad proteica significativamente menor que el EC_L pese a haberse cargado la columna con igual contenido proteico inicial. Esto significa que igual cantidad de proteínas se repartieron en mayor número de picos, uno de los cuales es de mucho menor peso molecular. El perfil del EC de células

T demostró un pico de alto peso y otro de bajo peso molecular con poca actividad proteica éste último. Los linfomas y las LLC demostraron dos picos pequeños de escasa actividad coincidentes con el EC_L.

III. -Efecto de extractos citoplasmáticos murinos "in vitro"

Pese a que el sistema linfocito en reposo-linfocito estimulado-célula leucémica(humano) es un excelente modelo para estudiar la regulación de la división celular, no permite ensayos "in vivo". Por lo tanto se buscó otro diseño experimental cambiando de especie. Se eligió así el sistema murino y para ello se corroboraron los resultados obtenidos en linfocitos humanos.

Como fuente mayor de linfocitos murinos, se tomo el bazo de los animales y se prepararon extractos citoplasmáticos (EC) igual que con linfocitos humanos. Los ensayos de actividad inhibitoria se realizaron sobre células singeneicas,alogeneicas y xenogeneicas.

En la Tabla VII, se analizan los efectos producidos por EC de linfocitos en ratones BALB/c: 1) inhibición de la actividad mitótica de linfocitos singeneicos (BALB/c); alogeneicos (AKR) y xenogeneicos (Linfocitos humanos estimulados con PHA); 2) inhibición de la división celular tumoral linfoide (L15,HR1K y RAJI); 3) inespecificidad de especie (inhibición de linfocitos humanos estimulados); 4) especificidad de tejido (ausencia de inhibición sobre cultivo de fibroblastos de ratón, neuroblastoma y células V79 de hamster y Hep2 humanas). Los efectos inhibitorios no se debieron a fenómenos citotóxicos, ya que los porcentajes de viabilidad celular de los cultivos en presencia o ausencia de EC, eran similares (90.6 ± 4.2 y 91.3 ± 3.6 respectivamente).

IV. - Efecto de extractos citoplasmáticos "in vivo"

1. - Efecto sobre el crecimiento de un tumor alogeneico

Dado que tanto EC singeneicos como alogeneicos fueron capaces de inhibir la respuesta blastomitogénica de linfocitos murinos cultivados en presencia de PHA,se estudió el efecto que produciría "in vivo" sobre

un tumor alogeneico al extracto utilizado. Para ello se procedió como se indica en el punto 19 de Materiales y Métodos, inyectándose 400 µg/ ratón EC de linfocitos BALB/c a ratones de la cepa BALB/c (n=36) junto al inóculo tumoral proveniente de un linfoma de la cepa AKR. Como controles se inyectaron células tumorales sin EC_{BALB/c} y linfocitos normales BALB/c a sendos grupos de de animales (n=36). Los resultados se observan en la Tabla VIII, en la cual se verifica que la presencia de EC_{BALB/c} favoreció el crecimiento tumoral en un 58% (21/36) de animales que comparado con los controles (30%, 11/36) representa un aumento significativo del 52% en la incidencia tumoral.

2.- Efecto sobre los fenómenos de citotoxicidad

Se estudió el efecto producido sobre la inducción de la citotoxicidad mediada por células y sobre la expresión de la misma. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c con 10^7 células de un linfoma AKR en forma s.c. y 30 días después se reinyectaron en forma i.p. para desencadenar la respuesta citotóxica. Simultáneamente, se inyectó EC_{BALB/c} o buffer fosfato como control. A los 4 días después de la 2da inoculación, se determinó la citotoxicidad mediada por células como se indica en el punto 19ii de Materiales métodos. Se observó (Tabla IX) que EC frescos o congelados fueron capaces de inhibir la inducción de linfocitos T citotóxicos frente a una estimulación alogeneica. Debe notarse que la inyección de EC sólo, sin el estímulo alogeneico, no alteró la liberación de Cr⁵¹ inducida por células BALB/c no inmunizadas.

Con el fin de investigar si se alteraba la expresión de la citotoxicidad en presencia de EC, se añadió EC_{BALB/c} a linfocitos BALB/c previamente inmunizados contra células AKR. Se realizó nuevamente un ensayo de citotoxicidad "in vitro" utilizando como controles, linfocitos BALB/c inmunes que no recibieron EC_{BALB/c} "in vivo", linfocitos BALB/c no inmunes en presencia y ausencia de EC_{BALB/c}. De la Tabla X se deduce que la expresión de la citotoxicidad de linfocitos previamente inmunizados no se altera por la presencia de EC en el ensayo de citotoxicidad.

3.- Efecto sobre reacciones de hipersensibilidad tardía

Para estudiar como afectaba el EC a las reacciones de hipersensibilidad tardía, se utilizaron animales de la cepa BALB/c que se preinmunizaron con glóbulos rojos de carnero (GRC). Simultáneamente, se inyectó $EC_{BALB/c}$ en forma i.p. o un volumen equivalente de buffer fosfato. Las reacciones de hipersensibilidad se leyeron a las 24 y 48 horas después de desencadenar la misma o sea a los 10 días del primer inóculo. Se calculó la media aritmética de los grosores de las almohadillas plantales de los dos grupos, con y sin $EC_{BALB/c}$. Los resultados de 2 experimentos se presentan en la Tabla XI. La inyección de EC el mismo día que el agente sensibilizante, redujo significativamente la reacción hacia los GRC ($p < 0.025$ y 0.00025 en cada experimento). Se titularon también los anticuerpos hemaglutinantes anti-GRC en el suero de los mismos animales y como se puede observar en la misma Tabla. los títulos se redujeron levemente.

4.- Efecto sobre reacciones de injerto contra huésped

Los estudios de injerto contra huésped se realizaron en animales de la cepa SWISS, en ratones recién nacidos. Los mismos fueron inyectados con células preinmunizadas (hacia la cepa SWISS) de origen BALB/c y células BALB/c normales (no preinmunizadas). Los ratones Swiss que recibieron los dos tipos de células fueron inoculados además con $EC_{BALB/c}$ i.p. ó con un volumen apropiado de buffer fosfato. El experimento se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente. El índice esplénico se calculó realizando un promedio de peso de animales y de los bazo. Como se aprecia en la Tabla XII, los animales que recibieron células BALB/c preinmunizadas hacia SWISS y que además recibieron $EC_{BALB/c}$ tuvieron un índice esplénico mayor que aquellos que no recibieron EC. Por los datos obtenidos, el EC parecería inhibir la reacción de reconocimiento de los linfocitos BALB/c hacia los SWISS y por lo tanto una vez inyectados esos linfocitos BALB/c en los ratones SWISS, la reacción que recibieron los linfocitos BALB/c o su capacidad de actuar en contra

de las células de origen SWISS estarían alteradas por la presencia de EC.

5.- Efecto sobre crecimiento tumoral linfoide: incidencia, latencia y sobrevida

Para ver qué efecto producía el EC sobre la incidencia, el crecimiento, la latencia y la sobrevida de animales inoculados con un tumor linfoide, se realizó un experimento piloto, ensayando distintas dosis de EC_{SWISS}. Se utilizaron ratones híbridos F1 (SWISS X AKR) a los que se les inoculó un linfoma linfocítico (L 15) s.c. Se preparó EC_{SWISS} que se inoculó en forma i.p en los días -2, 0, 2, 4 y 6, considerándose día 0 aquel en el cual se inoculó el tumor. Finalmente, se ensayaron dos dosis: 400 µg y 800 µg en cada administración. El grupo consistió en 8 ratones y como controles, se experimentó con 2 grupos de 8 animales cada uno: animales sin EC y animales inyectados con tumor previamente incubado con EC durante 2 hs, 37° C. Los resultados se encuentran graficados en la Figura 8. Con una dosis de 800 µg de EC en cada administración, se aumentó la latencia tumoral en un 50% y con la dosis de 400 µg en un 30%. Referente a la sobrevida, los controles tuvieron una muerte promedio de 20 días, mientras que aquellos que recibieron EC llegaron a un promedio de 31 días lo que significa un 50% de aumento en la sobrevida.

Con estos datos se realizó un experimento idéntico con grupos de 18 animales. Los resultados fueron análogos. La latencia en los animales inyectados con dosis de 800 µg aumentó un 46.8% y un 32% con la dosis de 400 µg. Respecto a la sobrevida, la misma resultó ser significativamente mayor nuevamente en aquellos animales que recibieron EC "in vivo" (48% de aumento para 800 µg y 35% para 400 µg).

Se decidió utilizar otro tumor linfoide, para ver si los resultados se verificaban en él. Para ello se experimentó con animales BALB/c y una leucemia linfoide crónica murina. Como fuente de EC se utilizaron

bazos BALB/c y se inóculó una única dosis de 800 µg/ratón/vez en los días -2,0,2,4,6,8, donde el día 0 representa aquel en el cual se inóculó la leucemia. En este caso se analizaron no sólo la latencia y la sobrevida sino también el tamaño de los tumores. Los resultados se observan en la Figura 9. Los grupos fueron de 18 animales cada uno. Se puede deducir que la presencia de EC ha logrado disminuir el tamaño de los tumores aumentar la latencia de los mismos y también aumentar la sobrevida. Los estudios anatomopatológicos no demostraron diferencias groseras en los animales que habían recibido EC respecto de aquellos que actuaron como controles del desarrollo tumoral. Pese a que ambos tumores fueron diagnosticados como linfoma centroblastico-centrocítico, el índice mitótico de los controles fue mayor. Tanto el bazo como los ganglios de los animales presentaron proliferación linfomatosa difusa de la serie de transformación linfocítica. Se cultivaron células tumorales de los animales inyectados con EC y de los controles para determinar el efecto de EC "in vitro". En ambos casos se logró una inhibición de la actividad mitótica del 86%.

6.- Efecto sobre un tumor no linfoide murino

Para discernir si el EC actuaba sobre el tumor o sobre el sistema inmunológico, se diseñó un experimento en el cual se utilizó un tumor no linfoide, Sarcoma 180. El tumor se inóculó en animales de la cepa SWISS s.c.; Se usaron grupos de 36 animales cada uno. El EC fue de origen SWISS y el protocolo experimental se describió en 19 v. Los resultados se pueden observar en la Figura 10 y significan que: respecto a la latencia no hay diferencias entre los animales que recibieron EC y aquellos que no lo recibieron ya que en ambos casos los tumores aparecen a las 48 horas; respecto al tamaño, tampoco hay diferencias significativas en ambos grupos, puesto que los tumores se necrosan en ambos y luego son expulsados; la mayoría de los animales presentan bazos grandes y en algunos casos ganglios de importancia; sin embargo los frotis revelaron normocelularidad. A los 2 meses aparecen tumores en todos los animales y se produce la muerte en el 90% de ellos. La

sobrevida en los animales que recibieron EC fue menor que en el grupo control ($p < 0.01$).

V.- Efecto de extractos citoplasmáticos sobre poblaciones linfoides identificadas

1.- Efecto sobre linfocitos murinos estimulados "in vitro"

Se cultivaron los linfocitos purificados con mitógenos específicos para linfocitos T y B e inespecíficos, todos en concentraciones mitogénicas. Se pudo comprobar (Tabla XIII) que el EC inhibe la actividad mitótica inducida por los 4 mitógenos. Al estudiar la cinética de esta inhibición, se vió que el máximo efecto producido por EC, ocurrió al agregarlo el día 0 para PHA, con A y LPS y el día 6 para PWM. Por lo tanto subpoblaciones T y B son afectadas por EC, siendo esta inhibición dependiente del tiempo.

2.- Efecto sobre poblaciones reguladoras: linfocitos supresores

Así como se encontró que las poblaciones linfoides citotóxicas se afectaban por la presencia de EC, se pensó cual sería el efecto sobre alguna población celular con funciones inmunoregulatoras. Es así como se estudió cómo influyen los EC sobre linfocitos T supresores. Como el ensayo de supresión T-T involucra dos etapas bien definidas que se detallan en el esquema inferior, se trató de ver, en el caso de existir algún efecto de parte de EC, si éste ocurría en la etapa I o en la II

I. Linfocitos \longrightarrow Linfocitos supresores

II. Linfocitos frescos + linfocitos supresores + mitógeno \longrightarrow Linfoblasto

Se preincubaron linfocitos murinos con Con A a una dosis tal que se estimularan preferencialmente los linfocitos supresores a las 24 horas de iniciado el cultivo. En esta primera etapa, se realizaron cultivos simultáneos en presencia y en ausencia de EC_{BALB/C} (400 μ g/ml de cultivo). Luego de 24 horas, se lavaron las células y se enfrentaron con células frescas del mismo dador y como mitógeno se utilizó Con A. Nuevamente en

esta etapa se incubaron las mezclas celulares indicadas en presencia o ausencia del mismo EC. Las incubaciones se prolongaron durante 72 horas más. También se consideraron cultivos controles (sin mitógeno). De la Tabla XIV se puede deducir que el EC afecta las subpoblaciones supresoras, siendo el efecto real sobre la etapa I, o sea aquella en la que se produce la estimulación que compromete al linfocito a convertirse o expresarse como linfocito supresor y no en aquella en que se ejerce el efecto supresor sobre las células estimuladas con mitógeno.

T A B L A I

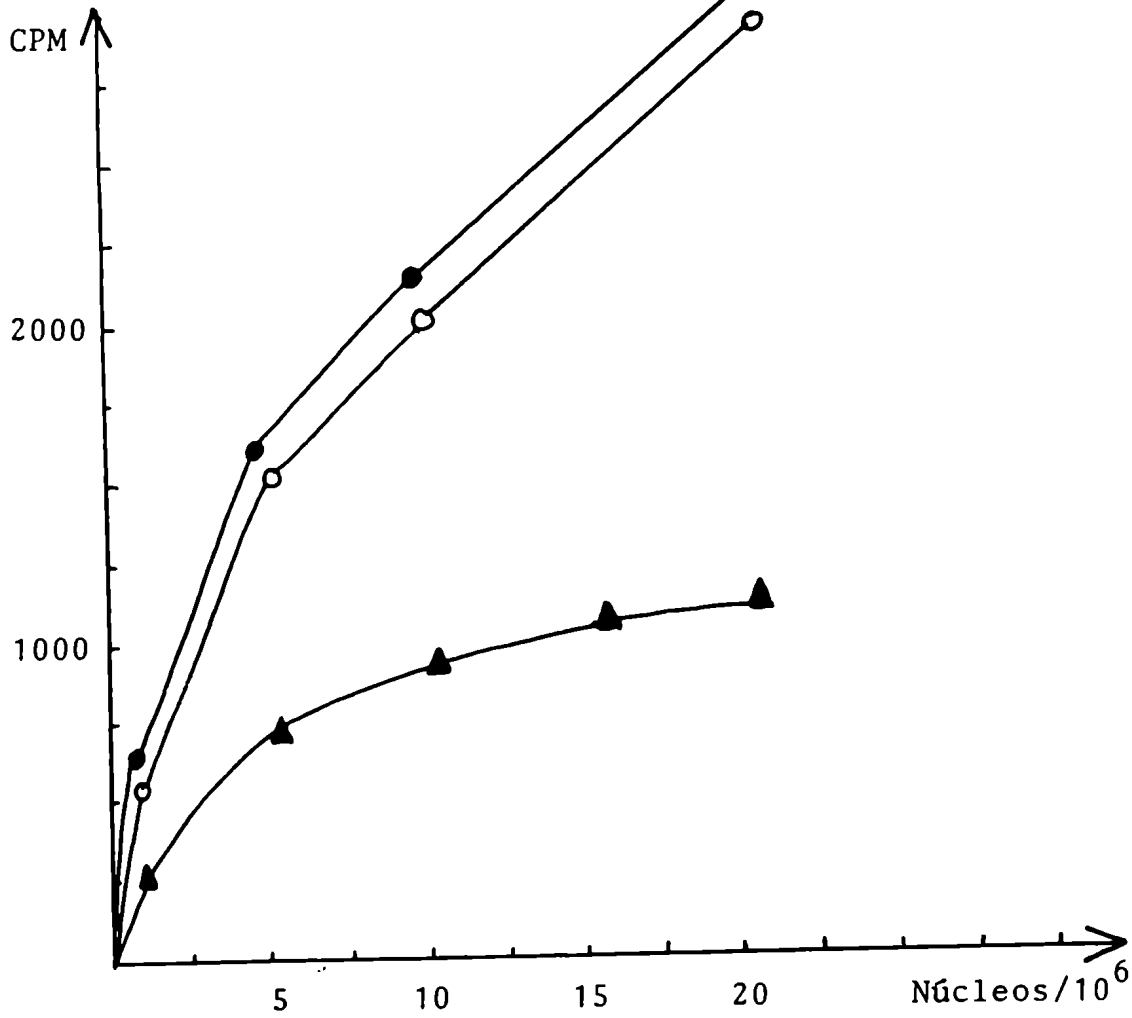
MEDIDA DE LA INCORPORACION DE dT-H³ A CELULAS ENTERAS Y NUCLEOS AISLADOS

ORIGEN		C.P.M.	
CELULA ENTERA	LINFOCITO SIN ESTIMULAR (-PHA)	1615 ±	215
	LINFOCITO ESTIMULADO (+PHA)	31300 ±	2350
	LINEA CELULAR RAJI	43150 ±	2550
NUCLEO AISLADO	LINFOCITO - PHA	22340 ±	1840
	LINFOCITO + PHA	21369 ±	2135
	LINEA CELULAR RAJI	29550 ±	2340

Se separaron los linfocitos como se indicó en Materiales y Métodos y se prepararon núcleos de los tres tipos. Las células enteras (1×10^6 /ml) se incubaron con μCi de dT-H³ de actividad específica 20 Ci/mmol. Los núcleos (1×10^6 /ml) se incubaron con una mezcla conveniente de nucleótidos trifosfatos utilizando 1000 cpm/pmol de TTP-H³ como marcador. Las cpm se determinaron en contador de centelleo líquido, con tolueno-POPOP-PPO como centelleador. Los resultados reflejan la media aritmética de triplicados.

F I G U R A 1

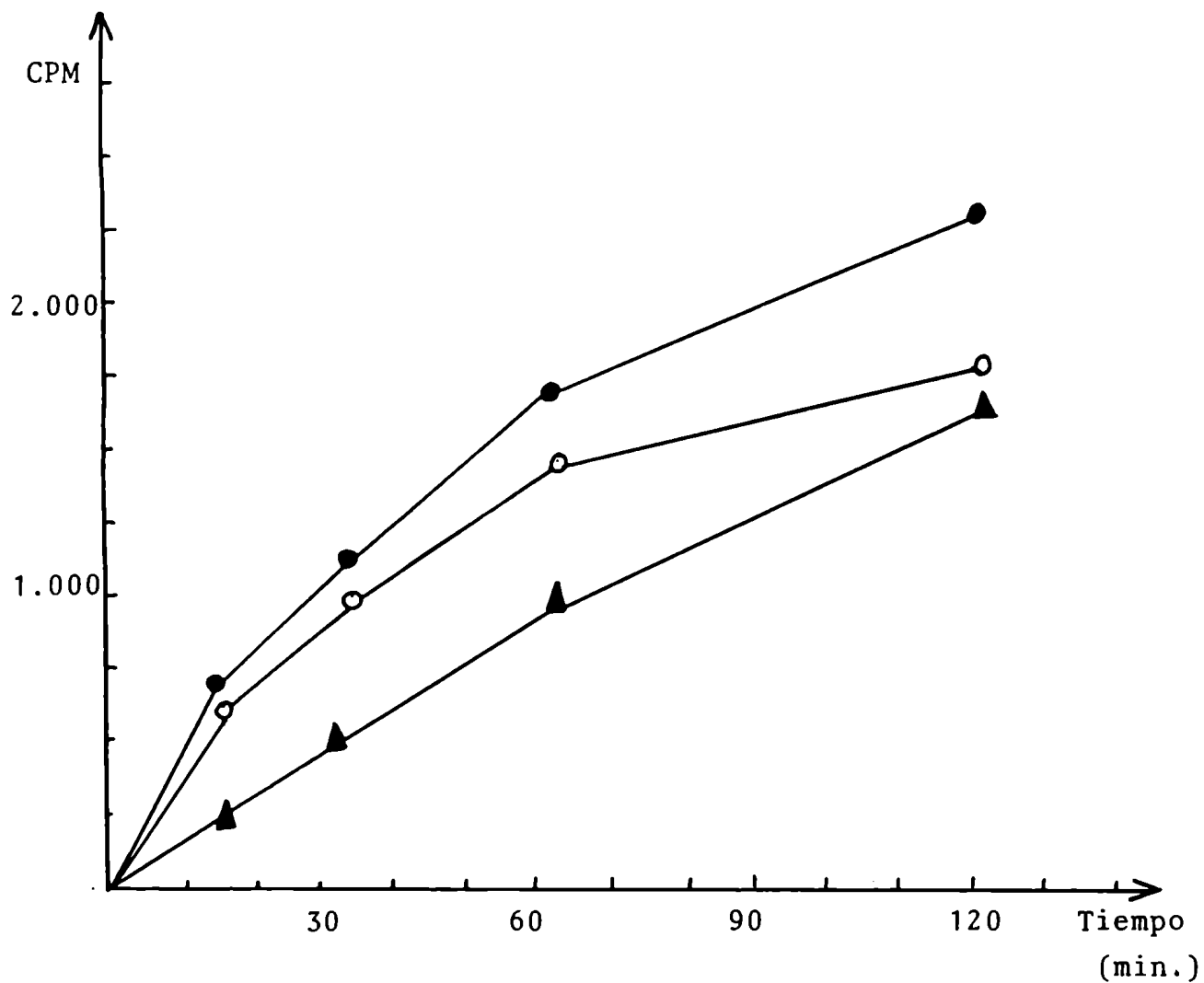
INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE NUCLEOS DE LINFOCITOS EN REPOSO, ES-
TIMULADOS Y DE LA LINEA CELULAR RAJI



- Nucleos - PHA
- Nucleos + PHA
- ▲—▲ Nucleos RAJI

F I G U R A 2

CINETICA DE LA INCORPORACION DE NUCLEOSIDOS A
NUCLEOS AISLADOS DE LINFOCITOS EN REPOSO, ESTI-
MULADOS Y CELULAS DE LA LINEA RAJI



- Núcleos -PHA
- Núcleos + PHA
- ▲—▲ Núcleos RAJI

T A B L A II

CARACTERIZACION ENZIMATICA DEL ADN OBTENIDO DE LINFOCITOS EN REPOSO, LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PHA Y CELULAS RAJI (CELULAS Y NUCLEOS AISLADOS)

ORIGEN DEL ADN	SIN DNasa cpm	CON DNasa cpm	%ADN hidrolizado con DNasa	%actividad con RNasa
LINFOCITO +PHA	8195	500	94	98
CELULA RAJI	9473	413	96	98
NUCLEO + PHA	6662	508	93	95
NUCLEO - PHA	7705	1340	83	81

Se purificaron linfocitos y núcleos aislados. En ambos casos se permitió síntesis de ADN en presencia de un radioisótopo conveniente para reconocer el ADN sintetizado. Luego de esta primera parte, se incubaron 5×10^6 núcleos con 66 μg de DNasa (Sigma) 60 minutos a 37°C . Otra alícuota se incubó con RNasa pancreática 3 horas a 37°C . Se determinó la actividad en todos los casos contando la radioactividad del material precipitable por perclórico en contador de centelleo líquido.

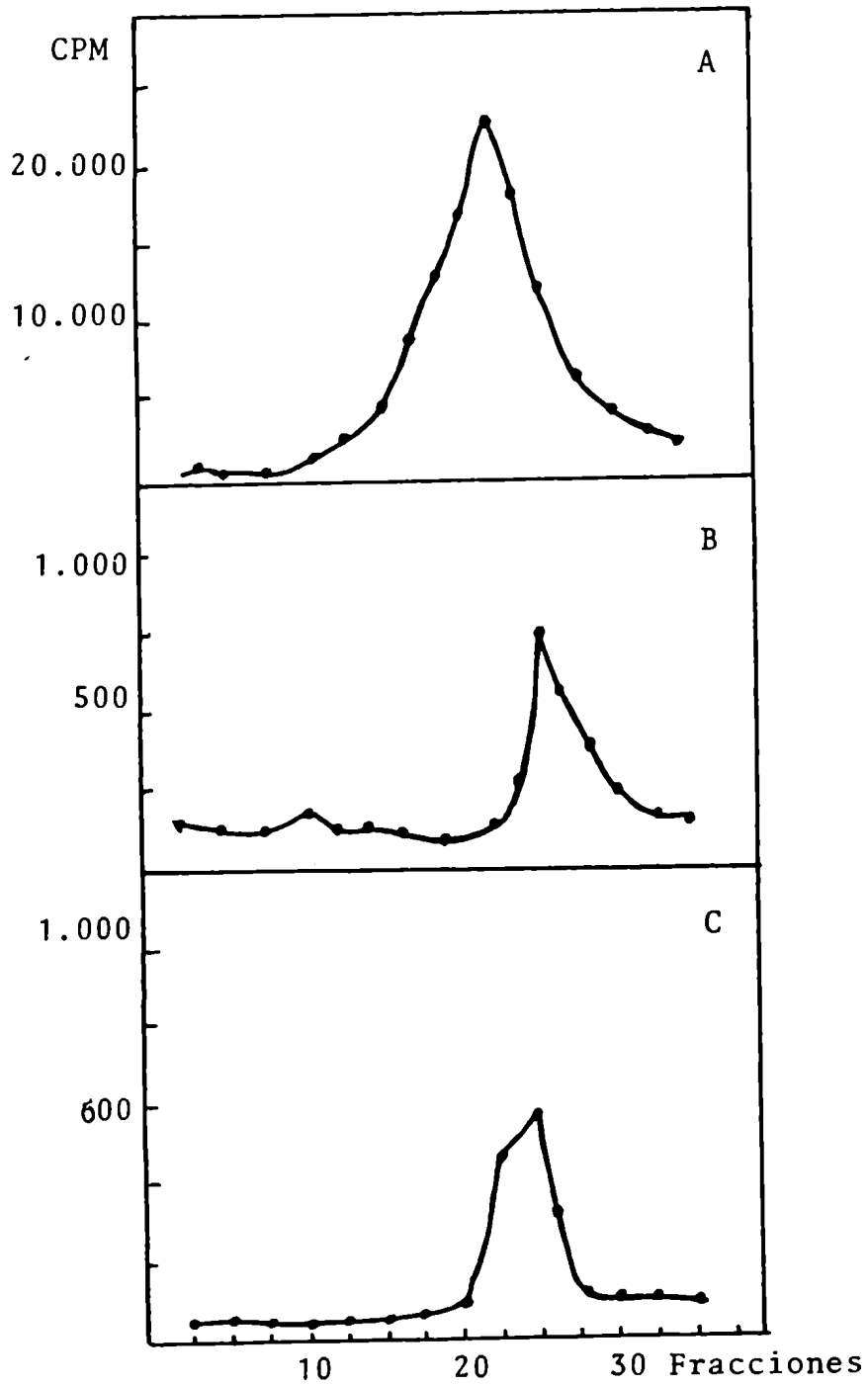
F I G U R A 3

GRADIENTES DE SACAROSA DE ADN OBTENIDO DE:

A. Linfocito + PHA + dT-C¹⁴, 2 horas

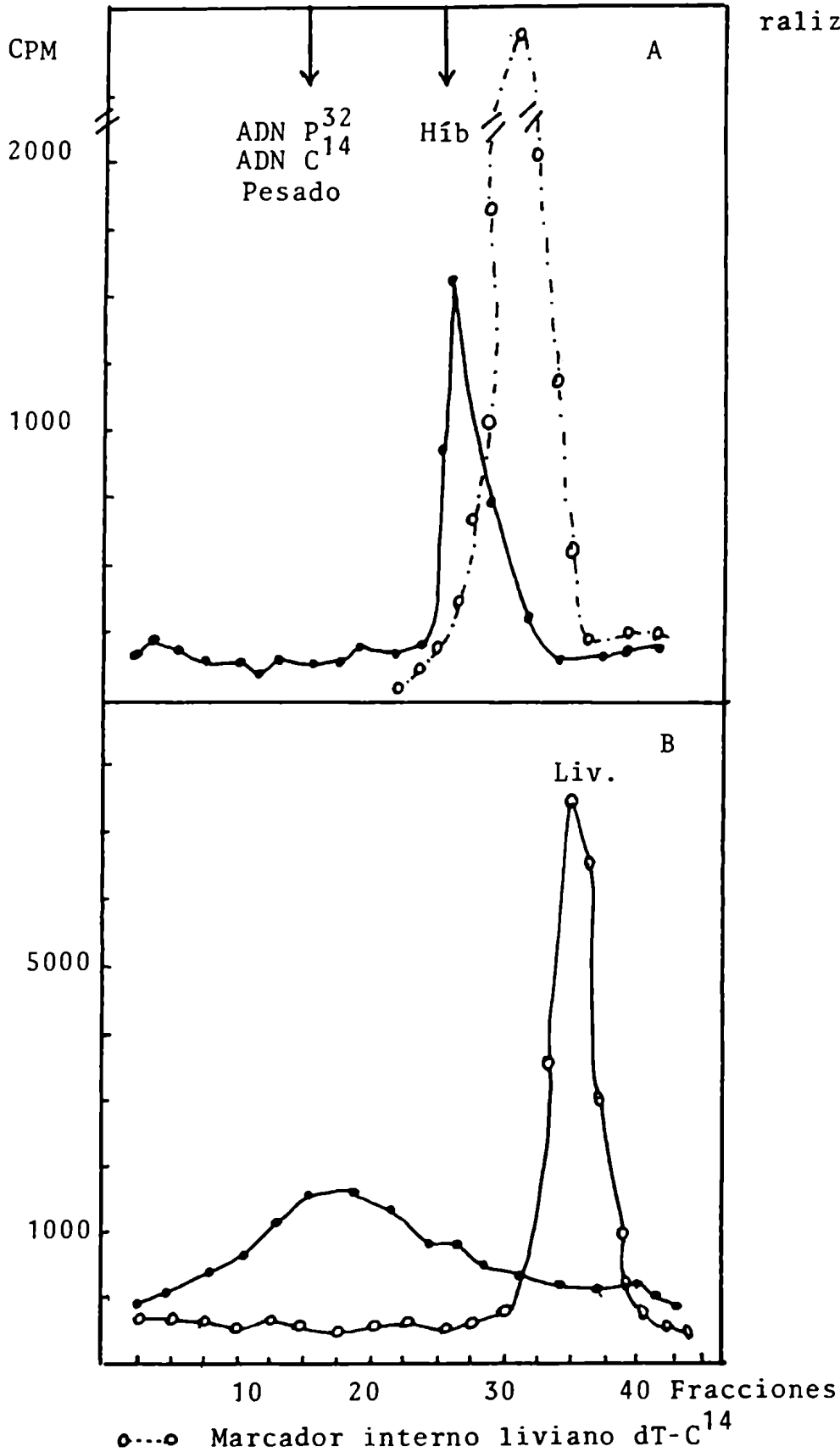
B. Núcleos de linfocitos + PHA, + TTP-H³

C. Núcleos de linfocitos - PHA, + TTP-H³



F I G U R A 4

GRADIENTES DE ClCs: A. Linfocito + PHA + BrdU; Núcleos + TTP-H³ (●—●)
 B. Linfocito + PHA; Núcleos + TTP-H³ (—○—)
 Linfocito + PHA + BrdU; Núcleos + TTP-H³, desnatu-
 ralizado (∅) (●—●)



T A B L A III

EFEECTO DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS DE LINFOCITOS HUMANOS NORMALES EN REPOSO
SOBRE LA ACTIVIDAD MITOTICA DE CELULAS LINFOIDES Y NO LINFOIDES HUMANAS

CELULAS BLANCO	ORIGEN EXTRACTO	% INHIBICION DE INCORPORACION DE TIMIDINA -H ³ /10 ⁶ CELULAS
LINFOCITOS HUMANOS		
ESTIMULADOS (PHA)	LINFOCITOS NORMALES	35.7 ± 7.3
RAJI (B)	" "	40.0 ± 12.1
HR1K (B)	" "	43.8 ± 5.0
CCRF (T)	" "	14.0 ± 6.0
LLA (MED.OSEA)*	" "	96.0 ± 2.2
LLA (S.PERIF.)	" "	95.0 ± 3.1
CULTIVO MIX.UNID.	" "	89.0 ± 5.5
KB	" "	0.0
HEP 2	" "	5.7 ± 1.2
HELA	" "	1.0 ± 0.5

Se determinó el % de inhibición de la actividad mitótica de acuerdo a la siguiente fórmula: $\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\text{cpm X}}{\text{cpm control}} \right) \times 100$

cpm X = cpm obtenido al incubar las células con EC_L

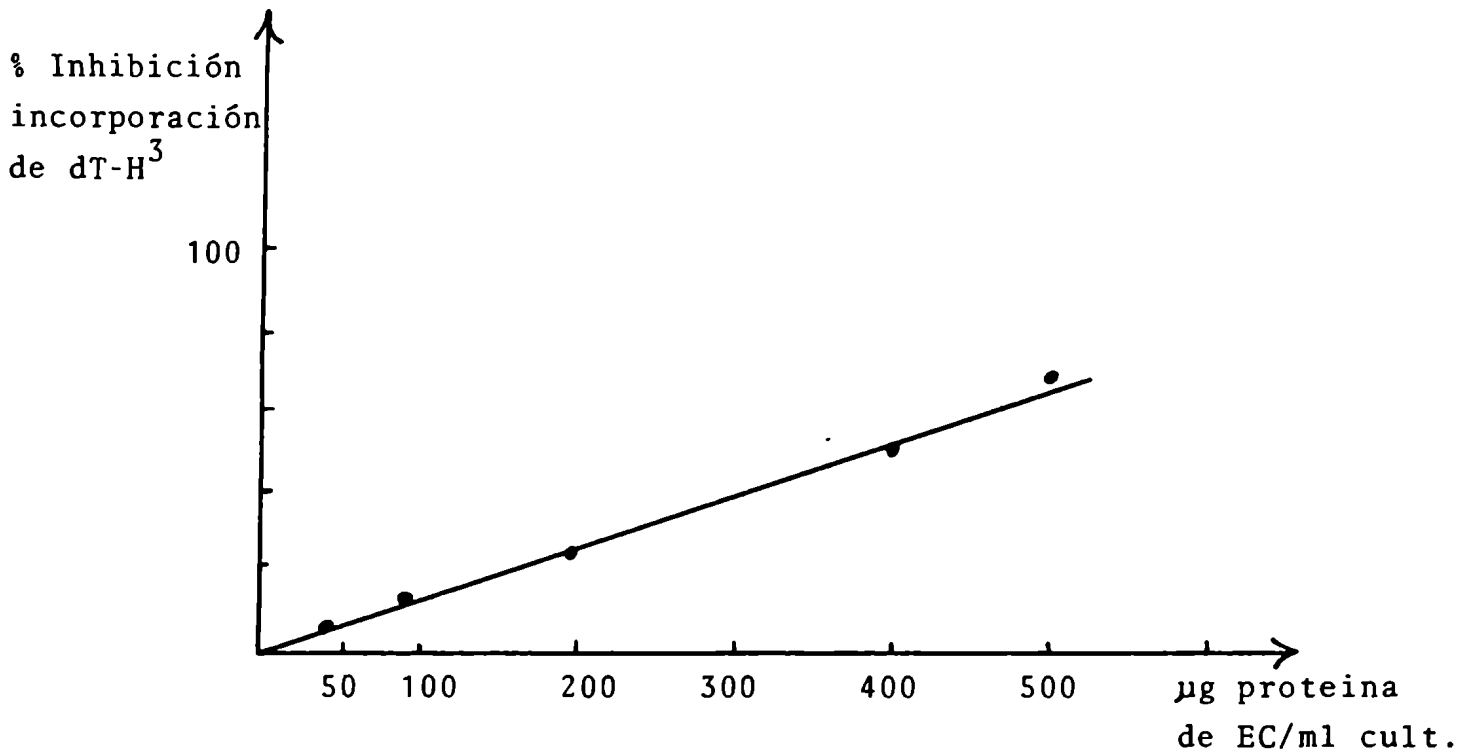
cpm control= cpm de las mismas células sin EC_L

* LLA Leucemia linfoblástica aguda

Los resultados representan valores medios de experimentos en los cuales c/cultivo se hizo por triplicado.

F I G U R A 5

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD MITOTICA POR EXTRACTOS
CITOPLASMATICOS LINFOIDES HUMANOS NORMALES :
RELACION DOSIS - EFECTO



Se determinó la actividad mitótica de células HR1K frente a distintas dosis de EC_L, calculando las diferencias de incorporación de dT-H³ entre células cultivadas en presencia de los extractos y los respectivos controles. Los puntos representan los valores medios de triplicados.

T A B L A IV

CARACTERISTICAS DEL EXTRACTO CITOPLASMATICO HUMANO LINFOIDE NORMAL

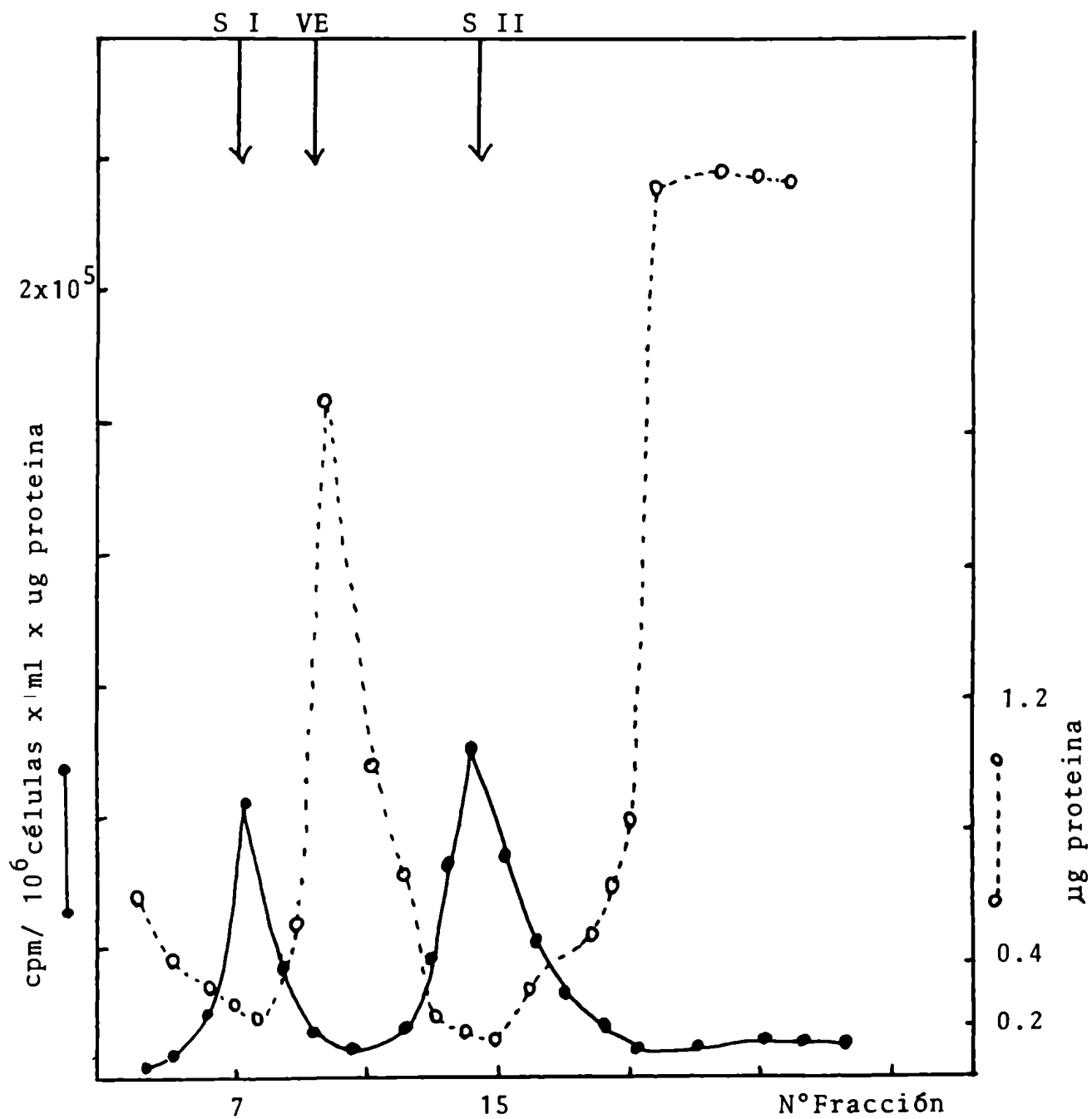
TRATAMIENTO	% INHIBICION DE INCORPORACION dT-H ³	EFECTO
NADA	53.8	-
DNasa	62.0	-
RNasa	81.0	-
CALENTAMIENTO 56°C	64.0	-
DESCONGELAMIENTOS **	30.4	+
TIEMPO CONGELADO ***	38.7	+
PRONASA	30.7	+
TRIPSINA	12.0	+

** Descongelamientos sucesivos

*** 2 meses

F I G U R A 6

FILTRACION DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS DE LINFOCITOS
NORMALES POR SEPHADEX G-25



T A B L A V

REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO PRODUCIDO POR EC_L SOBRE LINEAS CELULARES

INCUBACIONES	VIABILIDAD %	N° CELULAS TOTALES/10 ⁵	CPM	CPM/10 ⁶ CEL
HR1K sin EC, 20 hs	82.3	204.7 ± 4.6	69.600	34.0
HR1K con EC, 20 hs	80.1	119.0 ± 5.3	24.128	20.2
HR1K sin EC, 23 hs	83.4	218.3 ± 8.8	93.133	42.6
HR1K con EC, 23 hs	79.6	126.7 ± 4.4	30.626	24.1
HR1K con EC, 20 hs, lavadas, resusp. medio fresco, 3 hs. más de incubación	78.3	140.0 ± 5.7	39.974	28.5

Se incubaron células HR1K (1 x10⁶) en presencia de EC_L durante 20 y 23 hs. Simultáneamente se incubaron células sin EC_L. Un tercer grupo de células a igual concentración se incubó 20 hs con EC_L, se lavó y luego se incubó 3 horas mas en ausencia de EC_L. A las 23 hs. se agregó 1 μ ci de dT-H3 y se finalizaron los cultivos 2 hs. después.

T A B L A VI

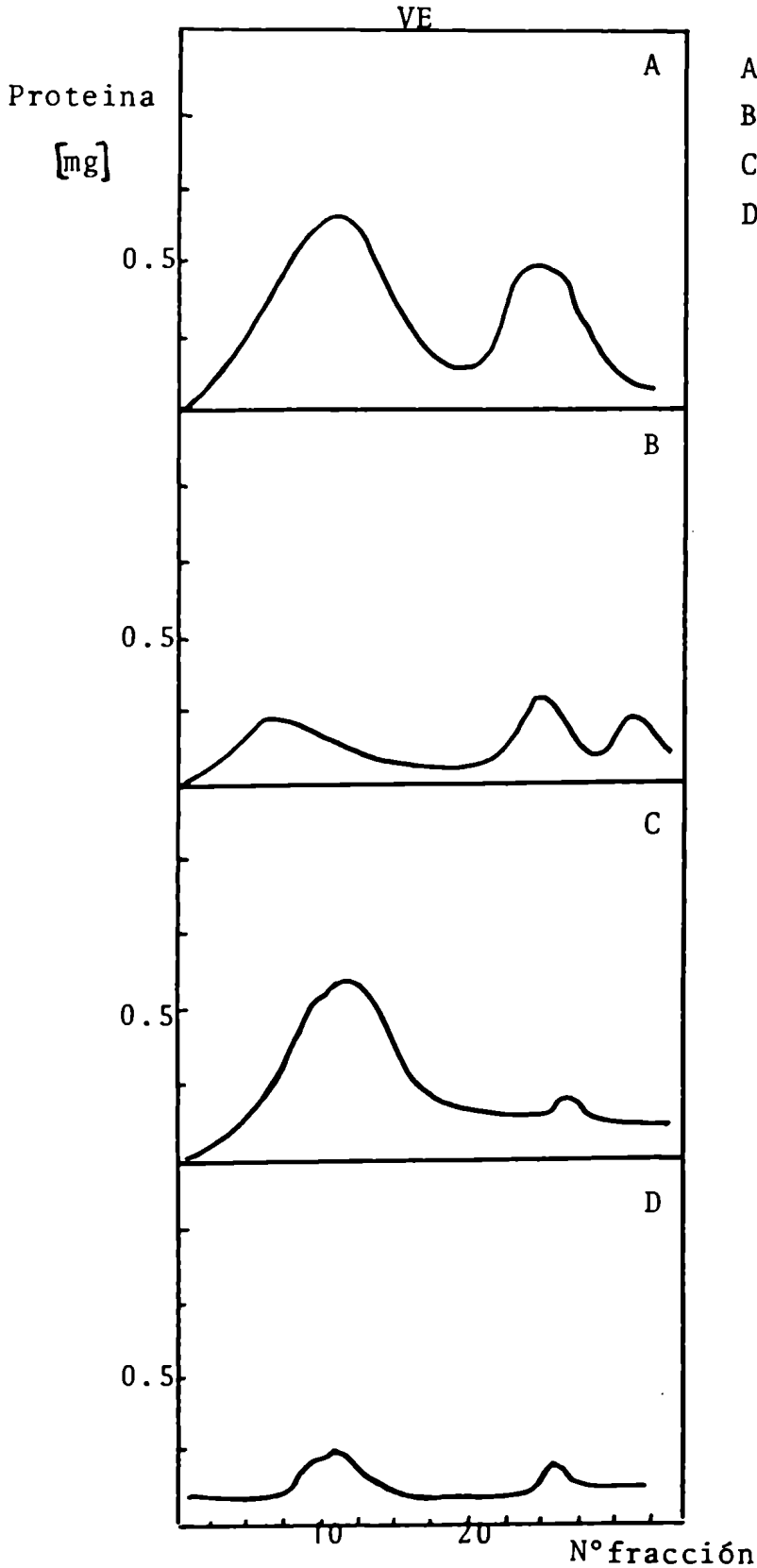
EFEECTO PRODUCIDO POR EXTRACTOS CITOPLASMATICOS DE DISTINTOS ORIGENES SOBRE UNA LINEA CELULAR LINFOBLASTOIDE HUMANA (HR1K)

ORIGEN EXTRACTOS	% INHIBICION PRODUCIDA		P (<)
LLA (T)	69.6	+ 2.3	0.001
LLA (T y B)	73.0	+ 4.6	0.0005
LLA (Nula)	39.0	+ 2.6	NS
LLC (B)	25.5	+ 1.7	0.001
LINFOCITOS NORMALES	43.8	+ 3.8	—
CELULAS TIMICAS	23.0	+ 3.0	0.001
CELULAS B (AMIGDALAS)	0.0		0.0005
LINFOCITOS NORMALES ESTIMULADOS (PHA)	23.0	+ 2.5	0.001
CELULAS HR1K (B)	18.0	+ 2.4	0.001
CELULAS BURKITT LIKE	35.0	+ 2.7	0.01
CELULAS CCRF (T)	89.2	+ 3.7	0.0005
LINFOMAS NO HODGKIN	16.3	+ 2.8	0.001
LINFOMAS HODGKIN	25.4	+ 2.9	0.001
CELULAS RAJI (B)	16.3	+ 2.11	0.0005

Se obtuvieron las distintas células como se indica en Materiales y Métodos y luego se prepararon los extractos citoplasmáticos respectivos. Se ensayó la inhibición que producían sobre la división celular de células HR1K usándose como parámetro incorporación de dT-H3. Los resultados son medias de 3 experimentos en los cuales c/cultivo se realizó por triplicado.

F I G U R A 7

FILTRACION DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS DE :
LEUCEMIAS AGUDAS Y CRONICAS, LINFOMAS Y CELULAS TIMICAS
POR SEPHADEX G-25



A= Linfocitos normales
B= Leucemia linf.aguda
C= Células tímicas
D= Leucemia crónica y Lin-
fomas

T A B L A VII

EFFECTO DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS LINFOIDES MURINOS NORMALES SOBRE CELULAS MURINAS DE DISTINTOS ORIGENES

CELULAS ENSAYADAS	% INHIBICION RECUESTO CEL.	PRODUCIDA INCORP. dT-H ³
LINFOCITOS BALB/ _c ESTIMULADOS (PHA)	42.4 ± 2.4	44.6 ± 4.4
LINFOCITOS AKR ESTIMULADOS (PHA)	23.4 ± 3.3	29.9 ± 3.3
CELULAS HR1K	56.9 ± 7.3	66.8 ± 6.1
CELULAS RAJI	47.0 ± 6.4	44.6 ± 5.4
TUMOR MURINO LINFOIDE (L 15)	58.0 ± 4.7	68.0 ± 5.5
CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS (Ratón)	0.0	0.0
NEUROBLASTOMA (Ratón)	0.0	0.0
V 79 (Embrión total de hamster)	5.7 ± 2.0	12.3 ± 2.3
Hep 2 (Carcinoma epidermoide humano)	5.0 ± 2.2	5.1 ± 1.3
LINFOCITOS HUMANOS ESTIMULADOS (PHA)	48.0 ± 3.4	46.4 ± 3.5

Los resultados reflejan la media de 3 experimentos distintos en los cuales cada punto fue hecho por triplicado. El % de inhibición ya sea por recuentos celulares o por incorporación de dT-H³ se calcula respecto a las células control en cada caso, ó sea células incubadas en ausencia de extracto citoplasmático a la misma temperatura y durante el mismo tiempo. El extracto utilizado fue obtenido de linfocitos de bazo de ratones de la cepa BALB/_c .

T A B L A VIII

EFEECTO DE E.C. SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL ALOGENEICO

GRUPO	TRATAMIENTO	CRECIMIENTO TUMORAL <u>POSITIVO</u> TOTAL	%	p [*]
1	NINGUNO	11/36	30	-
2	LINFOCITOS ENTEROS	7/24	39	NS
3	EC _{BALB/c}	21/36	58	<0.012

* Calculado por χ^2

Se inocularon ratones de la cepa BALB/c con EC_{BALB/c} (400 μ g) "in situ" con un tumor alogeneico AKR (L15) en cilindro de vidrio. Se determinó la incidencia tumoral 30 días después de la inoculación.

T A B L A IX

EFFECTO DE EC SOBRE LA INDUCCION DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS

INMUNIZACION PRIMARIA	INMUNIZACION SECUNDARIA	CMC (ESPECIFICA %)	INHIBICION (%)
BUFFER FOSFATO	BUFFER FOSFATO	25.35 ± 5.25	-
EC _{BALB/c}	EC _{BALB/c}	12.75 ± 4.45	45.4
EC _{BALB/c} CONGEL	EC _{BALB/c} CONGEL.	12.95 ± 5.55	44.5

Se marcaron células L15 con $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ y se enfrentaron "in vivo" durante 3 hs. a 37° C en una relación 1:100 con linfocitos preinmunizados a L15, como se indica en Materiales y Métodos en presencia o no de EC_{BALB/c}. Para calcular la citotoxicidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{cpm totales} - \text{N}^\circ \text{cpm espontáneo}}{\text{N}^\circ \text{cpm experim} - \text{N}^\circ \text{cpm control}} \times 100$$

Los resultados representan valores medios de cuatuplicados.

T A B L A X

EFFECTO DE EC SOBRE LA EXPRESION DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS

CELULAS	CPM	CITOTOXICIDAD ESPECIFICA (%)	INHIBICION (%)
INMUNES resuspendidas en buffer fosfato	1490 ± 55	28.8	0
INMUNES resuspendidas en E.C.	1499 ± 67	29.1	
NORMALES resuspendidas en buffer	644 ± 49	0	0
NORMALES resuspendidas en E.C.	650 ± 27	0	

Se comparó la CMC de células inmunes a L15 resuspendidas en medio con EC_{BALB/c} ó en su ausencia. Lo mismo se realizó en linfocitos normales no inmunizados. Los resultados expresan la media aritmética de cuatriplicado.

T A B L A X I

EFFECTO DE E.C. SOBRE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA Y RESPUESTA HUMORAL

GRUPOS	n	24 hs	p ($<$)	48 hs	p ($<$)	Títulos hemaglutinantes
EXPERIMENTO 1						
Control	10	3.6 \pm 1.4		2.4 \pm 1.2		1/512
+ E.C.	10	2.1 \pm 1.2	0.025	1.4 \pm 0.8	0.025	1/128
EXPERIMENTO 2						
Control	18	3.4 \pm 1.6		1.9 \pm 0.6		1/128
+ E.C.	18	1.8 \pm 1.5	0.0025	1.0 \pm 0.6	0.0025	1/32

Se inyectaron 1×10^8 glóbulos rojos de carnero (SRBC) en la pata derecha de animales BALB/c. Según los casos se inoculó simultáneamente EC_{BALB/C} (400 μ g/ratón) o buffer fosfato como control. Se desencadenó la reacción en forma similar en la pata izquierda 6 días después y se leyeron los diámetros de las patas de cada animal con calibre y se determinaron los anticuerpos hacia SRBC por hemaglutinación directa. Los resultados son las medias de grupos de ocho animales.

T A B L A XII

EFFECTO DE EC SOBRE REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED

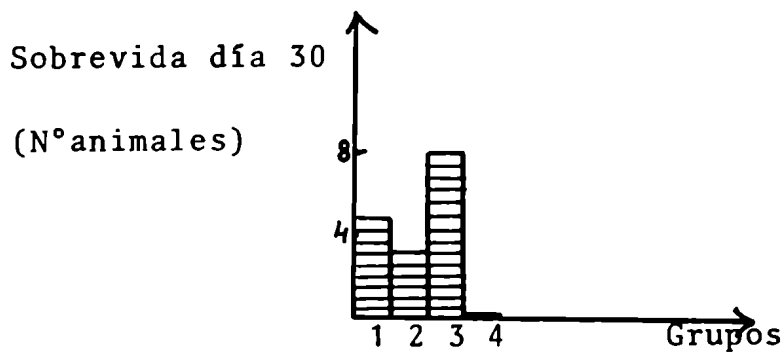
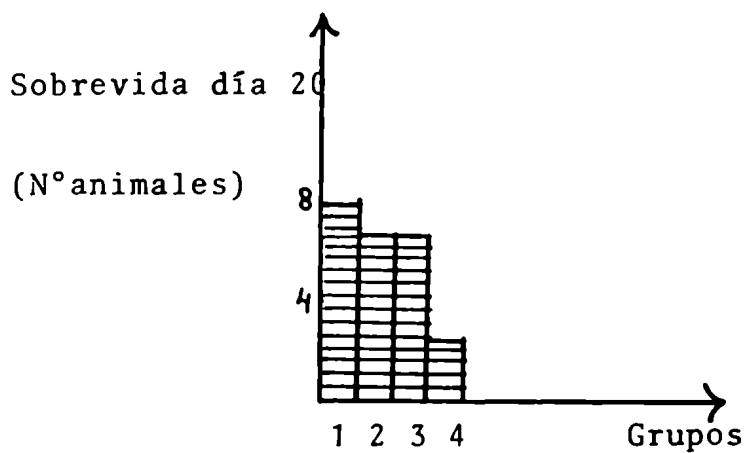
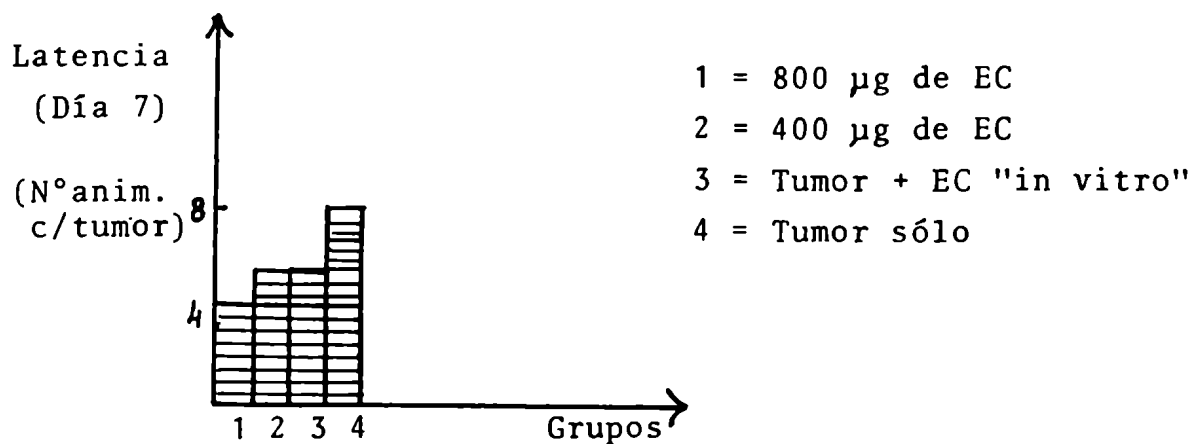
GRUPOS	PESO ANIMAL (g)	PESO BAZO (g)	INDICE ESPLENICO **
Ratones SWISS			
recién nacidos			
inyectados con:			
Células BALB/c pre-			
inmunes + EC i.p.	9.0	0.0378	1.373
	8.0	0.0276	
	8.2	0.0330	
	8.6	0.0617	
	8.5	0.0550	
Células BALB/c pre-			
inmunes + Buffer	7.7	0.0399	1.872
	7.3	0.0401	
	7.9	0.0596	
	7.2	0.0540	
	7.8	0.0510	
Células BALB/c nor-			
males + EC i.p.	8.6	0.0516	2.126
	8.8	0.0646	
	8.0	0.0620	
	8.8	0.0712	
	8.3	0.0686	
Células BALB/c nor-			
males + MEM*	7.8	0.0327	1.274
	7.5	0.0340	
	7.9	0.0174	
	7.8	0.0483	
	7.1	0.0337	

*MEM= Minimum essential medium

** I.E. $\left(\frac{x \text{ (g) bazos}}{x \text{ (g) animal}} \right)_{\text{exp}} \left(\frac{x \text{ (g) bazos}}{x \text{ (g) animal}} \right)_{\text{control}}$

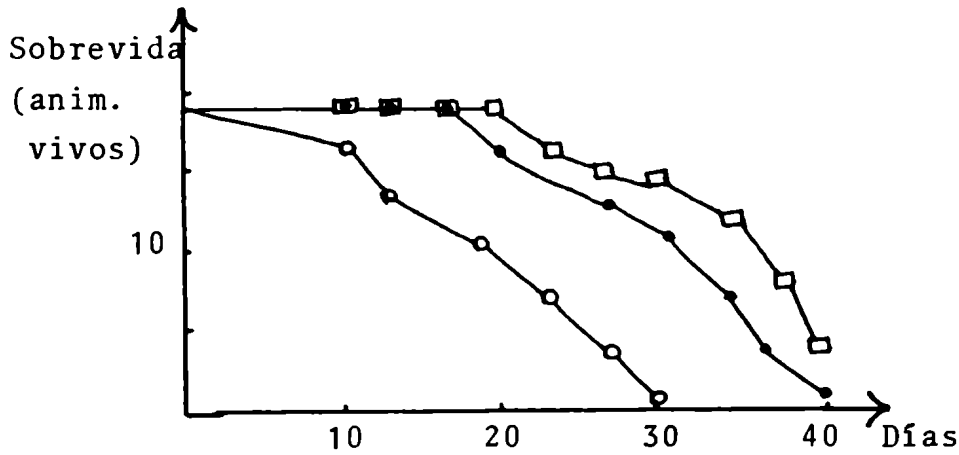
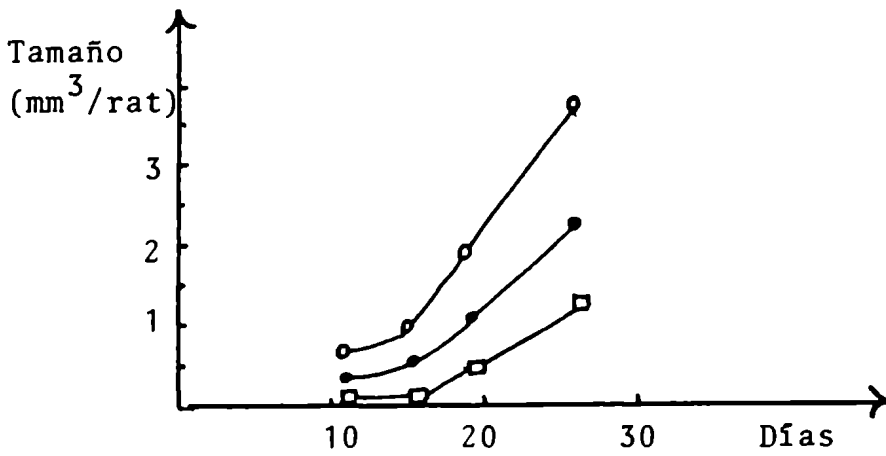
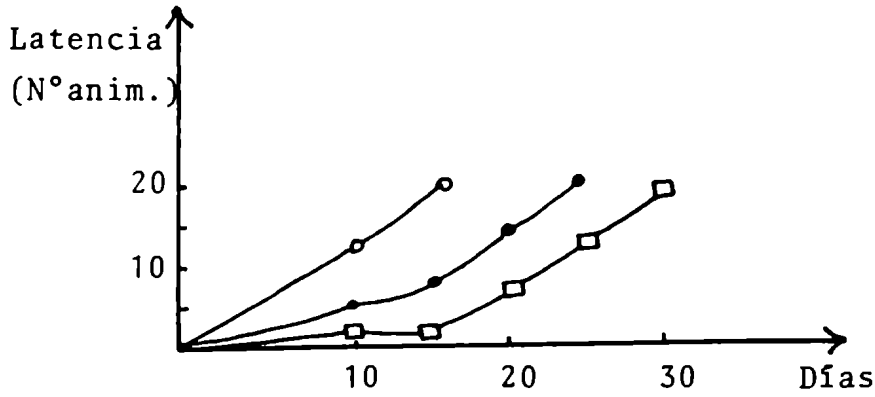
F I G U R A 8

EFEECTO DE EC SOBRE UN TUMOR LINFOIDE MURINO (L15)



F I G U R A 9

EFFECTO DE EC SOBRE UN TUMOR LINFOIDE MURINO:
LATENCIA, TAMAÑO Y SOBREVIDA

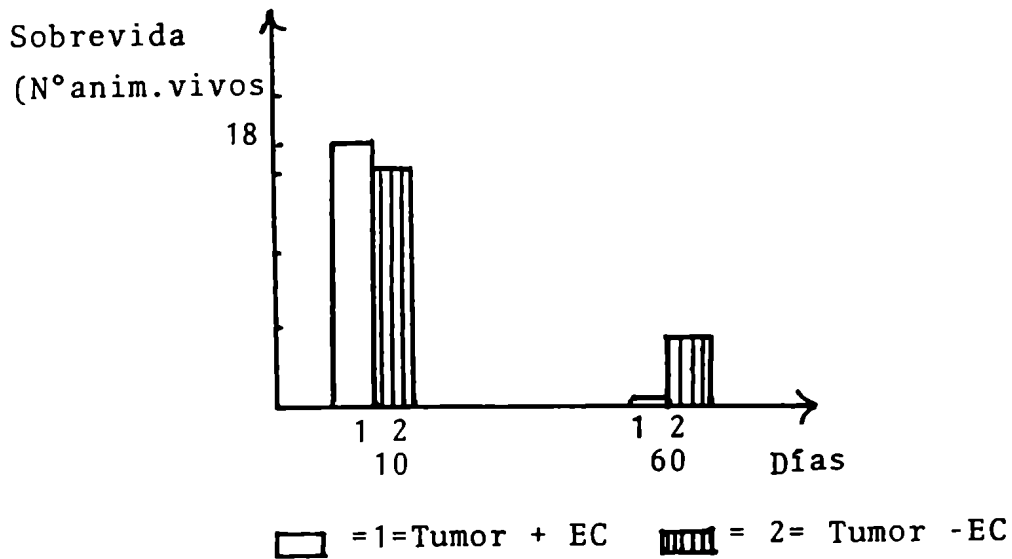
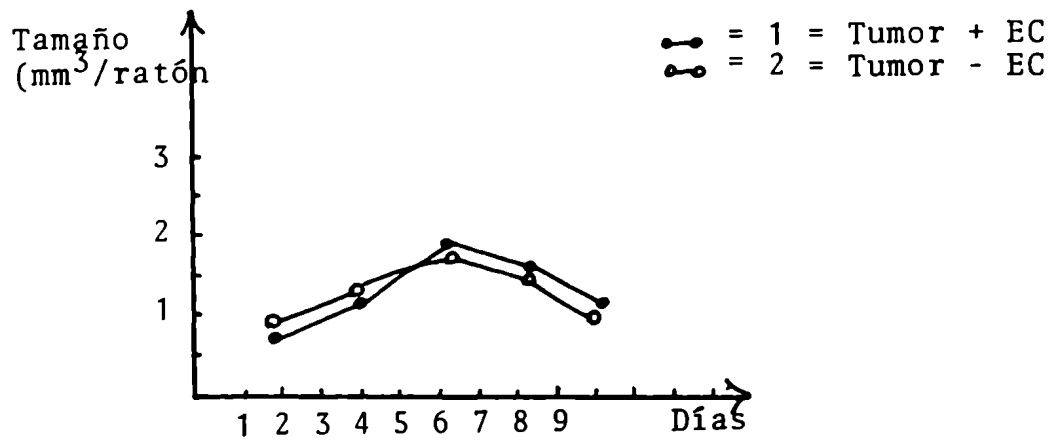
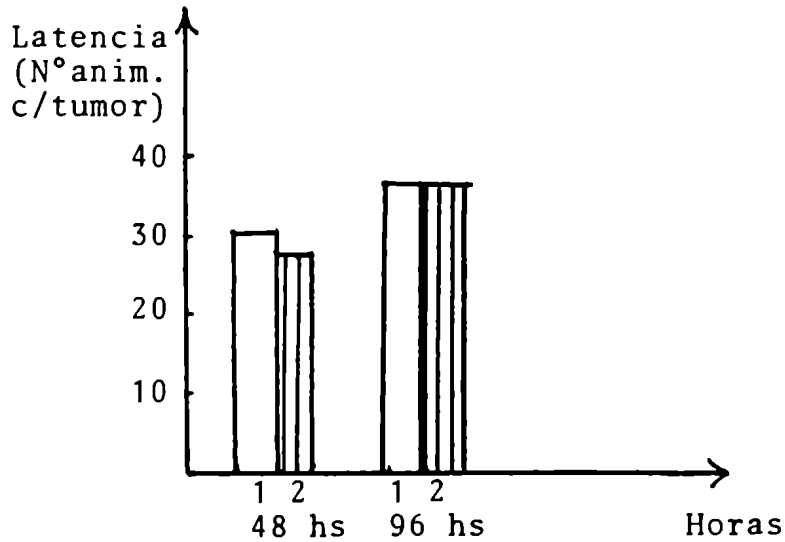


—○— = Control; —●— = Tumor + EC; —□— = Tumor preinc.c/EC

F I G U R A 10

EFFECTO DE EC SOBRE TUMORES NO LINFOIDES MURINOS

(SARCOMA 180)



T A B L A XIII

CINETICA DEL EFECTO DE EC SOBRE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON DIVERSOS MITOGENOS

MITOGENO	AÑADIDO EL DIA	INHIBICION (%)
CON A	0	50
	1	43
	2	31
PHA	0	46
	1	35
	2	27
LPS	0	60
	1	41
	2	36
PWM	0	33
	6	94

Los cultivos con ConA, PHA y LPS se sacrificaron a las 72 hs. mientras que los de PWM a los 7 días. Los resultados fueron obtenidos a partir de medias aritméticas de sextuplicados.

T A B L A X I V

EFFECTO DE EC SOBRE LA SUPRESION EN LA RESPUESTA BLASTOMITOGENICA

CULTIVOS	% SUPRESION
----------	-------------

LINFOCITOS + LINFOCITOS SUPR.PREINC.CON EC + CON A	3
--	---

LINFOCITOS + LINFOCITOS SUPR.PREINC.SIN EC + CON A	24
--	----

LINFOCITOS + LINFOCITOS SUPRESORES + CON A	24
--	----

LINFOCITOS + LINFOCITOS SUPRESORES + CON A + EC	22
---	----

Los cálculos del % de supresión se realizaron en base a las medias aritméticas de sextuplicados de cpm de cada punto considerado. Los mismos se hicieron de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos.

DISCUSION

Los linfocitos humanos de sangre periférica, se encuentran en el estado de reposo previo al período de síntesis de ADN. Por lo tanto para que exista división celular, debe ocurrir esa síntesis que resultará en la replicación del material genético. La replicación se correlaciona temporalmente con el aumento de la incorporación de nucleósidos como la timidina y de la actividad de las distintas polimerasas durante el proceso de transformación blástica (31). Es así como los linfocitos purificados que se cultivaron en ausencia de antígenos específicos ó mitógenos inespecíficos, presentaron baja actividad sintética en comparación con los mismos linfocitos pero estimulados y con células transformadas en proliferación activa y descontrolada.

Sin embargo, estas diferencias tan claras no se reprodujeron cuando se permitió que los núcleos aislados de los 3 sistemas mencionados, sintetizaran ADN. Se observó, que incubando los núcleos de linfocitos en reposo, de linfocitos estimulados con PHA y de una línea celular linfoblastoide (RAJI), en presencia de la mezcla adecuada de nucleótidos trifosfato, la incorporación de éstos últimos era idéntica en todos ellos. Esta observación no implica directamente una identidad en el proceso de síntesis, porque si bien la cantidad de nucleótido trifosfato incorporado resultó ser igual, podrían existir diferencias en cuanto al producto final sintetizado. Las posibilidades a considerar serían las siguientes: 1) que el producto sintetizado no sea ADN en todos o algunos de los casos; 2) que el producto final sea ADN pero de distinto peso molecular; 3) discernir si lo que ha ocurrido durante la síntesis nuclear ha sido un proceso reparativo o replicativo y 4) en el caso de ser replicativo, dilucidar si los puntos de replicación "in vitro" son una continuación de los existentes "in vivo".

Al analizar el producto final tanto de la síntesis de células enteras como de núcleos aislados, se observó que ambos ADN eran sensibles a la DNasa y no a la RNasa. En base a la susceptibilidad se podría concluir

que la síntesis "in vitro" originaba ADN. Sin embargo esto no fue suficiente para contestar los demás interrogantes planteados. El problema del tamaño de ADN sintetizado se resolvió con gradientes de sacarosa y patrones de ADN convenientes. Es así como se comprobó que la célula linfocítica normal estimulada con PHA sintetiza un ADN de mayor peso molecular que los núcleos aislados (tanto de linfocitos estimulados como de linfocitos sin estimular). Resultó importante observar que ambos núcleos, aquellos aislados de linfocitos estimulados y de linfocitos sin estimular, sintetizaron un ADN de idéntico peso molecular. Souleil (145) propuso que el hecho de encontrar ADN de peso molecular menor, podría deberse a la presencia de lípidos asociados al ADN o reflejaría moléculas sintetizadas de distinto tamaño. Gottlieb (146), demostró que tanto la estimulación por PHA como la estimulación antígenica, resultaba en una distribución de ADN en la cual la zona liviana se debía a la presencia de lípidos asociados a la membrana. También ha sido demostrada la presencia de ARN asociada a cadenas nascentes de ADN (147,148).

Debe puntualizarse además que la medida de síntesis de ADN por incorporación de timidina a un material precipitable por ácido, no refleja un proceso simple. Un número discreto de pasos y conversiones bioquímicas preceden la inserción del nucleótido marcado radioisotópicamente, al ADN: 1) el nucleósido es transportado del medio extracelular a través de la membrana; 2) se asocia con el pool de nucleósidos intracelulares que pueden encontrarse en compartimentos específicos y localizaciones subcelulares, existiendo así la posibilidad de un intercambio activo entre nucleósidos transportados y los internos; 3) ocurre conversión de nucleósido a nucleótido monofosfato, difosfato y trifosfato; 4) el nucleótido trifosfato debe atravesar la membrana nuclear e integrar el pool de nucleótidos trifosfato; 5) finalmente el nucleótido marcado debe interaccionar con el ADN templado y ADN polimerasa específicamente para incorporarse al ADN que está sintetizando.

Otros autores (149,150) han intentado síntesis de ADN "in vitro", con núcleos aislados, obteniendo resultados similares a los demostrados aquí. Incluso se ha descrito en sistemas más sofisticados, trabajando con células permeabilizadas (151,152) ó con núcleos aislados sin cronizados (153), que existe un único mecanismo que regula la síntesis de ADN en los mamíferos y que esa síntesis es replicativa, discontinua y semiconservativa. Berger (151) y colaboradores, demostraron que los nucleótidos trifosfato exógenos se incorporan directamente al ADN y no sufren hidrólisis para refosforilarse previamente a su incorporación.

El hecho que los núcleos de linfocitos en reposo, una vez aislados, sean capaces de sintetizar ADN, habla a favor de una regulación extranuclear. Las evidencias de Rapaport (153) indican que la iniciación de la replicación estaría regulada por factores citoplasmáticos y que la elongación de replicones previamente iniciados estaría controlada por la relación ATP/ADP del compartimento nuclear. Las ATPasas nucleares dependientes del ADN, jugarían un papel importante en este control dado que al aumentar los niveles de actividad de estas enzimas, la relación ATP/ADP disminuye, siendo favorable esta situación para la replicación del ADN.

Los experimentos diseñados con el fin de discernir entre síntesis replicativa o reparativa, demostraron que los núcleos aislados replicaban el material genético igual que la célula entera. Esto no excluye la posibilidad que ocurra además reparación post-transcripcional en forma mínima. Utilizando antimetabólicos que específicamente inhiben la replicación o la reparación, se observó que efectivamente el proceso de síntesis fundamental que ocurría en el compartimento nuclear era la replicación del ADN (152). La última palabra sobre estos aspectos está en poder de las ADN polimerasas; si fuera posible purificando las polimerasas nucleares que ya han sido identificadas (144), realizar ensayos "in vitro" para comparar la síntesis obtenida en presencia de un u otra enzima, se podría concluir definitivamente sobre esta cuestión.

Finalmente se ha podido demostrar que los puntos de replicación "in vitro" son una mera continuación de los preexistentes "in vivo". Si esto no fuera así, al incubar los linfocitos en presencia de BrdU y PHA, y luego aislar los núcleos provocando síntesis "in vitro" en presencia de TTP-H³, en lugar de encontrar como se obtuvo un pico híbrido neto con el 90% de la marca radioisotópica, se hubieran detectado picos livianos producto de la aparición de nuevos sitios de iniciación de la replicación en el estado de núcleo aislado. Rapaport demostró que incubando los núcleos aislados en presencia de BrUTP en lugar de TTP, lavándolos luego de 1 hora y realizando a continuación una nueva incubación en presencia de TTP-H³, se encontraba un ADN híbrido (cadenas pesada-liviana) y no ADN liviano (liviano-liviano).

Una vez demostrado que los núcleos de linfocitos en reposo replicaban su material genético igual que los núcleos de linfocitos estimulados o la célula entera en presencia de un mitógeno inespecífico, se intentó el estudio de la regulación de este proceso asumiendo que el mismo está gobernado por factores extranucleares, en especial factores citoplasmáticos. Si bien se han descripto factores de esta naturaleza en numerosos tejidos (96-124), aún es poco conocida la forma en que ejercen su actividad regulatoria sobre la división celular. Aún más, no son muchos los datos que ofrece la literatura sobre el efecto de estos factores "in vivo".

Además como ya se mencionó, el sistema linfoide ofrece la posibilidad de estudiar el fenómeno de la división celular en tres estados fundamentales; reposo mitótico, mitosis controlada y mitosis descontrolada. Por otra parte se puede analogar estudios "in vitro" a procesos reales "in vivo" estudiando por un lado la regulación del sistema inmunológico en el cual el linfocito es célula fundamental, y por el otro el desarrollo y la evolución de neoplasias de origen linfoide.

Es así como se observó que los extractos citoplasmáticos de linfocitos humanos normales obtenidos de sangre periférica, ejercieron una

actividad antimitótica sobre cualquier tejido linfoide ensayado, aún cruzando la barrera de la especie. Los altos valores de viabilidad encontrados descartaron toda posibilidad de acción citotóxica de parte de los extractos. El efecto antimitótico respetó la especificidad de tejido. Resultados idénticos se obtuvieron al utilizar extractos citoplasmáticos linfoides murinos sobre líneas celulares linfoblastoides humanas. Al demostrarse que el efecto antimitótico que se había producido podía ser revertido parcialmente con el tiempo, los extractos citoplasmáticos estarían involucrados en la definición conceptual de "chalonas" (96).

Se ha determinado el peso molecular de varias de las chalonas descritas en la literatura (122,124). los datos son muy variados dado que los grados de pureza de las distintas preparaciones distan de ser uniformes. Por ello los valores hallados oscilan entre 2000 y 50.000 daltons (119). Actualmente las formas más purificadas de chalonas revelaron pesos moleculares cerca de los 2.000 daltons. Como se demostró por cromatografía en columna, las chalonas linfoides en este trabajo se encontraron agrupadas en dos picos netos, uno mayor de 25.000 y otro menor, coincidiendo la mayor actividad anti-mitótica con este último. Al comparar las chalonas linfoides normales con patrones de peso molecular conocido y suero humano normal, se obtuvieron bandas electroforéticas que correspondieron a pesos moleculares entre 15.000 y 62.000 daltons. Se ha sugerido que las diferencias en los pesos moleculares está asociada al grado de purificación pues existirían uniones no covalentes inespecíficas entre las chalonas y proteínas y glicoproteínas, inactivas desde el punto de vista antimitótico. Houck y colaboradores (154) demostraron que la chalona linfoide y la fibroblástica se encontraban fuertemente complejadas con moléculas de ARN de bajo peso molecular. Observaron que al tratar chalonas impuras con ribonucleasa, el peso molecular de las mismas descendía de 36.000 a 10.000 ó aún menos sin variación en la actividad antimitótica. Además para que pueda existir una unión tan fuerte entre chalona y ARN, siendo ésta última un polielectrolito

aniónico, la chalona debería ser un polipéptido catiónico.

Respecto a la composición y a sus propiedades químicas, se observó que el tratamiento de chalonas linfoides humanas con DNasa y RNasa no modificó las características antimitóticas. Tampoco fueron alteradas por el calentamiento a 56° C. Sin embargo el descongelamiento sucesivo y una permanencia en estado congelado (-20° C) mayor que 2 meses, disminuyó significativamente las propiedades anti-mitóticas. También el tratamiento con enzimas proteolíticas disminuyó la actividad anti-mitótica. Los datos obtenidos coinciden con los de la literatura (119,154). Además de las características proteicas mencionadas se ha informado la presencia de hidratos de carbono como la manosa, unida covalentemente a la chalona linfoide y a la fibroblástica. Se asume actualmente que las chalonas son glicoproteínas. En algunos casos se han identificado grupos terminales tiólicos, carboxílicos o N-terminales. En el caso de la linfocítica, se ha demostrado que la enzima piroglutamato aminopeptidasa anula el efecto anti-mitótico. Este hecho significa que la chalona linfocítica posee un residuo piroglutamato N-terminal.

En cuanto al efecto anti-mitótico, se intentó averiguar: 1) Cuáles eran las poblaciones y subpoblaciones linfoides normales hacia las cuales estaba dirigido fundamentalmente el efecto; 2) Qué tipo de linfocitos eran los que poseían mayor concentración de chalona; 3) Cuál era el efecto sobre células neoplásicas de origen linfoide y 4) Detectar la presencia de chalonas en tejidos neoplásicos y en el caso de verificarla, poder compararla con chalonas normales.

Se observó que el efecto antimitótico se ejercía sobre toda célula de origen linfoide ya sea normal o neoplásica. Además era indistinto que se tratara de células en franco proceso de división activa en forma descontrolada o división activa pero controlada como en el caso de los linfocitos estimulados inespecíficamente por PHA ó por un estímulo alógeno. Tampoco se encontró diferencia alguna en cuanto al origen de las células neoplásicas, pues el efecto anti-mitótico resultó positivo sobre líneas celulares B derivadas de linfoma de Burkitt, productoras

y no productoras de partículas virales, líneas celulares derivadas de una leucemia T, células leucémicas obtenidas tanto de sangre periférica como de médula ósea de leucemias linfoblásticas agudas T, B mixtas o nulas y de leucemias linfoides crónicas. Solamente no se observó efecto sobre aquellas células tumorales que no eran de origen linfoide. Estos hechos avalan la especificidad de tejido que poseen las chalonas.

Al intentar identificar la población linfoide responsable del efecto anti-mitótico, se observó que los linfocitos T cumplían con esa función. Es así como los efectos más pronunciados fueron detectados en chalonas obtenidas de leucemias linfoblásticas T y líneas celulares de origen T. El rendimiento de actividad anti-mitótica a partir de linfocitos B purificados de amígdalas, de leucemias crónicas ó de líneas celulares B, fue escaso. Si este hecho se debió a escasa concentración chalónica ó a una disminución efectiva en la actividad, no ha podido revelarse aún.

Sin embargo al compararse las chalonas normales con las neoplásicas se observó que las chalonas obtenidas de leucemias linfoblásticas agudas poseían 3 picos de actividad anti-mitótica, 2 de los cuales correspondieron a pesos moleculares menores de 25.000 daltons. Las células tímicas, cuyo grado de madurez es menor que el linfocito circulante, demostraron poseer una actividad chalónica menor y la mayor concentración proteica correspondió a un pico de peso molecular mayor de 25.000. Finalmente, las chalonas obtenidas a partir de ganglios de linfoma de Hodgkin y no Hodgkin y de leucemias linfoides crónicas con fenotipo B, demostraron 2 picos de escasa actividad antimitótica y proteica, que coincidieron con picos normales.

Por lo tanto existirían tres situaciones distintas que podrían explicar las fallas en la regulación linfoproliferativa: 1) Ausencia de factores inhibitorios endógenos capaces de ejercer esa regulación; 2) Presencia de factores inhibitorios demostrables "in vitro", pero incapaces de autolimitar la proliferación "in vivo" y 3) Alteraciones en las células neoplásicas como producto de la transformación que impidan el reconocimiento de sus propios mecanismos regulatorios. Es importante

recalcar aquí que las chalonas obtenidas a partir de las distintas neoplasias mencionadas, corresponden a factores endógenos de poblaciones celulares originadas a partir de un determinado clon celular y por lo tanto en el caso de leucemias crónicas existe una mayoría absoluta de linfocitos B. Como se mencionó anteriormente las chalonas son producidas a partir de linfocitos T. Es así como la ausencia de actividad anti-mitótica puede deberse al enriquecimiento tumoral de células B en algunas neoplasias mencionadas. Las diferencias encontradas en cuanto a los pesos moleculares de chalonas de leucemias agudas y normales puede no ser relevante "in vitro" pero sí ser decisivo "in vivo". Podría ser también que el proceso bioquímico de obtención de chalonas a partir de células leucémicas resultara en un artificio técnico a expensas del cual se concentraría gran cantidad de chalona que no reflejara la situación real "in vivo". Sin embargo al calcular la concentración proteica de chalonas obtenidas por millón de células, no se encontraron diferencias entre las normales y las de leucemias agudas. La tercera posibilidad parece ser la más acertada. Houck y colaboradores (124) reportaron que las células tumorales (provenientes de leucemias ó linfomas) necesitan el doble de concentración chalónica para demostrar el mismo porcentaje de inhibición que linfocitos humanos diploides. Este aumento en el requerimiento de chalona, estaría asociado al hecho que los linfoblastos tumorales, no pueden unir chalona en la misma forma que los linfocitos normales. Sugirieron que tanto linfomas como leucemias producirían una pequeña cantidad de chalonas pero debido a problemas de unión a la membrana celular, no podrían ejercer el control anti-mitótico necesario para disminuir la linfoproliferación.

Es imposible comparar estos resultados dado que en la literatura no se encuentran estudios bioquímicos sobre inhibidores obtenidos a partir de células neoplásicas. Sólo en el caso de un tumor ascítico, JB-1, se ha identificado un inhibidor endógeno de naturaleza policatiónica cuya actividad disminuye en presencia de polianiones por unión directa al inhibidor. Barford sugirió que los policationes anularían el efecto del

inhibidor ascítico bloqueando el receptor celular del inhibidor específico para el estadio G1 que debería ser aniónico dado que el inhibidor en sí es policatiónico (156).

Se han descrito otros agentes inhibitorios de la división celular a partir de cultivos de células neoplásicas (157) donde purificando parcialmente los medios acelulares, se han encontrado sustancias no citotóxicas, de alto peso molecular (mayor que 25.000) capaces de inhibir la división celular descontrolada.

Un modelo propuesto para el control de la proliferación celular, ha sido presentado por Allred (155) quien lo denominó: la hipótesis del receptor de contacto y la chalona. Se sugirió que existiría un único mecanismo para explicar los fenómenos de inhibición de proliferación celular por contacto y por actividad chalónica. La hipótesis se basa en dos suposiciones: primero, que el contacto célula-célula está mediado por moléculas de receptores sobre la superficie celular; segundo, que estos receptores pueden ser liberados al medio. Cuando dos células entran en contacto fragmentos de sus receptores se unen y se entrelazan de forma similar al entrecruzamiento producido por unión de la Concanavalina A a sus receptores. Se produce como consecuencia del entrecruzamiento un reordenamiento de la membrana celular que produce una inhibición de la síntesis de ADN y de la movilidad celular de la misma manera como la producen altas concentraciones del mitógeno mencionado.

El hecho que se haya demostrado que la mayoría de las chalonas tienen características glicoproteicas y que son capaces de inhibir la movilidad celular, favorece las postulaciones de esta hipótesis.

Nakai y colaboradores (158) han efectuado estudios sobre el sitio de acción de la chalona ascítica. Observaron que la síntesis de ADN en presencia de un ADN naciente marcado radioisotópicamente, no se afectaba por la presencia de chalona. Sin embargo las actividades de ADN polimerasas α y β se encontraban fuertemente inhibidas. Contrariamente, la ADN ligasa no se encontraría involucrada en los mecanismos de acción de la chalona. Estos resultados sugieren que el control de la

chalona sobre la actividad mitótica durante el proceso de replicación, ocurriría fundamentalmente por inhibición de las ADN polimerasas mencionadas que como consecuencia afectaría la síntesis de ADN, disminuyéndola drásticamente. Aparentemente, este efecto inhibitorio se ejercería directamente en el núcleo sin intermediación de receptores celulares de membrana.

Para poder estudiar el efecto que producían los inhibidores citoplasmáticos "in vivo", se recurrió a un modelo experimental murino. De esta forma se podría averiguar los posibles efectos terapéuticos que una aplicación de chalonas podría ofrecer como agente fundamentalmente citostática: ya sea en procesos neoplásicos o como agente inmunosupresor.

En primer lugar se pudo observar que la inoculación de chalona linfoide murina normal era capaz de aumentar la incidencia de un tumor alogeneico. Las explicaciones posibles serían: 1) efecto aumentador directo sobre la división celular tumoral; 2) efecto indirecto sobre el crecimiento tumoral por supresión de la respuesta inmune del huésped y 3) razón desconocida. La primera posibilidad pudo ser fácilmente descartada dado que la chalona inhibía la replicación de las células tumorales linfoides "in vitro". La segunda posibilidad parecería ser más razonable. Es fácil de comprender que un factor que específicamente inhibe la proliferación linfoide, actúe sobre la respuesta inmune que el huésped ofrece a un estímulo alogeneico, dado que todas las respuestas inmunológicas dependen de una u. otra manera de la proliferación celular. El crecimiento tumoral se hace evidente 20 días después de su implantación. Sin embargo microscópicamente, el rechazo tumoral puede observarse ya el día 14. Aunque a estos tiempos el extracto citoplásmico que fue inoculado junto con las células tumorales (L15), se haya metabolizado, los primeros días, más aún, las primeras horas post-inoculación, son esenciales para el destino final de la respuesta inmune alogeneica, ya sea rechazo o aceptación. Si las células efectoras proliferan inmediatamente después del estímulo antigénico y previo a la aparición de

células supresoras, la inhibición de esas células efectoras será máxima durante este período temprano. De hecho, se ha demostrado en este trabajo, que los mismos extractos citoplasmáticos afectan la inducción de células efectoras citotóxicas hacia antígenos de histocompatibilidad no afectándose la expresión de la citotoxicidad de linfocitos previamente inmunizados hacia un antígeno. Estos resultados concuerdan con el hecho que las células T pre-citotóxicas deben dividirse por lo menos una vez para convertirse en células efectoras y que luego no necesitan divisiones subsiguientes para ejercer el efecto citotóxico (159). Esto explicaría como un factor capaz de inhibir la división celular linfoide podría indirectamente favorecer el crecimiento de un tumor linfoide, a las concentraciones utilizadas en este ensayo, por supresión de las reacciones de rechazo correspondientes, aún cuando su acción directa sobre las células tumorales linfoides y sobre las inmunes ha desaparecido a lo largo del tiempo.

Los efectos producidos por extractos citoplasmáticos linfoides sobre otras respuestas del sistema inmunológico fueron: disminución de las reacciones de hipersensibilidad tardía a antígenos xenopépticos, disminución de la respuesta humoral al mismo antígeno y una disminución de las reacciones de injerto contra huésped hacia aloantígenos. Otros autores (160), han observado inhibición de la generación de células citotóxicas en cultivos mixtos de linfocitos, siendo esta inhibición dependiente del tiempo en que se añadía chalona a los cultivos estudiados.

Establecida la inmunosupresión producida por las chalona "in vivo", se quiso averiguar qué subpoblaciones linfoides se afectaban mayormente por su presencia y cuál era el producido sobre alguna subpoblación que tuviera funciones regulatorias. Para ello se cultivaron linfocitos en presencia de mitógenos que estimularan la linfoproliferación T, B ó ambas simultáneamente. Se pudo comprobar que la chalonga disminuía considerablemente la proliferación celular tanto T como la B. Las diferencias encontradas fueron de orden cinético o sea variaciones en cuanto al máximo efecto producido de acuerdo al momento en que se introdujo la chalonga linfoide a los cultivos.

Respecto a la inmunoregulación, se eligió estudiar el efecto producido sobre la generación o producción de células T supresoras y sobre su capacidad de actuar sobre células estimuladas inespecíficamente. Los resultados presentados han demostrado que existe inhibición en la etapa temprana, que en el caso del ensayo supresor T-T implica la etapa en la que el linfocito se compromete a convertirse en linfocito supresor. La expresión de la función supresora se vio alterada por la presencia de chalonas. Nuevamente estos datos ayudan a la comprensión de fenómenos como el favorecimiento del crecimiento de un tumor alogeneico.

El interés que revisten los efectos de inhibidores endógenos de la proliferación celular, se resumen en la posibilidad que ofrecen de:

- 1) ahondar en los mecanismos normales que regulan la división celular;
- 2) utilizarlos para ensayos apropiados con fines de diagnóstico y
- 3) utilizarlos como agentes terapéuticos.

Korsgaard y colaboradores (161), han demostrado el uso de chalonas epidermoides en el plano diagnóstico. Cultivos de células provenientes de carcinomas pobremente diferenciados pudieron distinguirse en presencia de chalona epidermoide G2 parcialmente purificada pues aquellas células que no se inhibieron resultaron ser adenocarcinomas y no verdaderos carcinomas. Esta posibilidad de distinguir entre células tumorales fuertemente asociadas, también la ensayaron Anichkov y colaboradores (162) en tumores uroteliales con resultados similares a los expuestos. En estos casos se examinó la cantidad de chalona obtenida a partir de epitelomas del tracto urinario. No se detectó chalona epidermoide G2 en el urotelio normal. El contenido de chalona G2 epidermoide se correlacionó con el grado de metaplasia de los tumores a células escamosas del tejido tumoral.

En cuanto a tratamiento, se ha propuesto el uso de chalonas como agentes terapéuticos en dos situaciones: como agente inmunosupresor en trasplantes y como quimioterápico citostático en algunas neoplasias. Los datos más conocidos se refieren al uso de chalonas granulocíticas en leucemias mieloides (110,111,136) con buenos resultados. Sin embargo

no existe acuerdo respecto a si estas chalonas producen inmunoestimulación o no. Por un lado se ha visto aumento en la eritropoyesis y la megacariopoyesis y una resistencia importante a infecciones bacterianas a expensas de una inmunoestimulación. Por el otro, se ha descrito una ausencia total de antigenicidad de parte de la chalona granulocítica y una inmun depresión declarada en pacientes administrados con la misma. Todos los estudios conocidos hasta el momento atribuyen un gran alcance al uso de las chalonas en terapia anti-neoplásica. Se ha demostrado también el control ejercido por chalonas hepáticas sobre hepatocitos "in vivo" posterior a una hepatectomía parcial (163) y las propiedades retardantes de pequeñas concentraciones de chalona hepática sobre células del hepatoma de Novikoff (164).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la presencia de chalonas linfoides en dosis adecuadas, disminuye significativamente la incidencia, la latencia, el crecimiento y la sobrevida de animales con tumores linfoides singeneicos. Además, dado que los mismos extractos inhibitorios no afectaron el crecimiento de tumores no linfoides y sí disminuyeron la sobrevida de aquellos animales que lo habían recibido, se concluye que el sistema inmunológico del huésped se afecta en forma importante. Esto significa que si bien la aplicación de chalonas es una herramienta útil en distintas neoplasias, en las linfoproliferativas debe administrarse cuidadosamente, pues si bien se puede contrarrestar el tumor, también se afecta el sistema inmunológico. A través de la supresión de la respuesta inmune por afectar la división celular "in vivo" como "in vitro", se reduce marcadamente la expansión clonal inducida por antígenos.

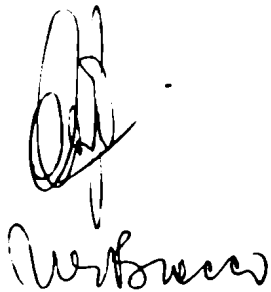
Aunque las chalonas linfoides no han sido extensivamente estudiadas, existen muchísimos trabajos concernientes a factores supresores linfoides — específicos e inespecíficos (11). Muchos de estos factores pueden ser segregados activamente por linfocitos estimulados inespecíficamente o sensibilizados hacia un determinado antígeno; pero también se han encontrado factores supresores a partir de células normales (165) ó de

sobrenadantes de cultivos de linfocitos normales (166). La especificidad de especie y tejido de estos factores no ha sido extensivamente estudiada. Debería tenerse en cuenta la posibilidad de que fueran chalonas.

La existencia de tantos factores supresores y activadores distintos, demuestra que la regulación de la respuesta inmune es un sistema exquisito y multifacético. Es tentativo especular que podría haber evolucionado de un mecanismo primitivo basado en la retroalimentación tipo chalónica.

Pese a que la teoría de la regulación por chalonas es provocativa en cuanto a sus alcances terapéuticos y biológicos, deben tenerse en cuenta las críticas a las mismas: 1) contaminación bacteriana posible en las preparaciones; 2) uso de incorporación de timidina tritiada en los ensayos, que puede diluirse en el pool de nucleósidos intracelulares; 3) el efecto citotóxico de preparaciones impuras; 4) ser conscientes de los parámetros metabólicos y bioquímicos que determinan la muerte celular y 5) tener presente que si bien los resultados "in vivo" son fisiológicos no siempre representan situaciones que se presentan en la realidad.

Ahondar en los mecanismos que regulan la división celular a través de inhibidores endógenos tisulares, no deja de ser interesante dado que de sus resultados depende el conocimiento de los mecanismos normales que controlan la proliferación y las fallas del mismo control en el crecimiento maligno.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Verboven". The signature is written in a cursive, somewhat stylized script.

CONCLUSIONES

1. Habiéndose visto que los núcleos aislados de linfocitos en reposo, son capaces de sintetizar un ADN de iguales características que aquel producido por linfocitos en proliferación por estimulación antigénica, se pensó que existiría una regulación extranuclear de la replicación del ADN.
2. Se obtuvieron factores linfoides citoplasmáticos humanos y murinos que cumplían con los requisitos de las chalonas: inhibidores de la división celular, especificidad de tejido, inespecificidad de especie, no citotóxicos y parcialmente reversibles.
3. Los factores provenían fundamentalmente de la población de linfocitos T pero afectaban tanto la linfoproliferación T como la B.
4. Producían, un efecto inmunosupresor: aumento del crecimiento de un tumor alogeneico, disminución de la inducción de la citotoxicidad mediada por células hacia antígenos de histocompatibilidad, disminución de reacciones de hipersensibilidad tardía, disminución de reacciones de injerto contra huésped y disminución de la producción de células supresoras.
5. Los factores inhibitorios resultaron ser resistentes a la DNasa, RNasa y al calor (56°C) pero sensibles a enzimas proteolíticas y a descongelamientos sucesivos revelando así su naturaleza proteica. Las actividades antimitóticas coincidieron con dos picos: uno mayor de 25.000 daltons y otro menor.
6. Factores similares obtenidos de células neoplásicas demostraron actividades iguales a las normales pero distintos pesos moleculares en leucemias linfoblásticas agudas y escasa actividad en células provenientes de leucemias crónicas o linfomas.
7. En el uso terapéutico de la chalona linfoide deberá tenerse en cuenta que si bien se logran regresiones tumorales linfoproliferativas, también su uso conduce a inmunosupresión. Para optimizar resultados, debe balancearse correctamente esta situación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lozzio,B.B.;Lozzio,C.B.;Bamberger,E.G. y Lair,S.V.:Regulators of cell division. *Int.Rev.Cytology*, 42:1,1975.
- 2.- Braylan,R.C.;Fowlkes,B.J.;Jaffe,E.S.;Sanders,S.K.:Cell volumes and DNA distributions of normal and neoplastic human lymphoid cells, *Cancer*,41:210,1978.
- 3 - Moore,G. y Minwada,J.: B and T lymphoid cell lines. *N.Engl.J.Med.* 288:106,1973.

Nilsson,K.;Giovannella,B.;Stehlin,C.y Klein,G.:Tumorigenicity of human hematopoietic cell lines in athymic nude mice. *Int.J. of Cancer* 19:3,337,1977.

Hamburger,A.:Cloning of human tumor cells in soft agar. *Tissue Culture Association Manual* 5:3,1141,1979.

Hamburger,A.;Salmon,S:Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J.Clin.Invest.* 60:846,1977.

Pike,B. y Robinson,W.:Human bone marrow colony growth in vitro. *J.Cell Physiol.* 76:77,1970.
- 8.- Metcalf,D.;Nossal,G.;Warner,N.;Micler,J.;Mandelt,J. y Gutman G.: Growth of B lymphocyte colonies in vitro, *J.Exp.Med.*142:1539,1975.
- 9.- Klein,G.;Telasaki,P.Billing,R.:Honig,R;Jondal,M.;Rosen,A.;Zenthen, J. y Clement,G: Somatic cell hybrids between human lymphoma lines III Surface markers. *Int.J.Cancer*, 19:66,1977.
- 10.- Holley,R.:Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*,258,5535,487,1975.
- 11.- Waksman,B. and Namba,J.: On soluble mediators of immunologic regulation. *Cell Immunol.* 21:161,1976.

- 12.- Bullough,W.S.:Mitotic control in adult mammalian tissues. Biol.Rev. 50,99,1975.
Singer,S.J.;Nicolson,G.L.:The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,Science 175,720,1972.
- 14.- Nicolson,G.L.: Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells.I Cytoplasmic influence over cell surface components. Biochem Biophys. Acta 457:57,1976.
- 15.- Nicolson,G. y Poste,G:The Cancer cell:Dynamic aspects and modifications in cell surface organization (first of two parts).The New Engl. J.of Med. 295:4,197, 1976.
- 16.- Edelman,G.M.;Yahara,I.;Wang,J.L:Receptor mobility and receptor cytoplasmic interactions in lymphocytes;Proc.NatlAcadSci.USA 70:1442,1973.
- 17.- Berlin,R.D.;Oliver,J.M.;Ukeni,T.E.:The cell surface. The N.Engl.J.Med. 292:515,1975.
- 18.- Wilson,L.;Bryan,J.Biochemical and pharmacological properties of microtubules. Adv.Cell Molec.Biol.3:21,1974.
- 19.- Poste,G.;Papahadjopoulos,D.;Nicolson,G.L.: Local anesthetics affect transmembrane cytoskeletal control of mobility and distribution of cell surface receptors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,72:4430,1975.
- 20.- Weber,G.: The molecular correlation concept:recent advances and implications. The Molecular Biology of Cancer. Edited by H.Busch,New York, Academic Press,p.487, 1974.
- 21.- Morris,H.D. Studies on the development,biochemistry and biology of experimental hepatomas.Adv.Cancer Res.9:227,1965.
- 22.- Weber,G.:Ordered and specific pattern of gene expression in neoplasia. Adv.Enzyme Reg. II:79,1973.
- 23.- Weber,G: Enzymology of Cancer cells. The New Engl.J.of Med.296:9,486,1977

- 24.- Ferdinandus, J.A.; Morris, H.D.; Weber, G.: Behaviour of opposing pathways of the thymidine utilization in differentiating, regenerating and neoplastic liver. *Cancer Res.* 31:550, 1971.
- 25.- Lea, M.D.; Morris, H.D.; Weber, G.: DNA metabolism in liver and kidney tumors of different growth rates. *Cancer Res.* 28:71, 1968,
- 26.- Kurx, W.E.; Linden, M. Friedell, G.H.: A series of transplantable rat mammary tumors with graded differentiation, growth rate and glutaminase content. *Cancer Res.* 30: 283, 1970.
- 27.- Watson, J.D. Crick, F.: La estructura del DNA y sus implicaciones en genética. *Nature*, 177:964, 1953.
- 28.- Messelson, M. Y Stahl, F.: The semiconservative duplication of DNA. *Proc. Natc. Acad. Sci USA.* 44:671, 1958.
- 29.- Loeb, L.A.; Agarwal, S.S.; Wooside, A.M.: Induction of DNA polymerase in human lymphocytes by phytohemagglutinin. *Proc. Natl Acad Sci. USA:* 61, 827, 1968.
- 30.- Slater, J.P.; Mildvan, A.S. and Loeb, L.A.: Zinc in DNA polymerases. *BBRC* 44:37, 1971.
- 31.- Agarwal, S.S. and Loeb, L.A.: Studies in the induction of DNA polymerase during transformation of human lymphocytes. *Cancer Res.* 32:107, 1972.
- 32.- Cooper, H.L.: Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation. *Transplant Rev.* 11:3, 1972.
- 33.- Gallo, R.C.; Yang, S.S. and Trig, R.C.: RNA dependent DNA polymerase of human acute leukemic cells, *Nature*, 228, 927, 1970.
- 34.- Springgate, C.F.; Mildvan, A.S.; Abramson, R.; Engle, J.L. and Loeb, L.A.: E. Coli DNA polymerase I, a zinc metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 5987. 1973.
- 35.- Weiss, S.B.: Liver RNA polymerase .*Proc. Natc. Acad. Sci. USA*, 46:1020, 1960,

- 36.- Sipple,A. y Hartman,G.: Mode of action of rypampicyn. B.B.A. 157: 218, 1968.
- 37.- Jacob,F. y Monod.J. Genetic Regulating Mechanisms in the synthesis of proteins. J.Mol.Biol.3:318,1961.
- 38.- Nicolson,G.L.:Transmembrane control of the receptor on normal and tumor cells II Surface changes associated with transformation and malignancy. Biochem,Biophys.Acta. 458:1-71,1976.
- 39.- Hakomori,S.:I Glicolipids of tumor cell membrane Adv.Cancer.Res.18: 265-315,1973.
- 40.- Hynes,R.O.:Role of surface alterations in cell transformation: the importance of proteases and surface proteins. Cell I: 147-158, 1974.
- 41.- Seifert,W.;Rudland,P.S.:Cyclic nucleotides and growth control in cultured mouse cells:correlation of changes in intercellular 3'5' cGMP concentration with a specific phase of the cell cycle. Proc. Natl.Acad.Sci.USA,71:4920-4924, 1974:
- 42.- Pastan,I.;Johnson,C.S.:Cyclic AMP and the transformation of fibroblasts. Adv.Cancer Res. 19:303-329,1974.
- 43.- Baldwin,R.W.: Immunological aspects of chemical carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 18:1-75,1973.
- 44.- Klein,G.: Viral Oncology. Raven Press N.Y. 1980..
- 45.- Coggin,J.H. Anderson,N.G.:Cancer differentiation and embryonic antigens:some central problems. Adv.Cancer Res. 19:105-165,1974.
- 46.- Klein,G.: Immunological surveillance against neoplasia. Harvey Lect. 69:71-102,1975.
- 47.- Hyman,R: Genetic alterations in tumor cells resulting in their escape from the immune response. Cancer Chemother.Rep.58:431-439,1974.

- 48.- Hellstrom,R.E. and Hellstrom,I.:Immunity to neuroblastoma and melanoma. Ann.Rev.Med.,23:19,1972.
- 49.- Gauci,L.;Caraux,J. and Serrou,B.:Immune complexes in the immune response to Cancer patients, in immunecomplexes and plasma exchanges in cancer patients (1).Ed. by Serrou and Rosenfeld,Elsevier North Holland p.37,1981.
- 50.- Day,N.;Good,R.;Witkin,S.:Circulating immunecomplexes and complement of in human malignancy.Ed. by Serrou and Rosenfeld,Elsevier North Holland p.99,1981.
- 51.- Schroham,L. and Sachs,G.:Different cyclic changes in the surface membrane of normal and malignant transformed cells.Exp.Cell Res. 85:8,1974
- 52.- Weber,G.Queener,S.F.;Ferdinandus,J.A.:Control of gene expression in carbohydrate,pyrimidine and DNA metabolism.Adv.Enzyme Regul. 9:63,1971
- 53.- Sweeney,M.J.;Hoffman,D.H.: Dihydroorolate dihydrogenase in liver and Morris hepatoma. Cancer Res. 33:394,1973.
- 54.- Mayfield,E.;Lvman,K.;Bresnick,E.:Incorporation of Bicarbonate ¹⁴C into pyrimidines and into ribonucleic acid of the Novikoff ascites tumor cell. Cancer Res.27:476,1967.
- 55.- Ono,T.;Blair,D. y Polter,V.: The comparative enzymology and cell origin of rat hepatomas. IV Pyrimidine metabolism in minimal deviation tumors. Cancer Res. 23:240, 1963.
- 56.- Jones,M.E.:Regulation of pyrimidine and arginine byosynthesis in mammals. Ad.Enzyme Regul. 9:19,1971.
- 57.- Warburg,O.: On the origin of cancer cells, Science,123:309,1956.
- 58.- Lo,C.;Cristofal,V.:Morris,H.: Studies on respiration and glycolyses in transplanted hepatic tumors of the rat. Cancer Res.28:1,1968.

- 59.- Weber,G;Stubbs,M.;Morris,H.P.: Metabolism of hepatomas of different growth rates in situ and during ischemia, Cancer Res. 31: 2177,1971.
- 60.- Calabresi,P.;Parks,R.E.:Chemotherapy of neoplastic diseases,The pharmacological basis of therapeutics. Ed.A.Gilman New York,Macmillan p.1248,1975.
- 61.- Lea,M.A.;Sasovetz,D.;Musselo,A:Effects of hydroxyurea and 6 mercaptopurine on growth and some aspects of carbohydrate metabolism in regenerating and neoplastic liver. Cancer Res. 30:1994, 1970.
- 62.- Weber,G.;Jackson,R.C.;Williams J.C.: Enzymatic markers of neoplastic transformation and regulation of purine and pyrimidine metabolism. Adv.Enzyme Regul,15:33,1977.
- 63.- Anderson,T.;Bender,R.A.;Fisher,R.:Combination chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: results of long term follow up,Cancer Treat.Rep. 61:1057,1971.
- 64.- Frei,E.:Combination cancer therapy. Cancer Res. 32:2593, 1972.
- 65.- Nowell.P.C.; Unstable chromosome changes in tuberculin stimulated leukocytes cultured from irradiated patients. Evidence for immunologically committed ,long-lived lymphocyte in human blood. Blood,26:798, 1965.
- 66.- Nowell,P.C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of normal human lymphocytes. Cancer Res. 20,462,1960
- 67.- Fisher,D.B. and Mueller,G.C.: An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin. Proc.Natl.Acad.Sci. USA,60:1396,1968.
- 68.- Kay,J.E.:Phytohemagglutinin: an early effect on lymphocyte lipid metabolism, Nature,219,172,1968.
- 69.- van den Berg,K.J. and Betel,I:Early increase of amino acid transport in stimulated lymphocytes,Exptl. Cell Res. 66:257,1971.

- 70.- Peters, J.H. and Hausen, P.: Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. 2. Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-o-methylglucose, *Eur. J. Biochem.*, 19:509, 1971.
- 71.- Quastel, M.R. and Kaplan, J.G.: Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with PHA. *Exptl. Cell Res.* 63:230, 1970.
- 72.- Withney, R.B. and Sutherland, R.M.: Kinetics of calcium transport in lymphocytes before and after stimulation by phytohemagglutinin, in *Seventh Leucocyte Culture Conference*, 1973, 63.
- 73.- Pogo, B.G.T.; Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E.: RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 55:805, 1966.
- 74.- Hedeskow, C.J.: Early effects of phytohemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes, *Biochem. J.* 110:373, 1968.
- 75.- Packman, L.M.: The carbohydrate metabolism and respiration of isolated small lymphocytes, *Blood*, 30:691, 1967.
- 76.- Hirschhorn, R., Brittinger, G., Hirschhorn, K. and Weissman, G.: Studies of Lysosomes: XII Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. *J. Cell Biol.* 37, 412, 1968.
- 77.- Lucas, Z.J.: Pyrimidine nucleotide synthesis: regulatory control during transformation of lymphocytes in vitro, *Science*, 156, 1237, 1967.
- 78.- Handmaker, S.D. and Graef, J.W.: The effect of phytohemagglutinin on the DNA-dependent RNA polymerase activity of nuclei isolated from human lymphocytes, *Biochem. Biophys. Acta*, 199:95, 1970.
- 79.- Cooper, H.L.: Ribonucleic acid metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin: II. Rapidly synthesized ribonucleic acid and the production of ribosomal ribonucleic acid, *J. Biol. Chem.* 243:34, 1968
- 80.- Ahern, T. and Kay, J.E.: The control of protein synthesis during the stimulation of lymphocytes by phytohemagglutinin *Biochem. Biophys. Acta* 200:36, 1971.

- 81.- Hayden,G.A.;Crowley,G.M. and Jamieson,G.A.:Studies on glycoproteins V. Incorporation of glucosamine into membrane glycoproteins of phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. J.Biol.Chem. 245, 5827,1970.
- 82.- Kay,J.E. and Cooke,A.:Ornithine decarboxylase and ribosomal RNA synthesis during the stimulation of lymphocytes by phytohemagglutinin FEBS letters, 16:9,1971
- 83.- Loeb,L.A.;Agarwal,S.S. and Woodside,A.M.:Induction of DNA polymerase in human lymphocytes by phytohemagglutinin.Proc.Nal.Acad.Sci. USA, 61.827,1968.
- 84.- Rabinowitz,Y.,Wong,P.,and Wilhite,B.A.:Effect of phytohemagglutinin on enzymes of thymidine salvage pathway of cultured chronic lymphatic leukemic lymphocytes, Blood,35:236,1970.
- 85.- Pegoraro,L. and Bernengo,M.G. :Thymidine kinase,deoxycytidine kinase and deoxycytidylate deaminase activities in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. Exptl. Cell Res. 68:283,1971.
- 86.- Bender,M.A.and Prescott D.M.: DNA synthesis and mitosis of cultures of human peripheral leukocytes. Exptl.Cell Res. 27:221,1962.
- 87.- McIntyre,O.R. and Ebaugh,F.G. Jr: The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P³² incorporation in the DNA RNA and acid soluble fractions, Blood,19:443,1962.
- 88.- Rabinowitz,Y. and Dietz,A.:Genetic control of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozymes in cultures of lymphocytes and granulocytes: effect of addition of phytohemagglutinin,actinomycin-D or puromycin, Biochem.Biophys.Acta., 139,254, 1967.
- 89.- Nadler,H.L.Dowben,R.M., and Hsia,D.Y.Y: Enzyme changes and polyribosome profiles in phytohemagglutinin stimulate lymphocytes,Blood, 34:52,1969.

- 90.- Kay, J.E. and Pegg, A.E.: Effect of inhibition of spermidine formation of protein and nucleic acid synthesis during lymphocyte activation. FEBS Letters, 29:301, 1973.
- 91.- Rubin, A.D. and Cooper, H.L. Evolving patterns of RNA metabolism during transition from resting state to active growth in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54:469, 1965.
- 92.- Roos, D. and Loos, J.A.: Effect of phytohemagglutinin on the carbohydrate metabolism of human blood lymphocytes after inhibition of the oxidative phosphorylation, Exptl. Cell Res., 77:79, 1973.
- 93.- Smith, J.W.; Steiner, A.L.; Newberry, W.M. Jr. and Parker, C.W.: Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in human lymphocytes, Alterations after phytohemagglutinin stimulation, J. Clin. Invest. 50, 432, 1971.
- 94.- Quastel, M.R. and Kaplan, J.G.: Lymphocyte stimulation: The effect of ouabain on nucleic acid and protein synthesis. Exptl. Cell Res. 62: 407, 1970.
- 95.- Weiss, P.: Self regulation organ growth by its own products. Science, 115, 487, 1952.
- 96.- Bullough, W.S.: Mitotic control in adult mammalian tissues. Biol. Res. 50:99, 1975.
- 97.- Bullough, W.S. and Lawrence, H.S.: The control of epidermal mitotic activity in the mouse. Proc. Roy. Soc. Lond. B151, 517, 1960
- 98.- Bullough, E.S. and Lawrence, H.S.: Control of mitosis in mouse and Hamster Melanoma by means of the melanocyte chalone. Eur. J. Cancer, 4: 607, 1968
- 99.- Bullough, W.S. Hewelt, C.L. and Lawrence E.B.: The epidermal chalone. A preliminary attempt of isolation. Exp. Cell Res. 31:192, 1964.

- 100.- Philpott,G.W.:Tissue specific inhibition of cell proliferation in embryonic stomach epithelium in vitro. Gastroenterology, 61:25, 1971.
- 101.- Yamaguchi,T.;Hirobe,T.;Kinjo,Y.;Manaka,K.: The effect of chalone on the cell cycle in the epidermis during wound healing.Exp.Cell Res. 89/2, 247, 1974.-
- 102.- Kirsgaard,R.;Iversen O.H.;Iaksson-Forsen,G.;Burton,D.R.:Specificity of epidermal chalone extracts for human epidermoid tumor cells in vitro: a preliminary report. Cell Tissue Kinet. 11(4),441, 1978.
- 103.- Sekar,G. Owen,W.G. Cook,R.T.: Fractionation and preliminary characterization of a low molecular wight bovine hepatic inhibitor of DNA synthesis in regenerating rat liver. Exp.Cell Res. 122 (1):47,1979.
- 104.- Molinard,R., Pietu,G. Chaney,E.Trincal,G. Frayssone,T.C.: An inhibitor of hepatoma cell multiplication in the efferent fluid from isolated perfused rat liver. Biomedicine (Express) 23 (10):434,1975.
- 105.- Bullough,W.S. and Lawrence,E.B.: Control of mitosis in mouse and hamster melanomate by means of the melanocyte chalone,Eur.J.Cancer 4 (6) 607, 1975.
- 106.- Dewey,D.L.:The melanocyte chalone: Natl Cancer Inst. Monogr.38:213, 1973.-
- 107.- Houck, J.C.,Shainer,V.K. Cheng,R.F.: Fibroblast chalone and serum mitogen (anti-chalone) Nature (New Biol) 246:111,1973,
- 108.- Sachen, H.: The organ specific growth inhibitor of the tubule cells of the rat's kidney ,Acta Chem.Scand. 17,889,1963.
- 109.- Chopin ,D.P. y Simonett,J.D.:Stimulation of mitosis in amphibian kidney by organ-specific anti serum. Nature,225:657,1970.
- 110.- Rytomaa,T.Vilpo,V.A.;Levanto,A y Jones, W.A.: Effect of granulocyte chalone on acute and chronic granulocytic leukemia in man. Report of seven cases. Scand.J.Haematol.(suppl) 27:5, 1976.

- 111.- Rytomaa,T.;Vilpo,J.A.;Levanto,A y Jones,W.A.:Effect of granulocytic chalone in acute myeloid leukemia in man. *Lancet* i: 771, 1971.
- 112.- Vilpo,J.: Non specific and specific effects of a granulocytic bio-inhibitor on different haematopoietic cell populations. *Scand.J. Haematol.* 22 (5):433,1979.
- 113.- Moorhead,J.;Paraskwa-Tchernozeuski, E. Pirrie,A.J.y Hayes,C.: Lymphoid inhibitor of human lymphocyte DNA synthesis and mitosis in vitro. *Nature*,224:1207,1969.
- 114,- Jones,J.:In vitro inhibitor of DNA synthesis in human leukemia cells by a lymphoid cell extract. *Lancet*, 654,1970.
- 115.- Gauci-Giralt,E.;Lasalvia,E.;Florentini,I y Mathe,G.: Evidence for a lymphocyte chalone. *Europ.J.Clin Biol.Res.* 15:1012,1970
- 116.- Simonett,J.D. Fisher,J.M. y Heppleston,A.G.:Tissue specific inhibition of lung alveolar cell mitosis in organ culture, *Nature*, 223: 944, 1969.
- 117.- Allmont,Y, Manger,A.:Existence of a spermatogonial chalone in the rat testis. *Cell Tissue Kinetics.* 7:165,1974.
- 118.- Kivilackso,E. y Rytomaa,T.:Erythrocytic chalone: a tissue specific inhibitor of cell proliferation in the erythron. *Cell Tissue Kinetics* 4:1, 1971.
- 119.- Ottanian,C.: Las chalonas. *Publ.Facultad de Medicina, Universidad de la República del Uruguay*, 1981.
- 120.- Allen,J.C. y Smith,J.C.:Chalones, a reappraisal. *Biochem.Soc.Trans.* 7:584,1979.
- 121.- Rytomaa,T.: The chalone concept.*Int.Rev.Exp.Pathol.*16:155,1978.
- 122.- Rytomaa,T.y Toivonen,H.:Chalones: concepts and results. *Mech.Ageing Develop.* 9:471,1979.

- 123.- Finkler,N. y Acker,P.:Chalones: a mini revue. The mount Sinai Journal of Medicine. Vol 45: N°2, 258,1978.
- 124.- Houck,J. y Hemming,H. Chalone, Specific endogenous mitotic inhibitors. FEBS Letters, 32:1,1-8,1973.-
- 125.- Ross,E. y Gilman,A.: Hormone sensitive adenylate cyclase:resolution and reconstitution of some components.Adv.Cyclic.Nucl.Res.p54,1979.
- 126.- Ross,E. y Gilman A.:Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. J.B.C.252:20,6366,1977.
- 127.- Attalah,A.M.:Chalones. ed. J.C.Houck Nort Holland Publishing Co. Amsterdamb, 1976, p 176.
- 128.- Attalah,A.M. y Houck,J.C.:Alternative mechanism for lymphocyte chalone Exp.Cell Res. 105:137,1977.
- 129.- Attalah,A.M.:Chalones ed. J.C.Houck North Holland Publishing Co. Amsterdam, 1976, p. 164.
- 130.- Gelfant,S and Candelas G.J.: Regulation of epidermal mitosis. J.Invest.Dermatol. 59:7,1972.-
- 131.- Bullough,W.S. y Lawrence E.B.:Mitotic control by internal secretion The role of the chalone adrenaline complex. Exp.Cell Res. 33:176,1964.
- 132.- Bulloug,W.S. y Lawrence E.B.: The role of glucocorticoid tissues in the control of epidermal mitosis.Cell Tissue Res. 1:5,1968.
- 133.- Rytomaa,T. y Kiviniemik: Regression of generalized leukemia in the rat induced by granulocytic chalone. Eur.J.Cancer,6:401,1970.
- 134.- Elgyo,K. y Hennings, H. Epidermal chalone and proliferation in a transplantable squamous carcinoma in hamsters.Virchows Arch.Zellpath. 7:1,1971.
- 135.- Lasalvia,E.;Garcia Giralt,E. y Maciera Coelho A.: Extraction of an inhibitor of DNA sunthesis of human perifheral blood lymphocytes and bovine spleen Eur.J.Clin.Biol.Res. 15:789,1970.

- 136.- Rytomaa,T.;Vilpo,J.P.;Levanto,A. y Jones,A.M.: Effect of granulocyte chalone on acute and chronic granulocytic leukemia in man. Scand.J.Haematol. 27 (suppl) 3:28,1976.
- 137.- Thomas,W.;Florentin,R.;Naum,S.;Reiner,J. y Lee,K.:Alteration in population dynamics of arterial smooth muscle cells curing atherosclerosis I.Activation of interphase cells in cholesterol-fed Swine prior to gross atherosclerosis demonstrated "post pulse" salvage labeling. Exp.Med.Pathol.15:245,1971.
- 138.- Houck,J.C.;Attalah,A.M.y Lily,J.R. :Some immunosuppressive properties of lymphocyte chalones. Nature,245:148,1973.
- 139.- Boylun,A:Separation of leukocytes form blood and bone marrow.Scand.J. Clin.Lab.Invest. 21 (suppl) 97, p.7,1968.
- 140.- Jondal,M.Holm,G. y Wigzell,H.: Surface markers in human T and B lymphocytes. J.Exp.Med. 136: 207,1972.
- 141.- Lowry,O.Rosebrough,N.;Fan,L.Randall,R: Protein measurement with Folic phenol reagent. J.Biol.Chem.193:265,1951.
- 142.- Saal,F.;Colmerauer,M.E.M.;Braylan,R.y Pasqualini,C.D.: Tumor growth in allogeneic mice bearing a plastic cylinder. J.Natl.Cancer Inst. 49: 451,1972.
- 143: Liew,F.Y.: Regulation of delayed-type hypersensitivity,T suppressor cells for delayed type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. Eur.J.Immunol. 7:714,1977.
- 144.- Fridlender,B. Virasoro, S. Blau,S., Mordoh,J.: Lymphocyte α and β DNA polymerases. BBRC, 60: 3,983,1974.
- 145.- Svuleil,C. y Panijel,J.:Effect of antigen does on the presence of a particular BrdN-labelled DNA fraction in lymph node cells.Exp.Cell Res. 78:463,1973.-
- 146.- Gottlieb,A.;Taylor,R. y Sonsheimer F. III Replication of deoxyribonucleic acid in lymphoid cells. An unusual effect of Bromodeoxyuridine Biochem.9:4322,1970.

- 147.- Binkerd,T. y Toliver,V.:RNA linked membrane associated DNA.Molec. and Cell Biochem. 5,3:118,1974.
- 148.- Probst,E.;Gentner,V.;Hofstätter,M y Jenke,R.: Newly synthesized mammalian cell DNA.Evidence for effects simulating the presence of RNA in the nascent DNA fraction isolated by nitrocellulose column chromatography.B.B.A. 340:4:1162,1974.
- 149.- Thompson,L. y Mueller,G.:DNA replication in nuclei isolated from bovine lymphocytes. B.B.A. 378: 344,1975.
- 150.- Krokan,H.;Wist,E. y Prydy,H.: DNA replication intermediate in whole HeLa cells and isolated nuclei. B.B.A. 475:553,1977.
- 151.- Berger,N. y Johnson,E.:DNA synthesis in permeabilized mouse cells. B.B.A. 425:1,1976.
- 152.- Buckley,P. y Wedner,H.: Measurement of the DNA synthetic capacity of activated lymphocytes:nucleotide triphosphate incorporation by permeabilized cells. J.of Immunol.120:6,1930,1978.
- 153.- Rapaport,E.;Garcia-Blanco,M. y Zamecnik,P.:Regulation of DNA replication in S phase nuclei by ATP and ADP pools. PNAS,76:4,1643,1979.
- 154.- Houck,J.;Kanagalingam,K.;Haut,C.;Atallah,A. y Chung.A.:Lymphocyte and fibroblast chalone:some chemical properties.Science,196,896,1976.
- 155.- Allred,L.:The contact receptor-chalone hypothesis: a model for the control of cell proliferation.J.Cell Biol. 79 (2) 48a,1979.
- 156.- Barford,N.:Partial pacification and characterization of a cell specific G1- inhibitor from JB-1 ascite tumors.Eur.J.Cancer,17 (4):421, 1981.
- 157.- Tanjun,T. y Ming,C.:Cancer suppressive activity of biologic fluids. Sci.Scionica 22 (7):835,1979
- 158.- Nakai,G.S. y Gergelg,H.:Ehrlich ascite tumor (EAT) chalone effects on nascent DNA synthesis in isolated EAT nuclei.Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 20:23,1979.

- 159.- Röllinghoff, M. y Wagner, H.: Induction of secondary cytotoxic T lymphocyte in vitro does not require cell proliferation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 151:348, 1976.
- 160.- Berg, D. y Hirschberg, H.: Immunosuppressive effect of lymphocyte chalone. Scand. J. Immunol 10(4)360, 1979.
- 161.- Korsgaard, R.; Iversen, O.; Isaksson, G. y Burton, D.: Specificity of epidermal chalone extracts for human epidermoid cells in vitro. Cell Tissue Kinet. 11(4):441, 1978.
- 162.- Snichkow, N.; Vlasov, N. y Okulov, V.: Use of epidermal G₂-chalone for detection of squamous cell differentiation in experimental urotelial tumors. Arch. Patol. 43:(4):82, 1981.
- 163.- Chekuleva, L.; Ketlinski, S. y Okulov, V.: The effect of chalone derived from rat liver on the proliferation of hepatocytes at various time periods after partial hepatectomy. Tsitologiya 20 (4):436, 1978
- 164.- Henderson, I.: Growth retardant properties of liver extract. J. Surg. Oncol. 2 (3):221, 1970.
- 165.- Watanabe, N. y Ovary, Z.: Suppression of IgE antibody production in SJL mice III Characterization of a suppressor substance from normal SJL spleen cells. J. Exp. Med. 145: 1501, 1977.
- 166.- Colnaghi, M.; Menard, S. y Dellaporta, G.: Natural antitumor serum reactivity in BALB/c mice. I Characterization and interference with tumor growth. Int. J. Cancer, 19:275, 1977.