

## Tesis de Posgrado

# Factores que afectan el desarrollo de metástasis : Modelo experimental en el ratón

Bonfil, Ricardo Daniel

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Bonfil, Ricardo Daniel. (1986). Factores que afectan el desarrollo de metástasis : Modelo experimental en el ratón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1955\\_Bonfil.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1955_Bonfil.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bonfil, Ricardo Daniel. "Factores que afectan el desarrollo de metástasis : Modelo experimental en el ratón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1955\\_Bonfil.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1955_Bonfil.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 QUE AFECTAN EL  
DESARROLLO DE METASTASIS  
Modelo experimental en el raton

Autor: RICARDO DANIEL BONFIL

Directora: Dra. Christiane Dosne Pasqualini

Sección Leucemia Experimental  
Instituto de Investigaciones Hematológicas  
Academia Nacional de Medicina

Tesis presentada para optar al título de:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Buenos Aires 1986

1986

## A MI TIO ALBERTO

que ha sido una de esas personas muy especiales, difíciles de hallar en el transcurso de la vida, y que por su forma de ser nunca dejará de estar en mis pensamientos. A él, que disfrutaría de este momento como siempre disfrutaba con la alegría de sus seres queridos, y a quien yo tanto quería, dedico esta Tesis de todo corazón.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no hubiera sido posible de no haber contado con la ayuda de varias personas e Instituciones. A ellos mi más sincero agradecimiento:

A mi esposa y a mi hija, que no saben cuánto me ayudaron, al comprender la importancia que esta Tesis tenía para mí y al brindarme el clima ideal para que mi mente rindiera lo más que puede;

A mis padres, por haberme facilitado la oportunidad de alcanzar esta etapa de mi carrera y por alentarme, aún hasta el día de hoy, en mis estudios;

Al Dr. Oscar D. Bustuoabad, por su gran ayuda, su entusiasmo y por los consejos brindados durante el desarrollo de este trabajo;

Al Dr. Roberto P. Meiss, por su estrecha colaboración en los estudios histológicos y en el análisis de los mismos;

Al Dr. Raúl A. Ruggiero, que dedicó gran parte de su tiempo en la discusión de los experimentos realizados;

A la Dra. Christiane Dosne Pasqualini, que ha sido quien me brindó la oportunidad de iniciarme en esta hermosa carrera que es la investigación, y que me ha apoyado constantemente;

Al Dr. Lucas Colombo, por el desinteresado suministro de los tumores M3 y MM3;

Al Dr. Alfredo Molinolo, por su colaboración en los estudios de inmunofluorescencia y en el análisis de los resultados obtenidos;

Al Dr. Sol L. Rabasa, por los valiosos consejos brindados durante la elaboración de esta Tesis;

A la Lic. Patricia Elizalde y a las Bioquímicas Liliana Krotz y Ana Lurantos, por su asesoramiento en las técnicas de medición de concentración proteica;

A la Dra. Susana Olabuenaga, por enseñarme la técnica de citotoxicidad frente a células YAC;

Al Sr. Juan Portaluppi y a la Sra. Alicia Sens, que han colaborado con una excelente asistencia técnica;

A la Srta. Adriana Belloso por su ayuda en la preparación final del manuscrito;

Al Dr. Carlos Quintans, del Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica, por el suministro de ratones nude;

Al Sr. Jorge Belfiore, por la irradiación de las células tumorales para los ensayos de inmunización;

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y a FUNDALEU (Fundación para combatir la leucemia) por su apoyo económico.

INTRODUCCION.....	1
Objetivo.....	2
I.  CANCER.....	3
1.  Qué es el cáncer.....	3
2.  Factores cancerígenos.....	6
II. METASTASIS.....	9
1.  Cuando la célula cancerosa emigra.....	9
2.  No todas las células de un tumor son idénticas.....	17
3.  Cada tipo de tumor tiene un blanco prefijado.....	21
4.  Cómo puede el huésped enfrentar a las metástasis.....	23
5.  El tumor primario actúa a favor o en contra de las metástasis.....	32
MATERIAL Y METODOS.....	35
Animales.....	36
Tumores.....	36
Evaluación del crecimiento tumoral.....	37

Suspensiones de células tumorales.....	37
Ensayos de inmunización antitumoral.....	38
a. Células irradiadas.....	38
b. Implantación y excisión.....	38
Evaluación del crecimiento metastásico.....	39
Ensayo de metástasis experimentales.....	40
Análisis histológico.....	41
Clearance de carbón coloidal.....	41
Medición del nivel de actividad NK.....	42
Inmunofluorescencia.....	43
Ensayo de rosetas EA .....	43
Preparación de extracto de material necrótico.....	44
Medición de proteínas.....	45
Ensayo de desprendimiento celular "in vitro".....	45
Análisis estadístico.....	46
RESULTADOS.....	48
Cinética de crecimiento subcutáneo de M3 y MM3.....	49
Cinética de aparición de las metástasis.....	51
Ensayos de inmunización .....	53
Análisis histológico.....	56



Función T y metástasis espontáneas y experimentales.....	72
Función NK y metástasis experimentales.....	78
Función macrofágica y metástasis experimentales.....	81
Anticuerpos y metástasis.....	84
Receptores para Fc.....	85
Resistencia concomitante.....	85
Extractos de material necrótico y metástasis.....	93
Extractos de material necrótico y desprendimiento celular.....	99
Extractos de material necrótico, resistencia concomitante y metástasis.....	106
DISCUSION.....	110
RESUMEN.....	132
BIBLIOGRAFIA.....	134

## INTRODUCCION

## Objetivo

Las metástasis son la causa más frecuente de muerte en enfermos con cáncer. A pesar de lo mucho que se ha experimentado en cancerología, no se conocen aún con precisión las razones por las cuales un tumor maligno determinado da origen a metástasis mientras que otro no lo hace. El objetivo de esta Tesis fue tratar de dilucidar los factores que intervienen en el desarrollo de las metástasis en un modelo experimental en el ratón BALB, que consiste en un adenocarcinoma mamario de origen espontáneo, con baja capacidad metastásica, y de una variante del mismo tumor, con alto potencial metastatizante. Se estudiaron, a través de distintos enfoques experimentales, las posibles diferencias existentes entre ambos tumores que pudieran explicar su distinta capacidad metastatizante. Así, se analizó si las respuestas inmunológicas determinadas por linfocitos T, anticuerpos, células NK, o macrófagos podían afectar el patrón metastásico de cada tumor de modo diferente. Se intentó además correlacionar la resistencia concomitante, el aspecto histológico y el grado de necrosis, con la capacidad metastásica de ambos tumores.

## I. CANCER

### 1. Qué es el cáncer

Durante la ontogenia del individuo existe constantemente multiplicación celular en diferentes tejidos de acuerdo con un ritmo determinado. Normalmente hay un mecanismo regulador que limita y controla esta multiplicación celular. Así, luego de una herida o hepatectomía parcial, se produce una regeneración a través de multiplicaciones celulares que cesan cuando el defecto es cubierto, es decir, el organismo controla el crecimiento regulándolo en tiempo y espacio. Por causas aún no conocidas completamente, en ciertos casos el organismo pierde esa facultad de control, al menos sobre algunas células, y entonces éstas pueden transformarse en cancerosas.

El cáncer constituye un grupo de enfermedades con un conjunto de características comunes que no sólo afecta al hombre sino también a animales y vegetales. Si bien es cierto que en la actualidad su frecuencia parece haber aumentado, se considera que ello se debería a una prolongación de la vida media del individuo que permite que más personas lleguen a desarrollarlo, así como también al perfeccionamiento de los métodos

diagnósticos, y a los datos epidemiológicos que hoy tenemos a nuestra disposición en casi todo el mundo.

Qué es el cancer?. Antes de poder contestar a esta pregunta debe aclararse qué significa neoplasia, dado que el cáncer es una neoplasia maligna: "Una neoplasia es un crecimiento tisular relativamente autónomo" (140). El concepto de autonomía relativa, que es el más importante en la definición, indica que si bien las células neoplásicas se dividen sin respetar los mecanismos de control proliferativos del huésped, no pueden seguir multiplicandose más allá de cierto punto sin depender al menos en parte del huésped (como ejemplo pueden citarse ciertos cánceres de próstata y de mama que son hormonodependientes).

Las neoplasias o tumores pueden clasificarse de acuerdo a su comportamiento evolutivo en benignos o malignos. Esta clasificación se basa en un conjunto de características (6, 140) ninguna de las cuales por sí sola puede definir la benignidad o malignidad de un tumor; prueba de ello son ciertos tumores "borderline" que no pueden ubicarse claramente en ninguna de las dos categorías. Así, los tumores benignos estan formados por células bien diferenciadas y tienen parecido microscópico con el tejido de origen en la mayoría de los casos. Los tumores malignos en cambio, en la mayoría de los casos, poseen células poco diferenciadas y, si bien pueden guardar parecido

macroscópico con el tejido de origen, en general no lo hacen a nivel microscópico; en cuanto a la función del tejido donde se generan puede o no mantenerse e incluso, en algunos casos, puede dar lugar a funciones diferentes. La velocidad de crecimiento suele ser mucho mayor en las neoplasias malignas, o cáncer que en las benignas, lo cual se debería fundamentalmente a la alta frecuencia de mitosis, quizás como consecuencia de un periodo G1 abreviado. Las células de los tumores benignos permanecen en su sitio de origen y cuando crecen en un tejido sólido por lo general están rodeadas por una pseudocápsula. En los cánceres, en cambio, suele no haber pseudoencapsulación y por lo tanto las células invaden tejidos vecinos o se establecen como crecimientos secundarios en órganos distantes de la neoplasia original, es decir, se producen metástasis. Si bien muchos oncólogos y patólogos definen la neoplasia maligna por su capacidad de metastatizar hay que aclarar que no siempre es así. En los animales de laboratorio, por ejemplo, la mayor parte de los tumores malignos no suelen dar metástasis. Esto también se ve en algunos cánceres humanos como el carcinoma basocelular. Lo que define en realidad a la malignidad en todos los casos es la capacidad invasiva.

Con respecto a la nomenclatura, los tumores benignos suelen designarse usando un prefijo referido al tejido de origen y el sufijo -oma (por ejemplo fibroma, papiloma, etc.); existen excepciones como hepatoma, melanoma y linfoma que son neoplasias

malignas. Los tumores malignos se clasifican, desde el punto de vista histogenético, en carcinomas, sarcomas y leucemias. Los cánceres surgidos de tejidos derivados del ectodermo o endodermo, que serían aproximadamente el 85 % (124), son los carcinomas, y los originados a partir del tejido mesodérmico, se denominan sarcomas (6, 22). Las leucemias son neoplasias malignas que se originan a partir de células hematopoyéticas de la médula ósea y de los ganglios linfáticos.

## 2. Factores cancerígenos

Si bien no siempre es necesario conocer la etiología de una enfermedad para poder combatirla, desde hace mucho tiempo se han investigado las causas del cáncer bajo el concepto de que no podrá ser curado mientras su origen inicial permanezca ignorado. Las observaciones en este sentido provienen fundamentalmente de dos fuentes: la epidemiología y la experimentación de laboratorio. A través de la primera se obtienen datos valiosos para la patología humana. De hecho la primera relación causal de un cáncer humano fue demostrada a través de la epidemiología al observarse que el llamado "cáncer de los deshollinadores" era provocado por la acumulación de hollín en los pliegues del escroto. Por medio de la experimentación en laboratorio, se han

obtenido datos más precisos sobre carcinogénesis (proceso por el cual una célula se transforma en cancerosa), debido principalmente a la posibilidad de ensayos "in vivo" que por razones éticas no son realizables en el ser humano. Cabe todavía aclarar la trascendencia de los descubrimientos realizados en el laboratorio en relación con el problema clínico del cáncer humano.

Aunque parezca paradójico, actualmente se conocen muchos factores etiológicamente asociados al cáncer pero se ignora si todos ellos confluyen en una única causa intracelular. Estos factores suelen ser clasificados arbitrariamente como factores intrínsecos y extrínsecos al individuo (158). Entre los primeros se encuentran todos aquellos que determinan la susceptibilidad de un individuo a desarrollar una neoplasia maligna cuando se expone a factores exógenos, o quizás hasta en ausencia de ellos. Como ejemplo se pueden citar factores genéticos (5, 23), edad (24, 126), estado hormonal (181) e inmunológico (175). En cuanto a los factores extrínsecos, estos dependen de aspectos geográficos (168), dietéticos (186), ocupacionales (6), y hasta de prácticas sociales y religiosas (181). Los agentes carcinogénicos suelen clasificarse en tres tipos: 1)carcinógenos químicos, como las aflatoxinas, las nitrosaminas y muchos hidrocarburos policíclicos, 2)carcinógenos físicos, como los rayos X, luz ultravioleta y ciertos materiales inertes, y 3)virus oncogénicos, como el HTLV (human T-lymphoma virus) en el



hombre y el de Gross, el de Moloney, etc., en el ratón (6, 124, 158). Gracias al estudio de virus productores de tumores se ha podido detectar en varios casos el gen responsable de la transformación maligna, u oncogen, e incluso la proteína transformante que codifica (15). Se descubrió que dichos oncogenes hallados en el genoma de retrovirus oncogénicos (v-onc), tenían su homólogo virtualmente idéntico en células eucarióticas cancerosas y hasta en células normales (c-onc) (191). Durante algún tiempo se creyó que los c-onc de las células malignas provenían de los que poseían los retrovirus oncogénicos. Hoy, sin embargo, fundamentalmente por el hallazgo de c-onc en células normales, se considera que estos oncogenes se habrían conservado durante la evolución de los vertebrados y que serían el origen ancestral de los v-onc (15, 158, 191). Que los c-onc de las células eucarióticas normales funcionan, aunque quizás en forma cualitativa o cuantitativamente diferente que en las células neoplásicas, no hay duda, lo que se desconoce aun es cuál sería la función que cumplen normalmente y que, aparentemente, sería esencial para la vida , como se desprende de su existencia en distintas especies animales y su postulada conservación a traves de la evolución (158).

Los resultados obtenidos en el terreno de la virología molecular y de los oncogenes han llevado a sugerir una teoría unificada del cáncer similar a la propuesta inicialmente por Huebner y Todaro en 1969 (185), según la cual todas las causas

del cáncer (como carcinógenos químicos, físicos o virales) tendrían como causa inmediata común la activación anormal o la mutación, que puede ser sólo de un nucleótido, de alguno de los oncogenes celulares que provocarían la transformación maligna (158, 191).

Mucho se ha logrado en el terreno de la prevención del cáncer gracias a algunos métodos de diagnóstico precoz y evitando factores ambientales etiológicamente asociados a esta enfermedad. Mucho puede llegar a obtenerse a través del estudio de los oncogenes e investigando de qué modo ellos pueden dejar de expresarse para no llevar a la transformación celular. Pero mientras tanto el problema del cáncer sigue existiendo: se dice que las 2/3 partes de los pacientes con esa patología fallecen, la mayoría de las veces, como consecuencia de sus metástasis.

## II. METASTASIS

### 1. Cuando la célula cancerosa emigra

Si los cánceres primarios se detectasen lo suficientemente temprano no cabe duda que podrían ser perfectamente erradicados por medio de la cirugía. Es conocida la frase del oncólogo

cirujano: "los cánceres podrían curarse con un bisturí si sólo no se diseminaran" (109).

Como mencione anteriormente, las neoplasias malignas se diferencian de las benignas, entre otras cosas, por el hecho de que sus células no permanecen en el tejido de origen. Algunas células que conforman el tumor maligno primario tienden a infiltrar tejidos vecinos del huésped (proceso conocido como invasión) y a veces llegan a desprenderse de la masa tumoral inicial y a "emigrar" a otros sitios anatómicamente alejados estableciendo tumores secundarios. Estas colonias que aparecen a distancia son las metástasis; cabe aclarar que algunos autores utilizan este término para designar el proceso que lleva al establecimiento de los tumores secundarios o aun la transmisión de gérmenes patógenos de un sitio a otro del organismo (38, 60).

Para llegar a formar metástasis, células del tumor primario deben remontar la "cascada metastásica", que arbitrariamente se divide en una serie de eventos correlativos unos de otros (130, 145, 199): 1)infiltración de tejidos del huésped adyacentes al tumor primario, 2)penetración en cavidades y vasos del organismo, 3)desprendimiento y transporte, 4)reinvasión del tejido del huésped en el cual se formarán metástasis y 5)alteración del nuevo tejido, vascularización y crecimiento del tumor secundario. Durante el primer paso células, o grupos de células que se desprenden del tumor primario, o que conservan

continuidad con él, invaden localmente los tejidos adyacentes del huésped; aun no se sabe con exactitud de qué manera ocurre esto. Una de las teorías postula que el aumento de presión que se generaría en el tejido tumoral por la activa proliferación neoplásica, podría permitir la infiltración en el tejido adyacente a lo largo de líneas de menor resistencia (40). Sin embargo, experimentos en los que células tumorales fueron agregadas a tejidos en cultivo, han mostrado que la infiltración ocurre aún en ausencia de presión mecánica (39). También se ha dicho que la movilidad de la célula tumoral podría ser responsable de su poder invasivo, pero hasta ahora no se ha hallado correlación entre su movilidad "in vitro" y su poder metastático "in vivo" (190). Si bien el pretratamiento de células tumorales con el objeto de desorganizar su citoesqueleto, y por ende su movilidad, produjo alteraciones en el comportamiento metastático "in vivo" de dichas células (90), queda por demostrar si ese efecto se debe a la causa postulada o a otros parámetros también afectados por el tratamiento.

Al observarse elevadas concentraciones de enzimas degradadoras en tejido canceroso respecto del tejido normal o tumoral benigno (132), se pensó que ellas podrían ser responsables de la conducta invasora de las células neoplásicas a través de la degradación enzimática de la matriz extracelular de su tejido y el del estroma tisular del huésped. Se ha encontrado correlación entre el nivel de ciertas enzimas

degradadoras, como colagenasas (132) y la catepsina B (121) (que además puede activar la colagenasa latente o a procolagenasas que activan colagenasas), y la capacidad invasora en varios sistemas tumorales humanos y animales. Probablemente la invasión de tejidos del huésped por parte de las células malignas no dependa de ninguno de los mecanismos planteados en forma exclusiva, sino de una combinación de los procesos mecánicos, de motilidad celular, enzimáticos, y quizás otros, variando de acuerdo al sistema tumoral analizado. Ultimamente se ha propuesto una hipótesis de tres etapas para explicar la invasión tumoral (121). En la primera de ellas, las células tumorales se adherirían a la matriz extracelular subyacente a través de receptores que poseerían en su membrana plasmática para glicoproteínas específicas de la matriz como la laminina o la fibronectina. Luego, las células secretarían, o harían secretar al huésped, enzimas hidrolíticas que degradarían localmente la matriz (colagenasas, por ejemplo) y que podrían actuar gracias a desbalances que producirían sobre inhibidores proteicos naturales presentes en suero y en la matriz misma. Finalmente, la célula tumoral se movería en la región de la matriz modificada por la proteólisis. La invasión total de la matriz extracelular se produciría por la repetición cíclica de estos tres eventos.

Una vez producida la invasión tumoral inicial, las células neoplásicas exitosas en este evento se trasladarán a otras

partes del organismo, para lo cual deben penetrar en nuevos compartimientos como vasos linfáticos, sanguíneos, cavidades celómicas, epiteliales y estructuras canaliculares. En general se dice que de las vías de diseminación tumoral la más común es la linfática. Hoy se sabe que los capilares linfáticos carecen de una membrana basal formada por colágeno tipo IV y laminina (11), de tal manera que las células tumorales podrían pasar en forma pasiva por fenestraciones endoteliales que dichos capilares poseen (134). En la diseminación hemática, en cambio, la célula cancerosa debe atravesar la membrana basal subendotelial para poder penetrar en los capilares sanguíneos o en vénulas (proceso conocido como intravasación), para lo cual utilizaría mecanismos similares a los que emplearía el tumor para invadir la matriz extracelular, y en especial los carcinomas para atravesar la membrana basal (que es un tipo de matriz extracelular). Las células neoplásicas también podrían entrar en el torrente sanguíneo desde el sistema linfático a través de conexiones que existen con él. Otra forma sería por vasos sanguíneos intratumorales y regiones necróticas del tumor o con reducida oxigenación, que pueden poseer alteraciones estructurales en los vasos neoformados o áreas de hemorragias que facilitarían la diseminación sin necesitar una etapa invasora previa (60, 145, 180). En la clínica frecuentemente se afirma que mientras los carcinomas suelen diseminarse por vía linfática, los sarcomas lo hacen por vía hemática. Es importante aclarar que, como se dijo anteriormente, ambos sistemas son

inseparables y actualmente es más correcto hablar de diseminación linfohemática (60), en vez de dar una explicación sobresimplificada del proceso. Si bien menos frecuentes, existen diseminaciones a través de cavidades celómicas o serosas como cavidad peritoneal, pleural o espacio pericárdico; a través de cavidades epiteliales (por ej. carcinomas transferidos por contacto de la pared vaginal al cervix o la pared vaginal opuesta) (145); o por estructuras canaliculares como bronquio y uréter.

Producida la entrada en algunas de las vías de diseminación las células neoplásicas pueden seguir dos caminos. El primero sería crecer en el lugar de penetración y desde allí liberar émbolos tumorales a la circulación. La otra posibilidad, y quizás la mas frecuente, sería el desprendimiento de células tumorales individuales o en grupos a medida que van penetrando en la vía de diseminación metastásica. En algunos sistemas experimentales como el melanoma B16 de raton, se ha podido establecer que sólo sobrevive una de cada mil células tumorales que entra en circulación (49). Esto nos da una idea de lo poco apto que resulta dicho medio para la célula maligna, ya sea por la acción traumática de la turbulencia sanguínea, las deformaciones que debe sufrir en su paso por la microcirculación, por la acción del sistema inmunológico del huésped, u otras causas. Es quizás por ello que es frecuente observar que las células tumorales se unen unas a otras

(agregación homotípica), a células del huésped como plaquetas, linfocitos o restos celulares (agregación heterotípica), o son envueltas por fibrina (70, 130). Se cree que de esta manera la célula neoplásica se protegería de los embates del medio ambiente que atraviesa y tendría más posibilidades de sobrevivir (130), lo cual se vería apoyado por el hecho de que el número de metástasis pulmonares originadas por inóculos endovenosos de células tumorales sería proporcional al tamaño de los émbolos tumorales (51, 120).

Las células neoplásicas que se hallan en circulación son transportadas pasivamente por el flujo sanguíneo o linfático y finalmente se detienen en el lecho capilar del órgano en el cual metastatizarán. Allí las células neoplásicas interactúan con células del endotelio vascular, ya sea a través de conexiones específicas con éstas, o conexiones de tipo mecánicas e inespecíficas que impiden su recirculación por el organismo, y se produce la "implantación". En algunos casos las células tumorales se adhieren a zonas de retracción de las células endoteliales donde la membrana basal subyacente queda expuesta (55). Luego de la implantación en la microcirculación se produce la invasión secundaria, seguramente por un mecanismo similar al que utilizó el tumor para la invasión primaria (55). Otra alternativa sería el crecimiento expansivo dentro del vaso hasta su ruptura (134). La extravasación de las células tumorales y su proliferación en el parénquima del órgano blanco da origen a



pequeñas colonias neoplásicas o micrometástasis. Si bien estas pueden crecer gracias a la proximidad de vasos sanguíneos, llega un momento en que su desarrollo se ve limitado por la ausencia de un aporte sanguíneo que le provea nutrientes y depure sus productos de desecho. La secreción de TAF (factor angiogénico tumoral) por parte de las células neoplásicas permitiría la formación de nuevos vasos (angiogénesis) gracias a la estimulación específica de la proliferación de células endoteliales del huésped (66). Cuando los nódulos metastásicos, que en general tienen un gran parecido histológico con el tumor original, adquieren un determinado tamaño, pueden dar origen a metástasis (55).

El proceso metastásico entonces, depende de una serie de interacciones entre las células cancerosas y las células normales del huésped. Sólo aquellas células neoplásicas que sean capaces de atravesar todas las etapas de dicho proceso podrán dar origen a metástasis, siendo más las células que se quedan a mitad de camino que las que llegan a destino. Surge a partir de ello una pregunta: las células emigrantes que logran sortear la carrera de obstáculos que les impuso el organismo tienen propiedades especiales, o todas las células son iguales y simplemente se trata de una cuestión de azar?.

## 2.No todas las células de un tumor son idénticas

Gran numero de datos experimentales indican que las células cancerosas que componen un tumor son heterogéneas y difieren, entre otras cosas, en cuanto a características metabólicas (13), propiedades antigénicas (148), receptores hormonales (173), cariotipos (171), y susceptibilidad a drogas citotóxicas (84, 93). Es fácil comprender esta heterogeneidad celular en aquellos cánceres de origen multicelular (policlonal) como un reflejo de las características de las distintas células progenitoras (155). Sin embargo, se cree que la mayoría de los tumores espontáneos tendrían un origen clonal (48) y que la heterogeneidad que se observa en ellos en el momento del diagnóstico clínico sería el resultado de la progresión tumoral (55). Este fenómeno de progresión neoplásica fue definido por Foulds(68) para explicar la serie de cambios detectables que van surgiendo en forma irreversible durante el transcurso de la enfermedad y que gradualmente le dan autonomía al tumor respecto del huésped. En relación con esto, Nowell (136) ha planteado que como resultado de la adquisición de variabilidad genética o inestabilidad, y de la presión selectiva ejercida por las respuestas del huésped, surgirían variantes celulares o subpoblaciones con mayores probabilidades de sobrevivir y por consiguiente más malignas. Esta heterogeneidad celular que existe en el tumor primario explicaría también la distinta capacidad invasora y metastásica

de las células que lo componen. Una evidencia directa de esto fue obtenida en 1977 por Fidler y Kripke (61). Brevemente la experiencia fue la siguiente: a partir de un tumor primario subcutáneo de melanoma B16 en el ratón C57 Bl/6J prepararon una suspensión celular e inocularon endovenosamente una alícuota en ratones singeneicos para la obtención de metástasis pulmonares (método conocido como "ensayo de metástasis experimentales"). La otra alícuota fue usada para producir 17 clones celulares que luego fueron inyectados de idéntica manera que en el caso anterior. Transcurrido el tiempo necesario se observó que dentro de cada grupo inoculado con células de un mismo clon el número de metástasis experimentales obtenido era relativamente parejo, pero sin embargo variaba bastante de un grupo a otro. Por lo tanto las células que componían los distintos clones no poseían la misma capacidad metastásica, de tal manera que el tumor primario del cual habían provenído estaba constituido por una población celular heterogénea. Se comprobó que la variabilidad que existía entre los clones no se generaba por la clonación misma, pero quedaba la duda de si la heterogeneidad metastásica hallada en el melanoma B16 no era un artefacto resultante del prolongado cultivo "in vitro" o del continuo trasplante subcutáneo seriado que se realiza en animales singeneicos para mantener la línea tumoral. Esto quedó descartado al obtenerse resultados comparables a los anteriores con el uso de diversos tumores murinos de origen reciente, y por consiguiente con mucho menor número de pasajes "in vitro" o "in vivo" (56, 59, 116).

Estos estudios mostraron que existen subpoblaciones de células tumorales con gran capacidad para formar metástasis y que entonces se trataría de un proceso altamente selectivo y no azaroso. Si bien los nódulos metastásicos suelen ser homogéneos ello no significa que sólo puedan originarse a partir de dichas subpoblaciones, de hecho se han hallado células con capacidad metastásica baja, mediana y alta al analizar la composición celular de metástasis individuales (143, 146). Se podría postular que las células tumorales con baja o mediana capacidad metastatizante podrían llegar al órgano blanco, y producir metástasis, si por azar hubieran evitado todas las trabas que en distintas etapas le va poniendo el huésped.

No todos los investigadores están de acuerdo con la teoría selectiva. Los grupos de Mantovani (71) y de Alexander (41) trabajaron con diversos tumores experimentales y llegaron a la conclusión de que las metástasis no surgen a partir de subpoblaciones celulares metastásicas sino que surgen a partir de cualquier célula del tumor primario por un mecanismo al azar. Otros investigadores (128, 194) no pudieron aislar células con mayor potencial metastásico de algunas líneas tumorales malignas. Estos resultados contrapuestos a los partidarios de la teoría selectiva, podrían deberse a diferencias en las condiciones experimentales y en la heterogeneidad u homogeneidad de los tumores parentales usados por unos u otros grupos de

investigadores (146, 174, 182).

Si bien unas pocas células tumorales pueden originar metástasis por un mecanismo al azar, actualmente se considera que ello ocurre fundamentalmente a través de un proceso de tipo selectivo. La obtención de líneas tumorales con mayor capacidad metastatizante a partir de un tumor parental sustenta aun más la teoría selectiva. Diversos tumores como el B16 usado por Fidler (50), o incluso el M3 que se usará para el desarrollo de esta tesis (27) (Ver material y métodos), han sido seleccionados "in vivo" y se han obtenido variantes con mayor poder metastásico, B16-F10 y MM3 respectivamente. Para ello las células del tumor original se inocularon por vía subcutánea, intramuscular o endovenosa, y una vez obtenidas las metástasis éstas fueron usadas para inocularlas por las mismas vías en forma seriada, produciéndose de esta manera un enriquecimiento selectivo secuencial. Otros autores han logrado obtener variantes metastásicas a través de la selección de células con expresión aumentada de fenotipos considerados importantes en alguna de las etapas del proceso metastásico, como resistencia a determinadas respuestas inmunes (57, 88), resistencia a lectinas (108), producción aumentada de enzimas degradadoras (122), adhesión aumentada a membrana basal subendotelial (131), invasión tisular aumentada (144). Por último, como se ha visto más arriba, también se obtienen líneas con diferente potencial metastásico a través de la clonación de poblaciones celulares de tumores heterogéneos (61).

### 3. Cada tipo de tumor tiene un blanco prefijado.

En base a observaciones clínicas y experimentales podría decirse, en general, que cada tumor primario tiene un órgano preferencial específico para establecer sus metástasis (130, 180). Los carcinomas mamarios suelen metastatizar en cerebro y pulmones, los cánceres de pulmón en cerebro y glándulas suprarrenales, y el carcinoma prostático en hueso. Se han planteado dos hipótesis para explicar este fenómeno de patrones metastásicos selectivos. Según Ewing (47) las metástasis en determinados sitios del organismo se producen por factores anatómicos y hemodinámicos de los vasos ; Paget (138), en cambio, propuso la "teoría de la semilla y el suelo" por la que el microambiente de ciertos órganos ("el suelo") permite la implantación, supervivencia y desarrollo de determinadas células tumorales ("la semilla"). Si bien puede existir un atrapamiento de tipo inespecífico en la microcirculación como resultado de factores mecánicos, la mayoría de las observaciones realizadas en sistemas experimentales apoyan la hipótesis de Paget. Así, por ejemplo, a través de la inoculación endovenosa en la vena de la cola o en el ventrículo izquierdo de células del melanoma B16 marcadas radioactivamente, se ha podido ver que la distribución metastásica en el órgano blanco no está determinada por el primer lecho vascular que las células hallan en su trayecto (62). Esto se ha visto sustentado por experimentos en los que

células tumorales que normalmente metastatizan en pulmón, luego de inoculadas endovenosamente, colonizaron trozos de pulmones implantados subcutáneamente pero no implantes ectópicos de otros órganos (91, 112); también se ha llegado a resultados similares utilizando animales con uniones parabióticas (63).

La membrana plasmática se hallaría directamente involucrada en la detención de la célula cancerosa en un lugar determinado. A través de modificaciones enzimáticas de la superficie celular se ha logrado alterar la localización y extensión de sus metástasis experimentales (83, 170). Por otro lado, se ha visto que la inhibición de la síntesis de glicoproteínas de membrana por sustancias como la tunicamicina disminuye el número de metástasis experimentales en ciertos modelos (101). Se cree que todas las células llevan en su superficie glicoconjugados que servirían de señales moleculares de reconocimiento entre las células de un mismo tejido y a veces, entre diversos tipos de tejidos (163). En relación con esto hay quienes proponen una hipótesis de "llave y cerradura" por la cual la célula tumoral metastásica poseería en su membrana moléculas glicosiladas que se asociarían específicamente con otras ubicadas en las células del órgano blanco (100). Otra línea de evidencia que sustenta el rol de las membranas plasmáticas en las metástasis surgió a partir de experimentos de fusión de vesículas membranosas de variantes altamente metastásicas a la superficie de células tumorales emparentadas pero con poca tendencia a dar metástasis.

Las células tumorales así modificadas mostraron una capacidad aumentada para colonizar el órgano blanco y formar metástasis experimentales (147). De lo expuesto puede desprenderse que hay propiedades intrínsecas a la célula cancerosa que son esenciales para el establecimiento de las metástasis, pero además actúan factores externos a la célula neoplásica que dependen del huésped.

#### 4. Cómo puede el huésped enfrentar a las metástasis

Durante el transcurso del proceso metastásico el huésped responde a las células tumorales por mecanismos de tipo immune y no immune, intentando destruirlas en algunos casos o colaborando con ellas en otros.

Algunos tejidos del huésped, como el conectivo, poseen inhibidores de las proteasas que liberan las células neoplásicas (44). Por otro lado, se ha visto que la aparición de una capa de estroma o capsula fibroblástica rodeando ciertos tumores, quizás impediría la expresión de su máximo potencial maligno, gracias a la liberación de factores inhibidores de las colagenasas (34). Además de estas respuestas se han descrito otras, también no immune, pero que favorecen el crecimiento tumoral o su desarrollo metastásico. Las plaquetas, por ejemplo, a veces colaboran en la diseminación cancerosa, favoreciendo la



agregación de las células neoplásicas (70), o en su multiplicación al liberar factores estimulantes del crecimiento celular (69, 134). Otros autores han visto, en cierto sistema experimental, que es esencial la presencia de determinadas células normales no inmunes junto al tumor para que este pueda desarrollarse y metastatizar (172). Otro ejemplo más de respuestas no inmunes durante el crecimiento de lesiones primarias y metastásicas es la neovascularización o angiogénesis. Si bien ella es inducida por la secreción de TAF por parte del tumor, es el huésped el que responde a través de la migración y proliferación de sus células endoteliales (66). Por otro lado, la angiogénesis también actúa en condiciones fisiológicas normales como en heridas e inflamación, y factores similares al TAF son secretados por linfocitos, macrófagos y otros tejidos normales (32, 72, 141, 169). En base a ello hay quienes creen que el TAF podría ser visto por el huésped como moléculas normales y por lo tanto evocar respuestas tisulares normales (132).

Segun diversos autores, la respuesta inmune del huésped sería relevante en el desarrollo metastásico de diversos tumores (3, 54, 86). Durante muchos años la inmunología tumoral ha ocupado un primer plano en la investigación oncológica, y de ello fue responsable en gran medida la teoría clásica de la vigilancia inmunológica postulada por Burnet (21). En ella se decía que constantemente surgían en el huésped células malignas

que eran destruidas eficientemente por linfocitos T; cuando este sistema fallaba entonces se desarrollaba un cáncer. Esta teoría que estuvo en vigencia durante tantos años debió ser modificada, dado que muchos de sus postulados no se habían cumplido al evaluarse experimentalmente (178). Hoy en día son pocos sus seguidores y de ser cierta la teoría se cree que obraría a través de mecanismos inmunológicos inespecíficos como las células natural Killer (NK) o los macrófagos (1, 156, 177, 178). Otro hecho importante en la inmunología tumoral ha sido el hallazgo, a través de cuidadosos estudios, de que la mayoría de los tumores animales de origen espontáneo no muestran inmunogenicidad alguna, al menos empleando las técnicas clásicas de inmunización antitumoral (45, 98). Si consideramos a las neoplasias humanas como de origen espontáneo podríamos suponer que ellas raramente muestran inmunogenicidad. A pesar de que una no demostrable inmunogenicidad por pruebas de laboratorio, quizás no demasiado sensibles, no significa que los tumores en cuestión no posean antigenicidad o no puedan ser inmunogénicos bajo ciertas condiciones, los trabajos anteriores nuevamente hicieron tambalear a la inmunología tumoral.

Actualmente es imposible generalizar sobre el papel que juega la inmunidad del huésped en los procesos malignos. En algunos sistemas tumorales la supresión de las respuestas inmunes lleva a un aumento de las metástasis experimentales (las que se producen por inoculación endovenosa de las células

tumorales en ausencia del tumor primario) o espontáneas (las que se producen a partir del tumor primario), mientras que en otros mediante el mismo procedimiento se obtiene una disminución o anulación de las metástasis, o incluso no hay efecto alguno (134). Para explicar este tipo de contradicciones, Prehn (149) postuló su "teoría de la inhibición-estimulación inmune" por la cual una respuesta antitumoral débil, como la que ocurriría en los primeros estadios del desarrollo tumoral o en tumores débilmente antigénicos, sería de tipo estimulador; mientras que una fuerte respuesta antitumoral, como la que habría en los últimos estadios del desarrollo tumoral o en tumores fuertemente antigénicos, actuaría inhibiendo el crecimiento neoplásico. Esta teoría fue comprobada mediante experimentos en los que variando el número de linfocitos de ratones portadores de tumores en relación a un número fijo de células neoplásicas se logró inhibir o aumentar el número de metástasis experimentales respecto de los controles. Así, la inoculación endovenosa simultánea de células de melanoma B16 con bajo número de linfocitos resultó en una exacerbación del número de nódulos metastásicos en pulmón, mientras que con muchos más linfocitos el efecto fue inverso (52).

El análisis del desarrollo metastásico espontáneo a partir de distintas sublíneas de un fibrosarcoma inducido por luz ultravioleta, con diferente inmunogenicidad, también ha confirmado la teoría de Prehn. En ese caso se observó que las

células de un fibrosarcoma débilmente inmunogénico crecían y metastatizaban más en huéspedes inmunocompetentes que en huéspedes inmunológicamente deprimidos, mientras que con sublíneas muy inmunogénicas se obtenía una inhibición de su crecimiento y de sus metástasis aun en huéspedes inmunocompetentes (58). Las propiedades antigénicas de las células tumorales del tumor primario y de sus metástasis han mostrado ser diferentes en ciertos tumores inducidos experimentalmente (179), e incluso se han descrito casos en que distintas regiones de un mismo tumor primario varían en su inmunogenicidad (139). En general, se ha visto que los tumores metastásicos son menos inmunogénicos que los no metastásicos, y que ensayos de inmunización realizados con los primeros, exacerban en vez de inhibir las metástasis, coincidiendo nuevamente con Prehn (111); lamentablemente, la mayoría de estos estudios se realizaron con tumores no espontáneos que, como antes se mencionó, serían altamente inmunogénicos y poco reflejarían al caso humano.

Dentro de los mecanismos inmunológicos de tipo específico que se han postulado como capaces de inhibir el crecimiento metastásico se hallan los linfocitos T. Alexander (2) observó un aumento del patrón metastásico de una serie de sarcomas y linfomas inducidos experimentalmente en ratones suprimidos en su función T por distintos métodos. Al no hallar resultados similares con carcinomas implantados en animales tratados de la

misma manera, planteó que el crecimiento de dichos tumores estaría controlado por mecanismos inmunes de otro tipo. Sin embargo, habría que tener en cuenta que todos los sarcomas y linfomas que uso eran inmunogénicos, mientras que los carcinomas eran de baja o casi nula inmunogenicidad; es muy posible, entonces, que los linfocitos T efectores puedan controlar el desarrollo metastásico sólo en tumores inmunogénicos. Esto se vio confirmado por el mismo autor al utilizar dos carcinomas con mayor inmunogenicidad que dieron resultados similares a los obtenidos con los sarcomas y linfomas por él usados (3). Por otro lado, existe la posibilidad de que surjan variantes tumorales resistentes a linfocitos T, como se ha visto en algunos casos (18).

Muchos autores, reconociendo las limitaciones que poseerían los linfocitos T para enfrentar a tumores primarios y sus metástasis, han postulado una "inmunidad natural" como alternativa. Esta representaría la primera línea de defensa que no necesita inducción de una respuesta inmune clásica (timodependiente) y que, por lo tanto, es de tipo inespecífica. Entre sus posibles componentes efectores figuran los anticuerpos naturales, las células NK(natural killer), las NC(natural cytotoxic) y los macrófagos.

En algunos sistemas experimentales se han hallado en suero de animales normales anticuerpos naturales contra células

murinas metastásicas, que podrían actuar por mecanismos de citotoxicidad mediado por complemento o de citostasis de las células tumorales . Esto se ha comprobado con algunos modelos tanto "in vitro" como "in vivo", y además se ha visto que el nivel de dichos anticuerpos sería más bajo en animales portadores de tumor (189). Alternativamente, los anticuerpos naturales podrían opsonizar células tumorales que entonces serían destruidas por mecanismos celulares dependientes de anticuerpo (31). A las células NK se les ha dado una gran importancia en el control de la diseminación metastásica por sus propiedades de poder distinguir entre células tumorales y normales (95). Gorelik y col.(77) vieron que mientras las células del tumor 3-LL primario eran sensibles a la acción de NK, aquellas que provenían de sublíneas aisladas a partir de sus metástasis espontáneas eran más resistentes a dicha acción; además había una importante reducción en el número de metástasis espontáneas cuando las células que conformarían el tumor primario se inoculaban junto con células NK. Las NK serían más efectivas contra células tumorales en circulación (16, 87). Por otro lado se ha visto que el nivel de NK se correlacionaría, en algunos sistemas, con una formación de metástasis disminuida. Así en huéspedes con baja actividad NK -como ratones de la cepa "beige", ratones nude de 3 semanas, ratones tratados con suero anti-asialo GM1, con  $\beta$ -estradiol, o ciclofosfamida- suele observarse una alta incidencia de metástasis espontáneas y experimentales (85, 87, 89, 162, 184); en cambio, aquellos con altos niveles de

actividad NK --nude de 5 a 8 semanas, ratones tratados con poliI:C, o con interferón- en general muestran un potencial metastásico disminuido (20, 85, 87). Diferentes autores han obtenido, por distintos métodos, sublíneas tumorales resistentes a NK; en dichos casos se observó un aumento en el potencial metastásico espontáneo e incluso la aparición de metástasis en ratones nude adultos (76, 88), probando nuevamente la importancia de las células NK en el control de las metástasis, al menos en algunos sistemas.

Los macrófagos también han sido postulados como muy importantes en el control del desarrollo metastásico. Estas células pueden ser activadas y convertirse en tumoricidas por interacción directa con parásitos, microorganismos o componentes de las paredes de sus células, o por mecanismos indirectos que incluyen una linfoquina llamada factor activador macrofágico (MAF), liberada por linfocitos sensibilizados por el antígeno o estimulados por mitógenos (54). Los macrófagos tumoricidas pueden discriminar entre células neoplásicas y no neoplásicas, al menos "in vitro" (54, 106). Durante mucho tiempo se habló de una correlación inversa entre el número de macrófagos infiltrantes en el tumor primario y el potencial metastásico (134), pero la generalización a partir de dichos resultados no era correcta, como luego demostró Talmadge (183) al usar dieciseis líneas tumorales de diferente origen. A pesar de ello, los macrófagos podrían ser realmente efectivos en el control de

las metástasis en circunstancias especiales. Así, el tratamiento de animales con MAF o con muramil dipéptido o MDP (un componente de la pared bacteriana activador de macrófagos) encapsulados en liposomas ha permitido inhibir en gran medida la formación de metástasis espontáneas (54).

El hecho de que existan tumores resistentes a la acción de linfocitos T (10) y de NK (76), condujo a Fidler a postular a los macrófagos como uno de los sistemas mas efectivos capaz de enfrentar el problema que representa la heterogeneidad tumoral en el tratamiento contra el cáncer. Esto último se basa en la imposibilidad de seleccionar variantes tumorales resistentes a la acción de los macrófagos por parte de dicho autor (54). Sin embargo, otros han logrado algunas pocas variantes resistentes (129, 187) y además, se ha visto que no todas las líneas tumorales poseen la misma sensibilidad a los macrófagos: la supresión "in vivo" de su función ha aumentado el potencial maligno de una línea parental poco metastásica pero no ha afectado a sublíneas altamente metastásicas (106).

Por último, es interesante mencionar la existencia de respuestas inmunes supresoras que podrían contrarrestar a las efectoras antes mencionadas, y que por lo tanto favorecerían el desarrollo metastásico. A modo de ejemplo pueden citarse células T supresoras que suprimirían a T efectoras, a linfocitos B o a macrófagos citotóxicos; y macrófagos supresores que podrían



suprimir a células T citotóxicas o a células NK (133, 106).

##### 5. El tumor primario actua a favor o en contra de las metástasis

Es obvio que el tumor primario es indispensable para que se establezcan las metástasis espontáneas, pero también es el mismo tumor primario el que en ciertas circunstancias "pone trabas" en el crecimiento de tumores secundarios. Cómo se entiende esta controversia?.

Ya a comienzos del siglo se describió un fenómeno, hoy conocido como "inmunidad concomitante", por el cual un individuo portador de un tumor resiste un implante secundario de dicho tumor en un sitio anatómicamente alejado (12, 43). Para explicar este fenómeno se han propuesto tres teorías. Ehrlich en su teoría de la atrepsis decía que los nutrientes esenciales para el crecimiento neoplásico eran consumidos por el tumor primario, lo que impedía el desarrollo de un implante secundario (43). La segunda teoría dice que el tumor primario genera en el huésped una respuesta inmunológica que, si bien no es lo suficientemente fuerte para inhibirlo, si lo es para controlar el desarrollo de implantes secundarios relativamente pequeños (12). La tercera teoría, propuesta por Gorelik, sugiere que las células del tumor primario producirían o inducirían indirectamente factores

inhibitorios no inmunes que impedirían el crecimiento del segundo inóculo (78).

Con respecto a la teoría de la atrepsis, hemos visto en nuestro laboratorio que inóculos tumorales secundarios en dosis grandes pueden superar la "inmunidad concomitante" que el primario ejerce frente a inóculos menores (159). Por otro lado, se vio que un fibrosarcoma primario disminuye su "inmunidad concomitante" al adquirir un gran tamaño, y por lo tanto consumir más "nutrientes esenciales" (159). Estos dos hechos no sustentarían la primera teoría.

Por otro lado, la segunda teoría se apoya sobre experimentos realizados con tumores probadamente inmunogénicos (36, 135, 188). Pero, en el laboratorio de Gorelik (75) y en el nuestro (159), hemos observado que el fenómeno también existe en tumores no inmunogénicos, y que no estaría mediado por el sistema inmunológico, razón por la cual denominamos al fenómeno "resistencia concomitante".

Por último, la tercera teoría, que sería la que tendría mayor sustento, explicaría el fenómeno en tumores inmunogénicos y no inmunogénicos. Esta teoría se vería apoyada por el hecho de que en un gran número de trabajos se ha observado que la presencia de un tumor primario inhibe la tasa de crecimiento de implantes secundarios (35, 125, 137).

Es posible que la resistencia concomitante tenga dos mecanismos: uno inmunológico, sólo detectable con tumores inmunogénicos, y otro no inmunológico, que sería común a los tumores inmunogénicos y a los no inmunogénicos (157, 159).

Independientemente de cuál sea la explicación de este fenómeno, es interesante analizar si las metástasis, que pueden considerarse implantes secundarios naturales, también pueden modularse por la presencia del tumor primario. Al respecto se ha observado que la remoción quirúrgica de un tumor murino metastatizante generalmente es seguida por una exacerbación del crecimiento metastásico (73, 164).

## MATERIAL Y METODOS

## Animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo en hembras BALB de alrededor de 3 meses de edad, que provenían del bioterio de la Sección Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina y que se mantenían con pellets Cargill y agua "ad libitum". Los ratones BALB nude y BALB nu/+ provenían del bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica; eran hembras de entre 4 y 5 meses en algunos casos y de entre 7 y 8 semanas en otros. Estos animales, genéticamente timoprivos se hallaban separados de otros animales, en cajas esterilizadas con tapas filtro aislantes estériles y mantenidos con pellets irradiados y agua autoclavada. El manejo de los BALB nude y los BALB nu/+ siempre se realizó bajo flujo laminar.

## Tumores

Se usaron dos adenocarcinomas con diferente capacidad metastatizante en pulmón, ambos suministrados gentilmente por Lucas Colombo, del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo". Uno de ellos, el M3, es un adenocarcinoma mamario surgido espontáneamente en una hembra de la cepa BALB; en la población endocriada original muestra una incidencia metastática espontánea en pulmón del 40 %, con una media de 6 nódulos. El tumor MM3, en cambio, fue obtenido por Colombo luego del

transplante subcutáneo de nódulos de metástasis pulmonares espontáneos de M3 y de 5 pasajes sucesivos por igual vía de las metástasis surgidas en cada nueva etapa (27). Este tumor tiene un 95 % de incidencia metastásica espontánea en pulmón y una media de 30 nódulos, en la población original. Ambos tumores se mantienen en ratones hembras de la cepa BALB de alrededor 3 meses de edad mediante pasaje seriado subcutáneo.

### Evaluación del crecimiento tumoral

El crecimiento de los implantes tumorales subcutáneos fue evaluado a través de la medición con calibre. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula de Attia y Weiss (8):

$$\text{Volumen Tumoral} = 0,4.(a.b^2)$$

donde a y b representan los diámetros mayor y menor respectivamente.

### Suspensiones de células tumorales

Se utilizaron fragmentos tumorales provenientes de regiones no necróticas del tumor primario. Presionando ligeramente con tijera curva se hicieron atravesar una fina malla de acero separada del fondo de la cápsula de Petri por un aro metálico, usándose solución fisiológica (Roux Ocefa, Bs.As.) o medio de

cultivo RPMI (Sigma Chemical Company, USA). La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión de Trypan-blue, en el cual sólo se consideran vivas a las células que no toman el colorante. Las células se contaron en cámara Neubauer.

### Ensayos de inmunización antitumoral

Se utilizaron las siguientes técnicas:

a) Células irradiadas: se irradiaron tanto fragmentos tumorales de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  como suspensiones celulares en solución fisiológica, en cápsulas plásticas de Petri con 9000 rads. Los rayos X se generaron con un aparato de radioterapia Philips RT 100 a 70 Kv, 9,4 mA y filtrados con 1,25 mm Aluminio. La aceleración fue de 941 rad/min con una distancia fuente-blanco de 11,4 cm. Los animales fueron pretratados con dos dosis s.c. de  $10^6$  células tumorales irradiadas o de fragmentos tumorales irradiados 14 y 7 días antes del desafío con células tumorales vivas por vía subcutánea.

b) Implantación y excisión: se extirparon quirúrgicamente tumores subcutáneos en los que se había llegado a un volumen de aproximadamente  $400 \text{ mm}^3$ . El desafío se realizó 2 semanas después en el flanco contralateral con células tumorales vivas en

diferentes dosis.

En los dos casos se calculó el número de células tumorales vivas necesarias para que, inyectadas s.c., exista un 50 % de probabilidad de letalidad (Dosis letal 50 o DL50), de acuerdo al método de Reed y Munch (10).

### Evaluación del crecimiento metastásico

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical cuando moribundos, en el caso de metástasis espontáneas, o a los días indicados en cada tabla, en el de metástasis experimentales. Los pulmones fueron expuestos por medio de cortes laterales de la caja torácica y corte del diafragma, y levantando la parrilla costal. Para no dañar los pulmones se pinzó el corazón y se cortó la región de la tráquea y faringe que se hallaba cerca de los apex, y el esófago cerca de las bases del órgano respiratorio. Los pulmones se lavaron en agua corriente para quitar los restos de sangre y se separaron sus lóbulos en una caja de Petri con solución fisiológica. Allí se examinaron bajo lupa estereoscópica binocular (40 x) y se determinó el número de nódulos metastásicos superficiales y su tamaño mediante papel milimetrado. Los nódulos metastásicos se distinguen de la superficie pulmonar normal por su aspecto perláceo. En todos los casos se conservó una muestra en el



fijador para su posterior análisis histológico y confirmación del diagnóstico.

### Ensayo de metástasis experimentales

Para la inoculación e.v. de células tumorales se prepararon suspensiones celulares en RPMI y se dejaron decantar durante 5 minutos, luego de los cuales se recogió el sobrenadante y se contó en cámara Neubauer, tratándose de utilizar suspensiones libres de émbolos celulares. La viabilidad celular raramente superó el 20 % , a pesar de lo cual la suspensión se utilizó en esas condiciones por considerarse mas representativa del tumor original que otra obtenida por métodos enzimáticos con mayor viabilidad. La inoculación e.v. se realizó a través del seno venoso retroorbital por tratarse de una vía más rápida y accesible que la vena de la cola. El recorrido de la circulación y los resultados obtenidos por ambos métodos no difieren en ninguno de los aspectos analizados, según el estudio de Price y col. (150). Los ratones se inocularon, sin anestesiar, con diferentes dosis en volúmenes de 0,2 ml. El sacrificio se realizó 18 a 20 días después y se evaluó el crecimiento metastásico.

### Análisis histológico

El material para exámen histológico, proveniente del tumor primario o de pulmones, para confirmar metástasis, se fijó en FAM (15 % formaldehido, 5 % ácido acético y 80 % metanol) y se procesó para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes finos de 3-4  $\mu\text{m}$  de grosor y se colorearon con la técnica de hematoxilina-eosina.

### Clearance de carbón coloidal

La medición de la actividad fagocítica de los macrófagos fue evaluada por este método (14, 118). Los animales fueron inoculados e.v. con 16 mg de carbon coloidal ("Biological ink", Koh-I-Noor) por cada 100 g de peso corporal, y a los 3 y 15 minutos fueron sangrados por el seno venoso retroorbital, con el objeto de medir la densidad óptica de su sangre (lisada previamente en 2 ml de agua). El índice fagocítico (K) se calculó mediante la siguiente formula:

$$K = \frac{\log D_{03} - \log D_{015}}{12}$$

12

donde D03 y D015 representan las densidades ópticas a los 3 y 15 minutos respectivamente a 650 nm.

### Medición del nivel de células NK

Se uso como célula blanco del ensayo citotóxico el linfoma YAC-1, una línea tumoral en cultivo sensible a la acción de las células NK, que fue gentilmente suministrado por la Dra. S. Olabuenaga. El método utilizado se basó en el descrito por Herberman (94). Brevemente: las células efectoras (esplenocitos) primero, y las células YAC-1 marcadas con Cr<sup>51</sup> (Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires) luego, se colocaron en tubos plásticos (Polistor Nr.8) en relaciones efectoras: célula blanco 200 a 1, 100 a 1 y 50 a 1, siendo el número de células YAC-1 de 10.000. El volumen final se ajustó a 200 µl con el medio de cultivo (RPMI + 5 % suero fetal bovino). Luego de una centrifugación de 1500 rpm x 2 min., se incubaron a 37 °C durante 4 horas en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. La radioactividad del sobrenadante y del pellet se midió en contador gama (Packard 3320, automático). El porcentaje de lisis se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 \times \frac{\text{cpmS}}{\text{cpmS} + \text{cpmP}}$$

donde cpm significa cuentas por minuto, S= sobrenadante, P= precipitado. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. A cada valor obtenido se le restó el obtenido con el control (células blanco sin células efectoras).

### Inmunofluorescencia

El ensayo usado se basó en el descrito por Forni (67): se realizó una suspensión celular de M3 o MM3 en medio RPMI frío, llevando a una concentración final de  $5 \times 10^5$  células por mililitro. Se incubó 0,5 ml de las suspensiones celulares con igual volumen del antisuero a probar de complementado y diluido veinte veces, durante 30 min. en hielo. Luego de lavado el material a través de tres centrifugaciones sucesivas, el pellet resultante se incubó con 200  $\mu$ l de inmunoglobulinas de conejo anti-IgG de ratón conjugadas con fluoresceína (Dako, Dinamarca) en una dilución 1 en 25 durante 30 min. en frío. El pellet obtenido luego de tres lavados se resuspendió en 150  $\mu$ l de glicerol fosfato tamponado y se colocó una gota sobre un portaobjeto con cubreobjetos. Se observó en microscopio de fluorescencia. Se evaluó la inmunofluorescencia en membrana celular en cada uno de los casos.

### Ensayo de rosetas EA

Este ensayo se usó para la detección de receptores para Fc (117). Se realizaron las suspensiones celulares de los tumores. Por otra parte se mezclaron volúmenes iguales de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 1 % y suero de ratón anti - GRC

decomplementado y diluido 1:700, y se incubaron durante 30 min. a 37 °C en estufa gaseada. Los complejos así obtenidos se lavaron y se llevaron a una concentración tal que se hallasen en una relación eritrocito: célula tumoral 10 a 1. Ambas partes se mezclaron en volúmenes iguales y se incubaron durante 30 min. a 37 °C. Se resuspendió suavemente y se evaluó el porcentaje de rosetas bajo microscopio, considerándose como tales a aquellas células tumorales rodeadas por 3 o más glóbulos rojos de carnero. En cada ensayo se contaron 200 células tumorales en total.

#### Preparación de extracto de material necrótico

Tumores M3 o MM3 en su etapa final, fueron cortados a lo largo de su eje mayor, dejando expuestas de esa manera una gran zona necrótica central y una región no necrótica periférica. Empleando un bisturí se extrajo mediante un suave raspado todo el material necrótico que se desprendía fácilmente. Dicho material fue homogenizado en un macerador manual utilizándose 4 ml de solución fisiológica por cada gramo de material. Se realizaron dos centrifugaciones sucesivas de 15 minutos a 4000 rpm y 8000 rpm, rescatándose siempre el sobrenadante. La solución resultante se fraccionó en tubos y se congeló a (-18)°C. Una alícuota de cada nuevo extracto preparado se usaba para medir el pH y la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford (19).

## Medición de proteínas

Se realizó por el método de Bradford (19) que es muy sensible. Se pipeteó 10  $\mu$ l de diversas diluciones de los extractos cuya concentración proteica quería medirse, y luego se agregó en todos los tubos 1 ml de la solución de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, USA). Luego, entre 2 y 30 minutos después, se midió la absorbancia en luz visible a 595 nm en espectrofotómetro (Metrolab 250 UV-VIS), calculándose la concentración proteica a partir de una curva patrón de albúmina bovina (Sigma, USA) que siempre se uso como control de la técnica.

## Ensayo de desprendimiento celular "in vitro"

Para este análisis se construyó un aparato que por diferencia de tensión superficial facilita el desprendimiento celular en relativamente poco tiempo. Brevemente: posee una base formada por dos aros de acrílico de aproximadamente 2,5 cm de altura adosados a un portaobjeto, y un soporte que sostiene dos hilos de los cuales penden dos anzuelos que se ubican dentro de los dos aros de acrílico. Este aparato fue hecho de tal manera que el soporte puede levantarse y volver a dejarse en su posición de reposo manualmente, de esa forma los anzuelos se

extraen de los aros acrílicos y se vuelven a introducir en ellos las veces que se deseen. Se usaron varios de estos aparatos adosados para la realización de los experimentos.

Para el ensayo de desprendimiento celular se engancharon en los anzuelos fragmentos de tumor de igual tamaño provenientes de regiones no necróticas. En cada uno de los receptáculos formados por los aros acrílicos y la base del portaobjeto se colocó 2,5 ml de la sustancia cuya actividad sobre el desprendimiento quería analizarse, es decir: extracto necrótico de M3, de MM3 o solución fisiológica. El soporte se colocaba de tal manera que los fragmentos tumorales quedaban sumergidos en el líquido. Todo se incubó a 37 °C durante 45 min. Luego, a temperatura ambiente, se levantó y bajó constantemente el soporte durante un minuto, de manera tal que los fragmentos salían y volvían a entrar en el líquido; este procedimiento se realizó cada 2 minutos durante 45 minutos. Finalmente se quitó el soporte del cual pendían los fragmentos tumorales, se extrajo el líquido de cada receptáculo y se calculó en cada caso el número de células desprendidas por mililitro utilizando cámara Neubauer.

### Análisis estadístico

En las muestras que no mostraban una distribución normal se

utilizó el Test no paramétrico U de Mann-Whitney (2 colas); mientras que en aquellas en que sí existía una distribución normal se uso el test de t de student. Se consideraron significativas las diferencias con  $p < 0,05$ .



## RESULTADOS

### Cinética de crecimiento subcutáneo de M3 y MM3

Si bien los tumores M3 y MM3 surgieron espontáneamente en la cepa BALB se consideró importante, antes de realizar cualquier experimento, estudiar las características de ambos carcinomas transplantados en los ratones de nuestro bioterio, dado que es conocido el hecho de que cepas endocriadas de igual origen, pueden diferir en algunos parámetros cuando son aisladas y sometidas a distintas variantes ambientales como temperatura, humedad, alimentación, luz (81). Una de las características a las que se alude fue la cinética de crecimiento de implantes tumorales de M3 o MM3 subcutáneos, mediante inoculaciones de fragmentos de tumor por trócar o de diferentes dosis de suspensiones celulares. Al comparar las curvas de crecimiento de los tumores primarios de M3 y MM3 (Figuras 1 y 2 respectivamente), graficadas en igual escala, se puede observar el crecimiento más rápido de M3 respecto de MM3 que se evidencia ya desde el comienzo; en condiciones similares el tiempo de latencia de detección clínica del tumor es menor en M3. A modo de ejemplo pueden observarse los días 20 y 35 de las dos curvas de inoculación por trócar; mientras en el primer día M3 tenía un volumen de aproximadamente 1500 mm<sup>3</sup>, MM3 sólo medía 400 mm<sup>3</sup>; en forma similar al día 35 de crecimiento, M3 poseía 8400 mm<sup>3</sup> y MM3 unos 1700 mm<sup>3</sup>. Es interesante hacer notar que la sobrevida de los portadores de tumor fue mayor para MM3 que para M3; así, en

FIGURA 1

.....  $10^4$  M3  
 ----  $10^5$  M3  
 — M3 trócar

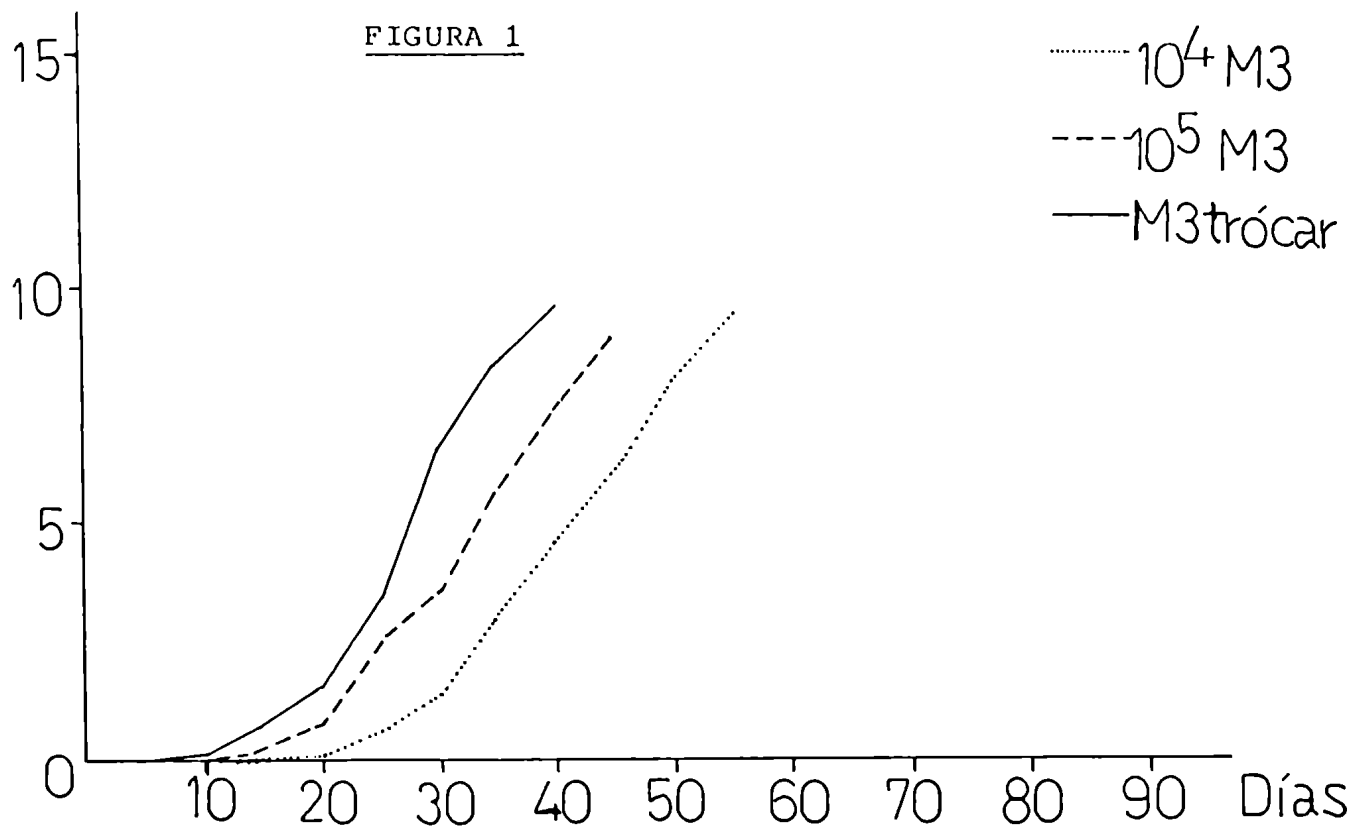
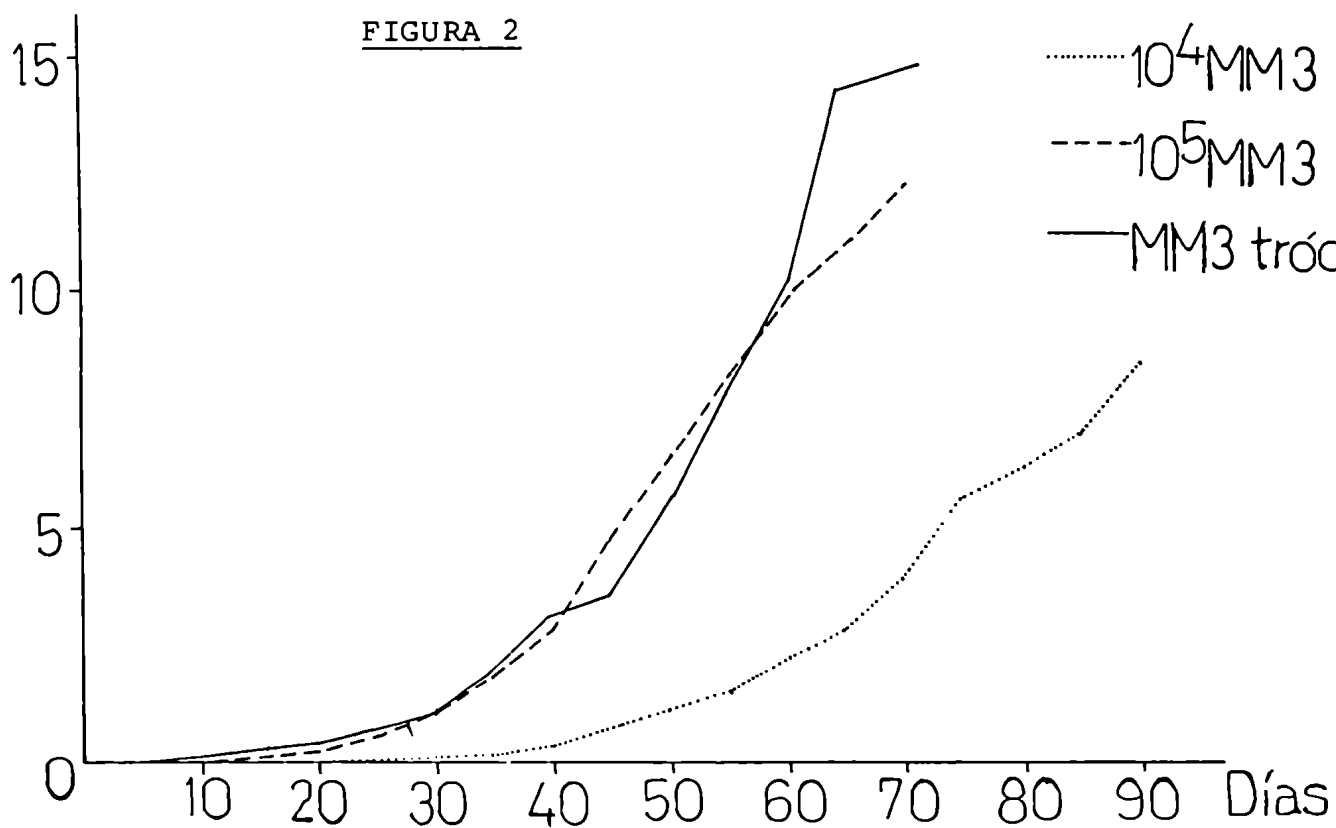


FIGURA 2

.....  $10^4$  MM3  
 ----  $10^5$  MM3  
 — MM3 trócar



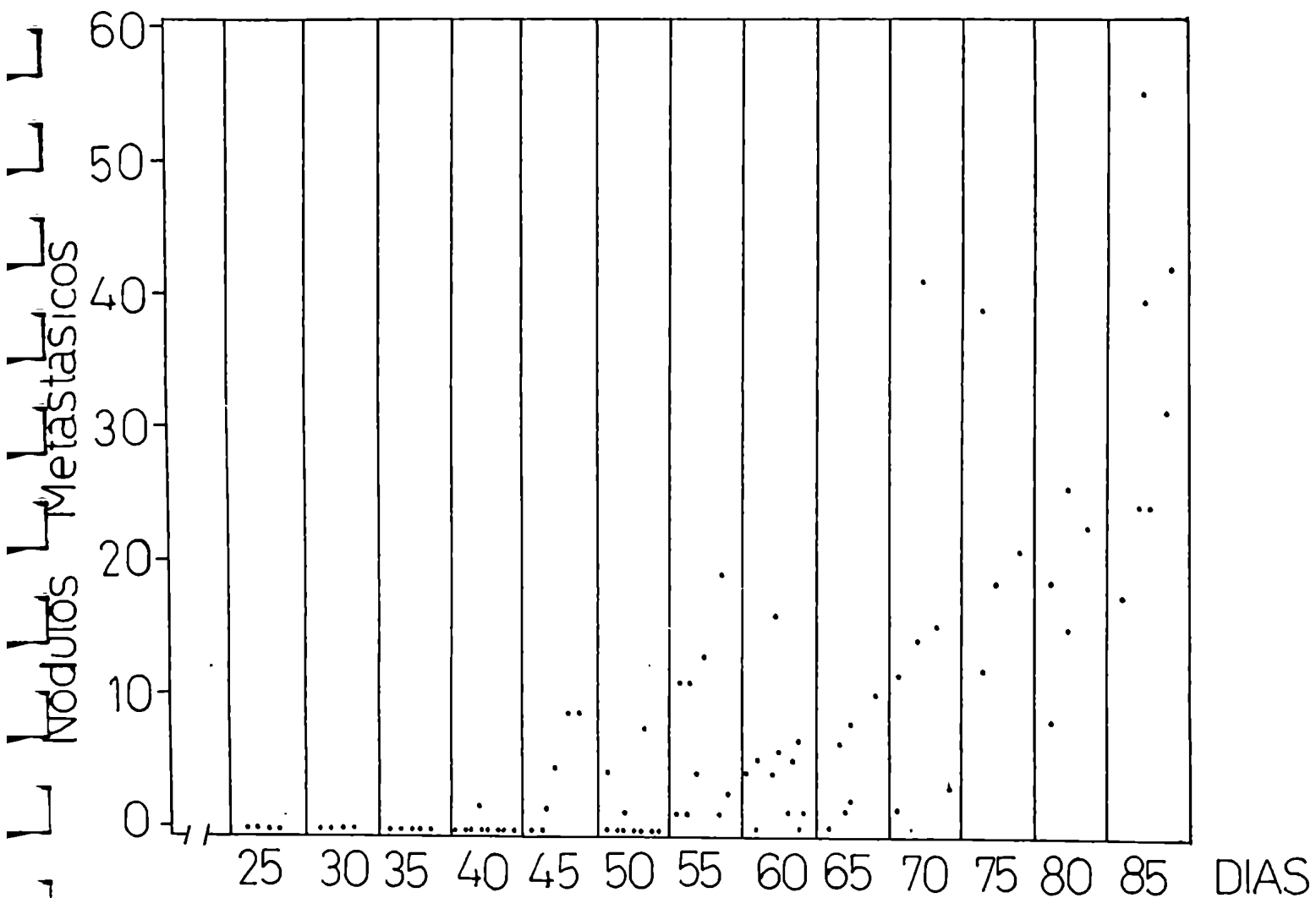
ratones inoculados con MM3 por trócar la sobrevida era alrededor de 75-85 días, mientras que con M3 era de aproximadamente 35-40 días. En las Figuras 1 y 2 cada curva surge de los promedios de los volúmenes tumorales de 6 animales, salvo en el caso de las dosis de  $10^4$  en que la incidencia tumoral no fue del 100 % y sólo se consideraron los casos en que el tumor creció (ver luego DL50 en ensayos de inmunización).

### Cinética de aparición de las metástasis

Otra de las características que se consideró importante conocer de ambos tumores cuando se transplantaban en ratones BALB de nuestro bioterio, era el momento aproximado en que se hacían manifiestas las metástasis pulmonares espontáneas. Para ello ratones BALB se inocularon subcutáneamente con M3 o MM3 y fueron sacrificados en diferentes días del crecimiento tumoral para evaluar el desarrollo metastásico pulmonar. Con respecto a M3, la incidencia metastásica fue nula aún en los últimos días de la evolución neoplásica analizando más de 100 portadores de M3.

Los ratones que poseían MM3 subcutáneo, en cambio, comenzaron a manifestar un desarrollo metastásico a partir del día 45 del crecimiento tumoral subcutáneo, aumentando la incidencia a medida que avanzaban los días (Figura 3). Dado que fueron considerados positivos todos aquellos casos con nódulos metastásicos mayores que 0,5 mm de diámetro, y que no se

FIGURA 3



CINETICA DE APARICION DE LAS METASTASIS DE MM3

tuvo en cuenta la clasificación de acuerdo con los distintos tamaños nodulares, es importante mencionar que conforme avanzaban los días, en general, aparecían nódulos cada vez de mayor diámetro, lo que podría explicar el aparente similar desarrollo metastásico en las últimas etapas si sólo se consideran el número de metástasis.

#### Ensayos de inmunización

Con el objeto de evaluar la inmunogenicidad de los tumores M3 y MM3 se realizaron ensayos clásicos de inmunización tumoral. En todos los casos, 10 a 30 ratones BALB sujetos al tratamiento inmunizante, así como también los controles normales, fueron desafiados con  $10^4$  y  $10^5$  células de M3 o MM3, y en base a los resultados se calculó la DL50. En el ensayo llevado a cabo con MM3 se observó un leve aumento de la DL50 en los grupos experimentales, siendo un poco mayor en los tratados con células irradiadas que en los de implantación y excisión (Tabla 1). En el caso de M3, se obtuvieron resultados similares a los de MM3 (Tabla 1); los obtenidos con el método de implantación y excisión en unos pocos animales y con una sola dosis no fueron

incluidos en la tabla; esos datos fueron reportados por otros autores (115) que no detectaron inmunogenicidad alguna. Como puede verse en la Tabla 1, el cociente entre DL50 de los grupos tratados y de los grupos controles, tanto en M3 como en MM3, alcanza a dar como máximo un valor de alrededor de 4. Esto contrasta en gran medida con los valores de alrededor de 100, que se obtienen con tumores fuertemente inmunogénicos como el fibrosarcoma MC-C inducido por metilcolantreno en BALB, que se ha usado como control positivo (Tabla 1). En base a ello se podría decir que tanto M3 como MM3 serían tumores débilmente inmunogénicos.

TABLA 1

ENSAYOS DE INMUNIZACION ANTITUMORAL EN M3 Y MM3

Ensayo de Inmunización	DL 50		
	M3	MM3	MC-C
Control (sin tratamiento)	$1,4 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
Implantación- Excisión	-	$\ll 10^4 (1,5)^a$	$> 4 \times 10^6 (80)$
Células Irradiadas	$5,5 \times 10^4 (3,9)$	$2,7 \times 10^4 (4,2)$	$> 5 \times 10^6 (100)$

a= Cociente entre DL50 tratado / DL50 control.

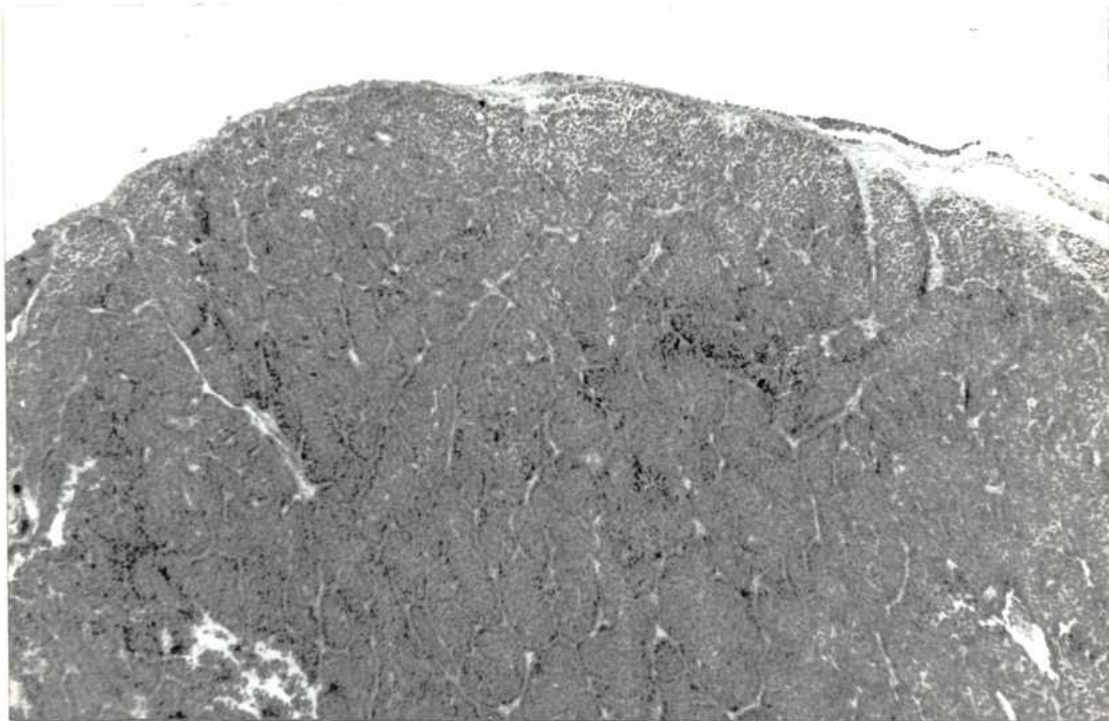


### Análisis histológico

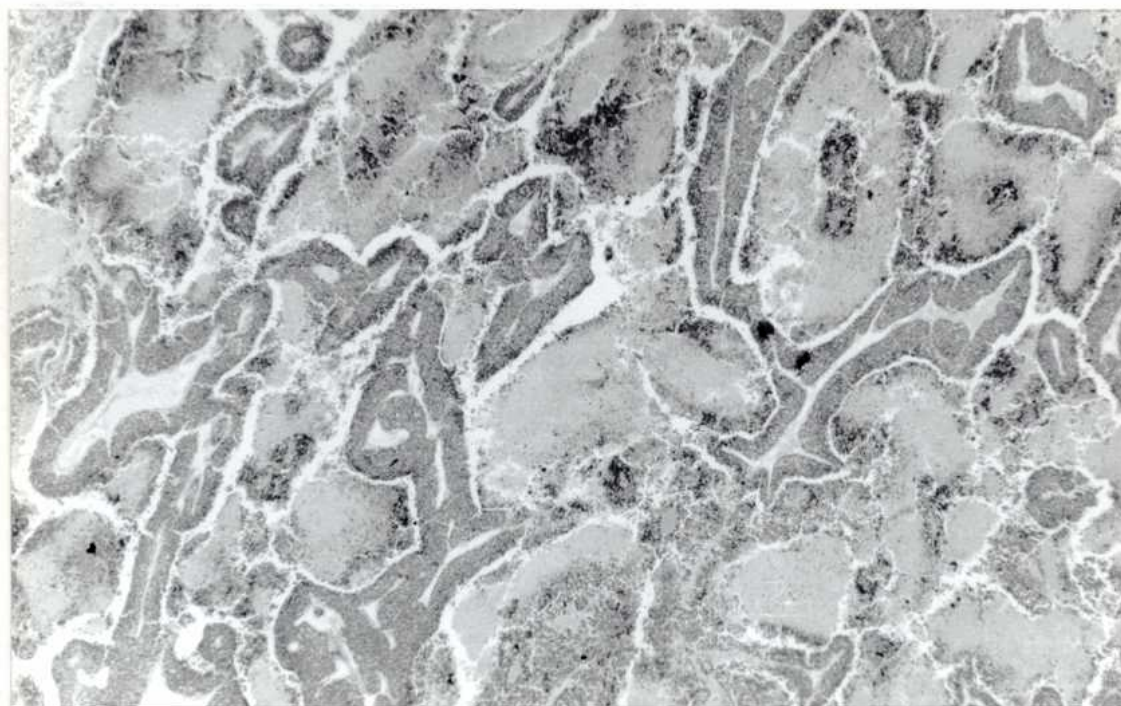
A través del exámen microscópico de los tumores primarios se pudo constatar que M3 y MM3 poseen características de adenocarcinoma mamario. En ambos casos existe un gran área necrótica que en M3 es central y deja una delgada capa de células morfológicamente bien conservadas periféricas (Figura 4), pero que en MM3, si bien es central, se alterna con pequeños "islotos" de células bien conservadas o, como "lenguas", penetra en la muy delgada capa periférica de células aparentemente vivas (Figura 5). Por la disposición de la necrosis, esta no corresponde a la imagen observada en las necrosis de tipo vascular; por otra parte, debido a la ausencia de elementos linfoides del huésped en la necrosis o periférica a ella, tampoco se debería a una respuesta inmunológica. En ninguno de los tumores subcutáneos M3 o MM3, ni en las metástasis pulmonares (Figura 6), examinados histológicamente se observó infiltración intratumoral o peritumoral alguna por células del huésped, que pudiera indicar algún tipo de respuesta por parte del portador del tumor. Para evaluar si la diferente velocidad de crecimiento de M3 y MM3 podía deberse a distintas frecuencias mitóticas, se analizaron en ambos casos 100 campos de áreas bien preservadas (no necróticas) y con similar densidad celular a 1000 X en diferentes pasajes de los tumores, calculándose el número de mitosis por campo (se contaron aquellas células que se

hallaban en metafase, anafase o telofase). Se pudo observar que las mitosis eran más frecuentes en M3 que en MM3 ( $4,5 \pm 1,3$  en M3 y  $3,5 \pm 1,1$  en MM3,  $p \ll 0,001$  según test de t de student). Con respecto a los nódulos metastásicos espontáneos, se observaron tanto superficiales (Figura 7), como intraparenquimatosos (Figura 8). Fue llamativo observar en varias oportunidades, necrosis central en metástasis de MM3 de tamaño pequeño (Figura 7 y 8). Si bien la invasión secundaria en MM3 ocurriría por filtración de las células tumorales a través de la pared de los vasos (Fig. 9, 10, 10A, 10B, 11), no puede descartarse la posibilidad de que se produzca también el crecimiento expansivo dentro del vaso y su ruptura, dado que se observaron grandes émbolos tumorales llenando la luz de vasos ubicados dentro del parénquima pulmonar (Fig. 12). Otra posible vía de diseminación metastásica en MM3 podría ser la canalicular a través de los bronquios, ya que se observaron células tumorales dirigiéndose hacia los bronquios (Fig. 13 y 13A) e invadiéndolos (Fig. 14) desde el parénquima pulmonar.

FIGURA 4

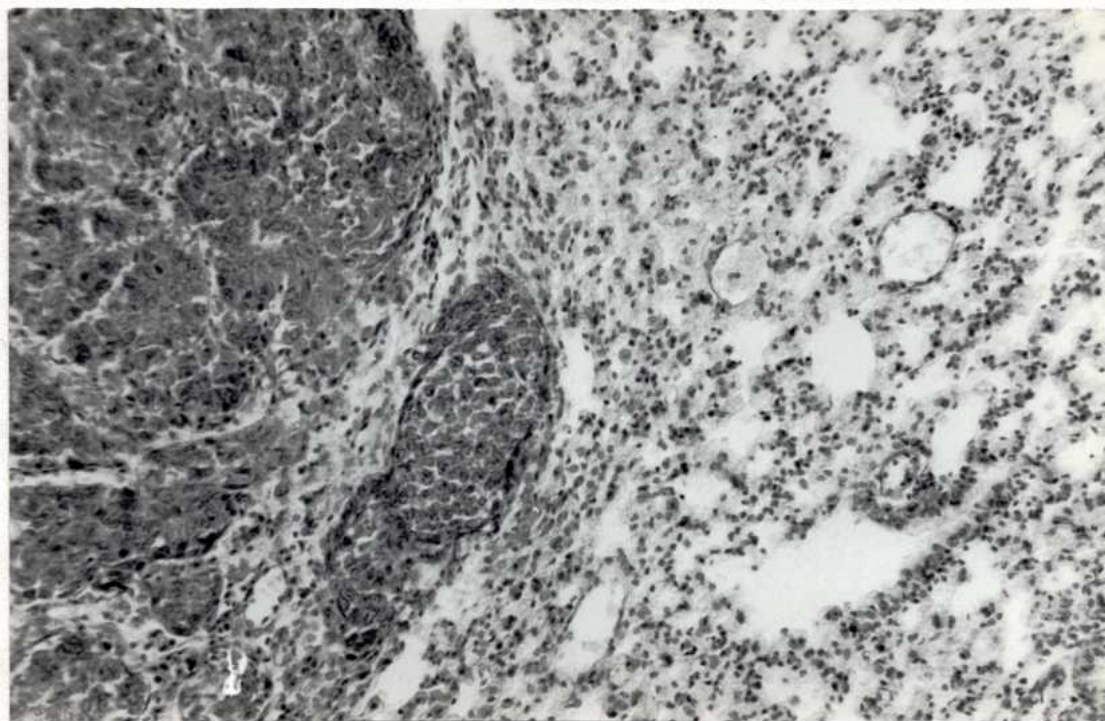


Fotomicrografía a bajo aumento de tumor primario de M3, zona periférica. Obsérvese que se trata de un adenocarcinoma mamario con necrosis central (ángulo inferior izquierdo) (25 X).

FIGURA 5

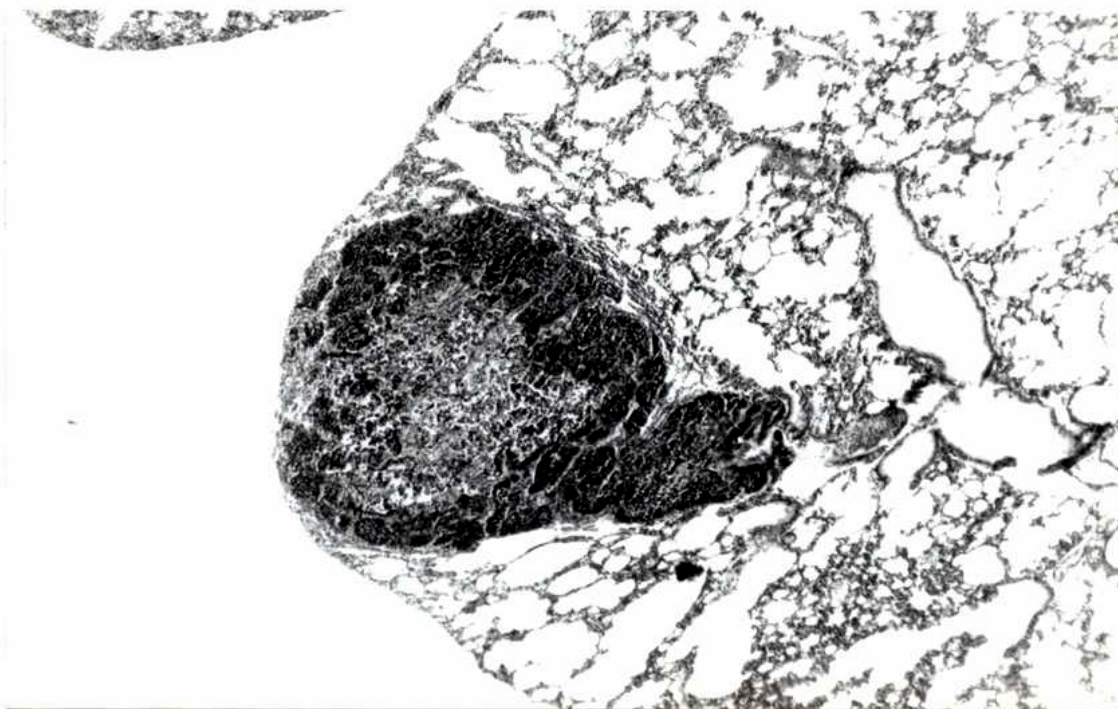
Fotomicrografía a bajo aumento de tumor primario de MM3, mostrando el patrón típico, con alternancia de áreas necróticas y de cordones tumorales conformados por células carcinomatosas de morfología celular similar a las de M3 (25 X).

(derecha), debido a la...

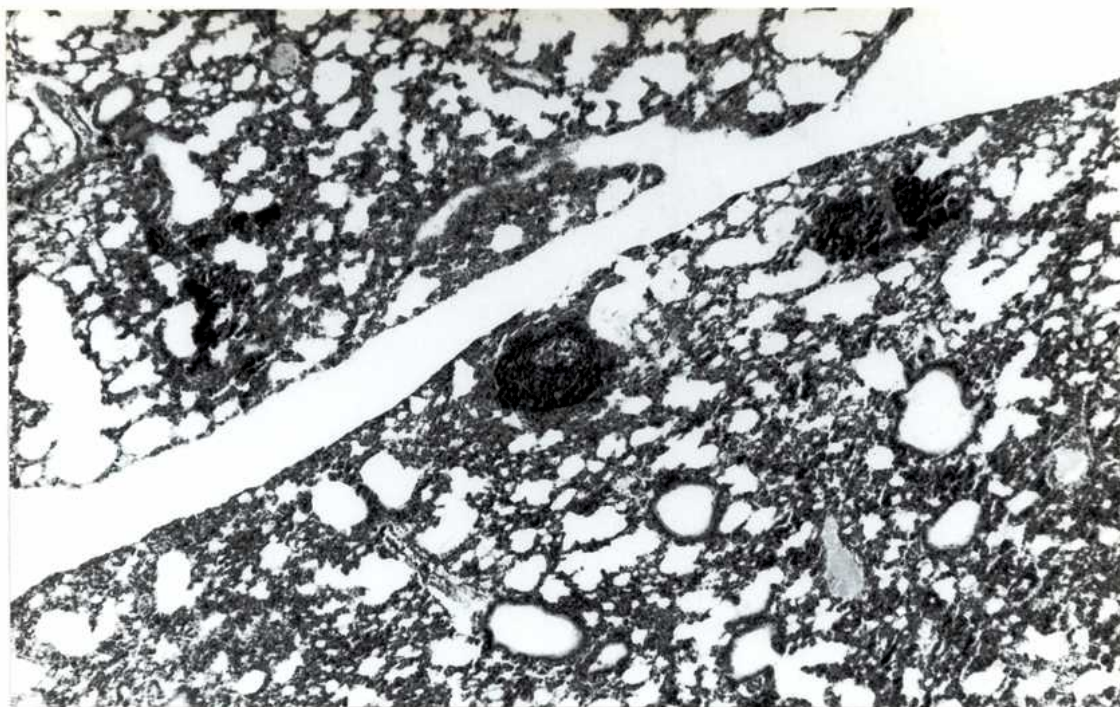
FIGURA 6

Borde de un nódulo metastásico de MM3 intraparenquimatoso en el que se observa la ausencia de elementos linfoides del huésped peritumoralmente o intratumoralmente. Cabe señalar la atelectasia y edema intraalveolar en el parénquima pulmonar (derecha), debido a la compresión mecánica ejercida por los nódulos (100 X).

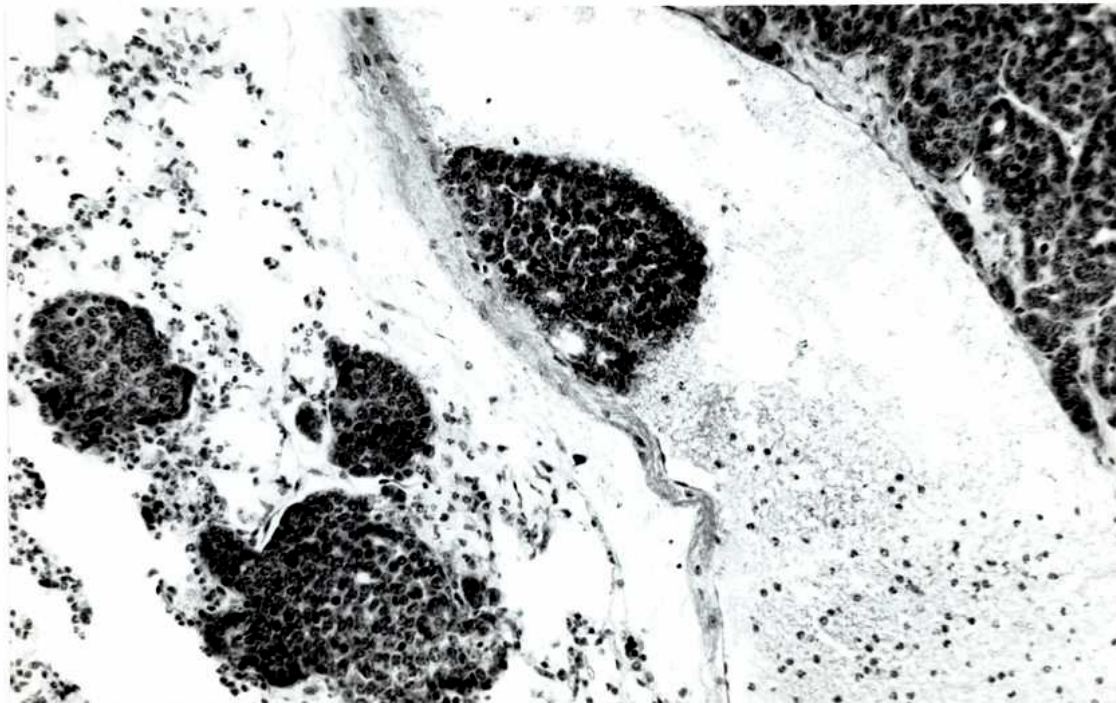
FIGURA 7



Nódulo metastásico de MM3 subpleural. Obsérvese el área necrótica central (100 X).

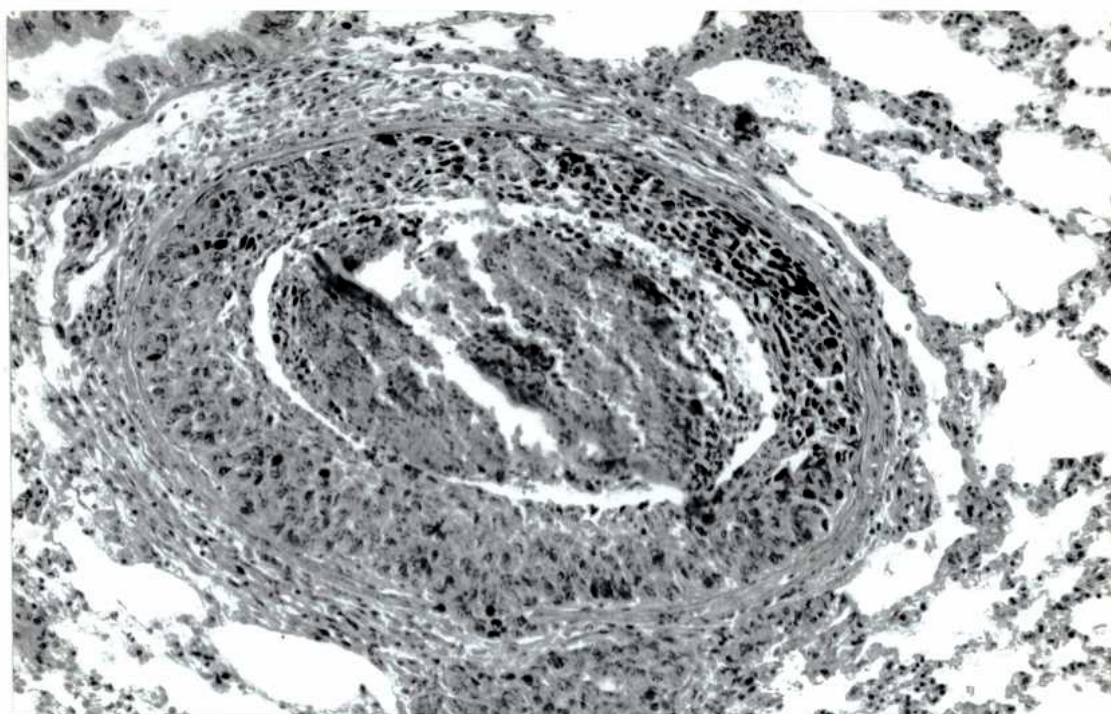
FIGURA 8

Micrometástasis intraparenquimatosa de MM3. Obsérvese que a pesar de su vecindad con un vaso, y su pequeño tamaño, presenta necrosis intranodular (25 X).

FIGURA 9

Etapa previa a la extravasación de MM3: se observa un émbolo tumoral dentro de un vaso dilatado, adherido al endotelio, sin haber roto aún la pared vascular. Obsérvese en ángulo superior derecho un gran nódulo metastásico que llega hasta la pared del vaso, así como en la izquierda tres nódulos más pequeños (100 X).



FIGURA 10

Embolia intravascular de MM3 con necrosis central. En la parte inferior y central del émbolo se observa la etapa inicial de la extravasación, mediante la ruptura de la pared vascular (100 X).

bronquial (150 X)

FIGURA 10 A

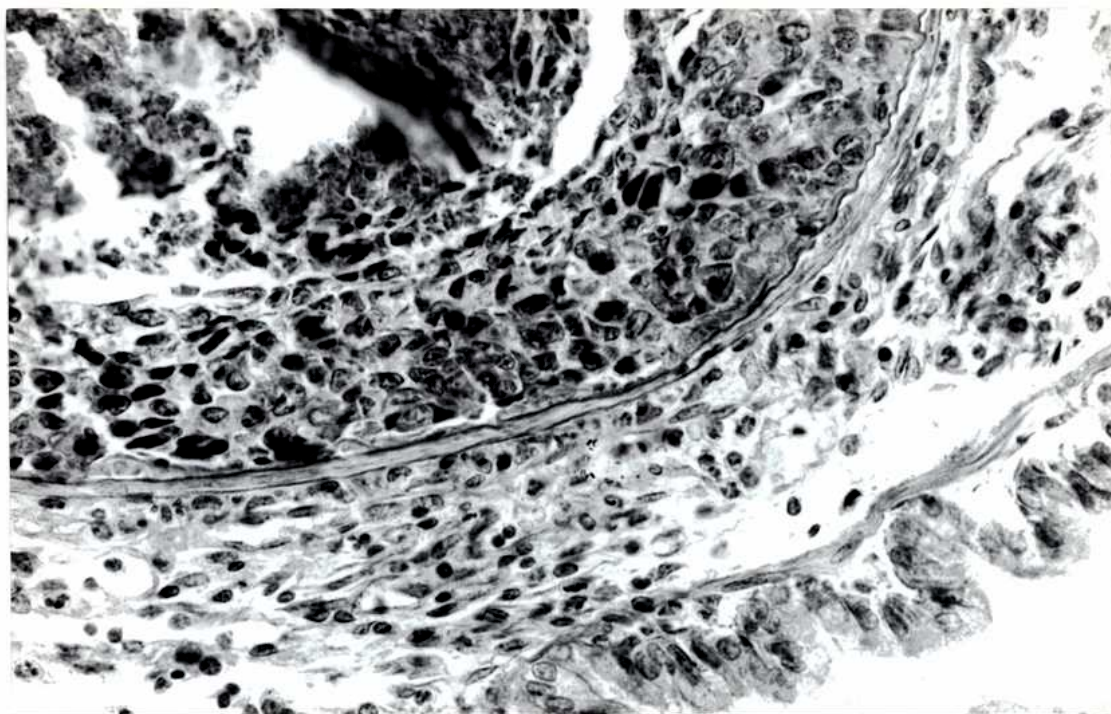


Imagen a mayor aumento del borde inferior derecho del émbolo tumoral de Fig 10. Se observa el límite vascular íntegro, y en el ángulo inferior derecho de la fotografía una estructura bronquial. (250 X).

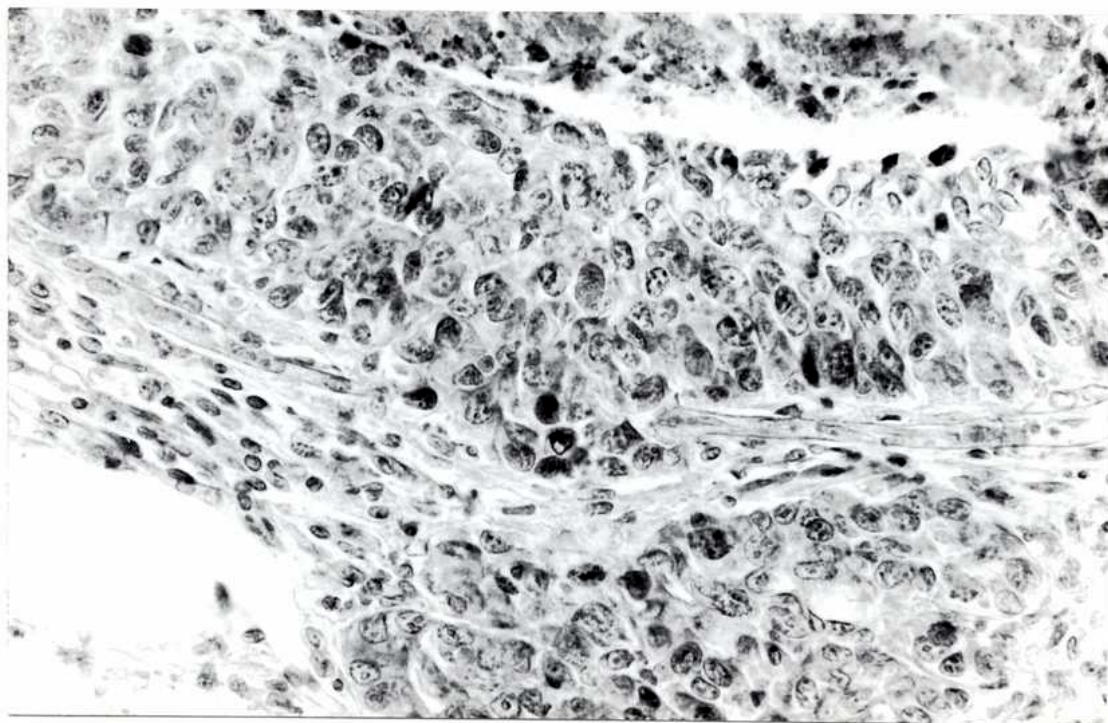
FIGURA 10 B

Imagen a mayor aumento de la Figura 10, en la que se observa la ruptura de la pared vascular, infiltrando parénquima. En la parte inferior de la fotografía se ve un nódulo metastásico ya establecido (250 X).

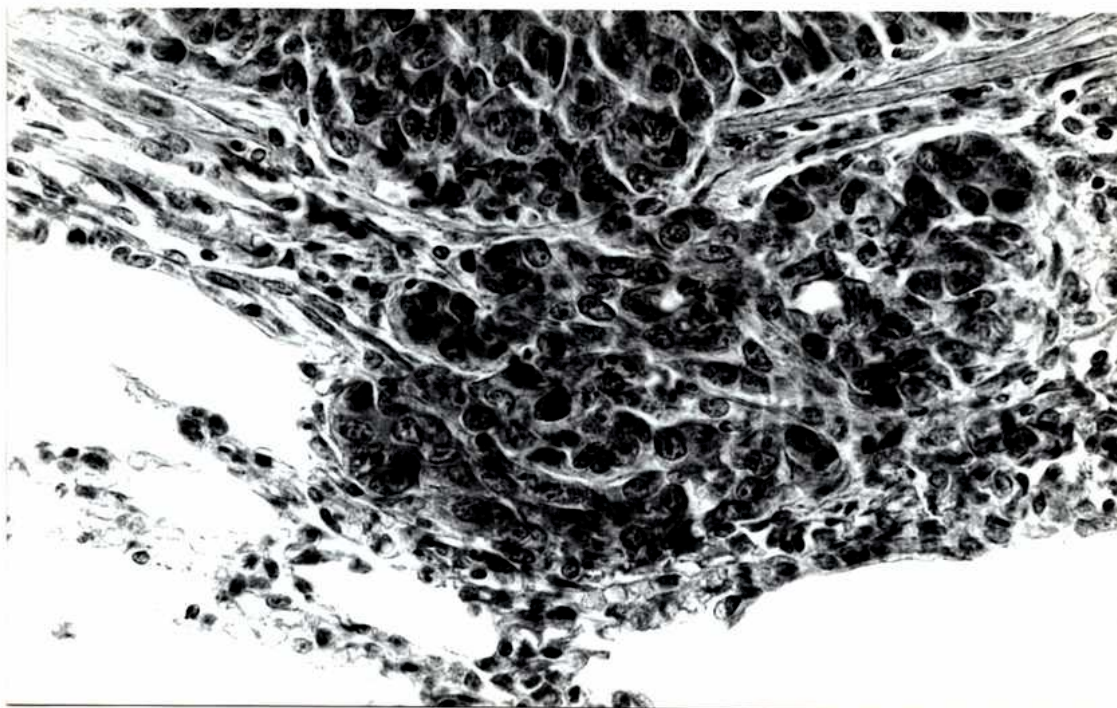
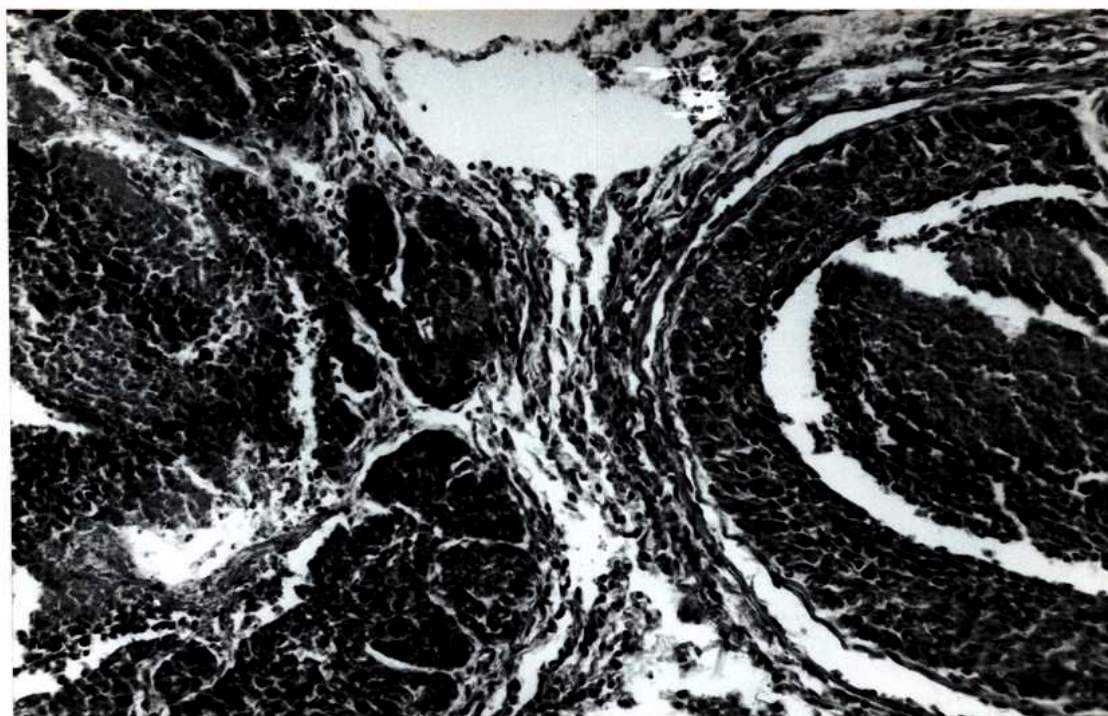
FIGURA 11

Imagen que representaría una etapa un poco mas avanzada de la extravasación. Se observa la ruptura casi total de la pared vascular y el desarrollo de una metástasis intraparenquimatosa de MM3 que aún mantiene continuidad con el émbolo que le da origen (250 X).

FIGURA 12



Embolia intravascular de MM3 y nódulos intraparenquimatosos con áreas necróticas. Obsérvese que el émbolo de células MM3 ocupa la luz del vaso. (100x)

FIGURA 13

Nódulo intraparenquimatoso de MM3 infiltrando una estructura bronquial. Nótese el epitelio de revestimiento del bronquio cuya integridad desaparece en el sitio de penetración de las células MM3. A la izquierda y por debajo del bronquio se observa un vaso sanguíneo (100 X).

FIGURA 13 A

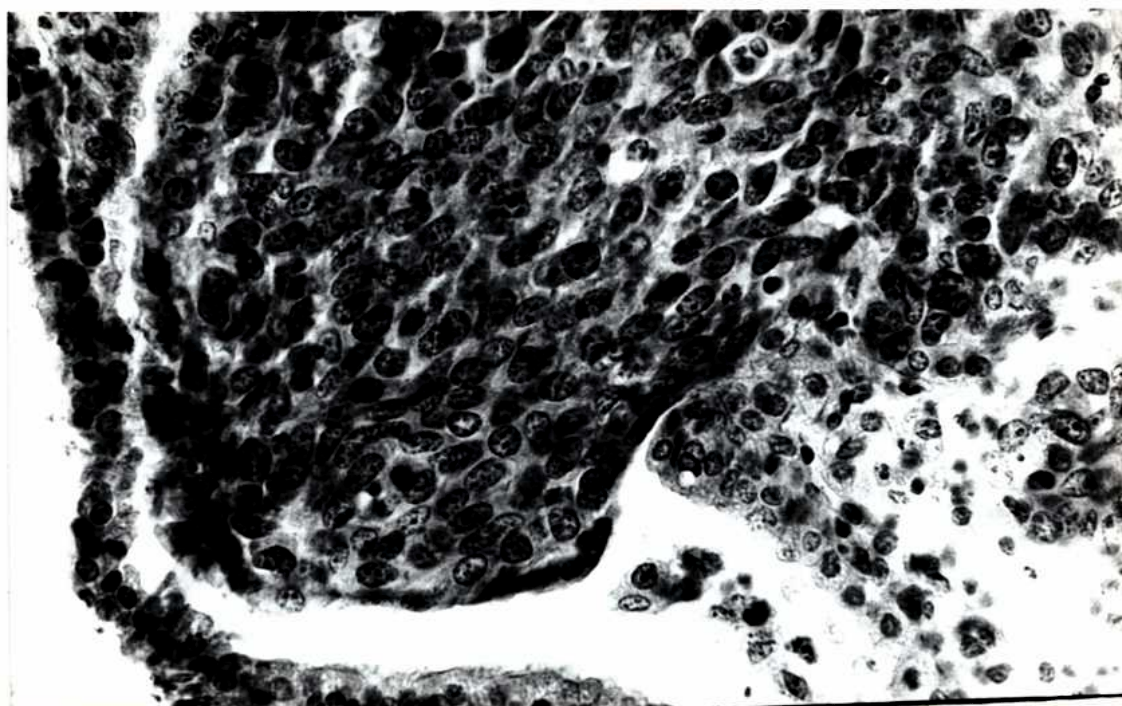
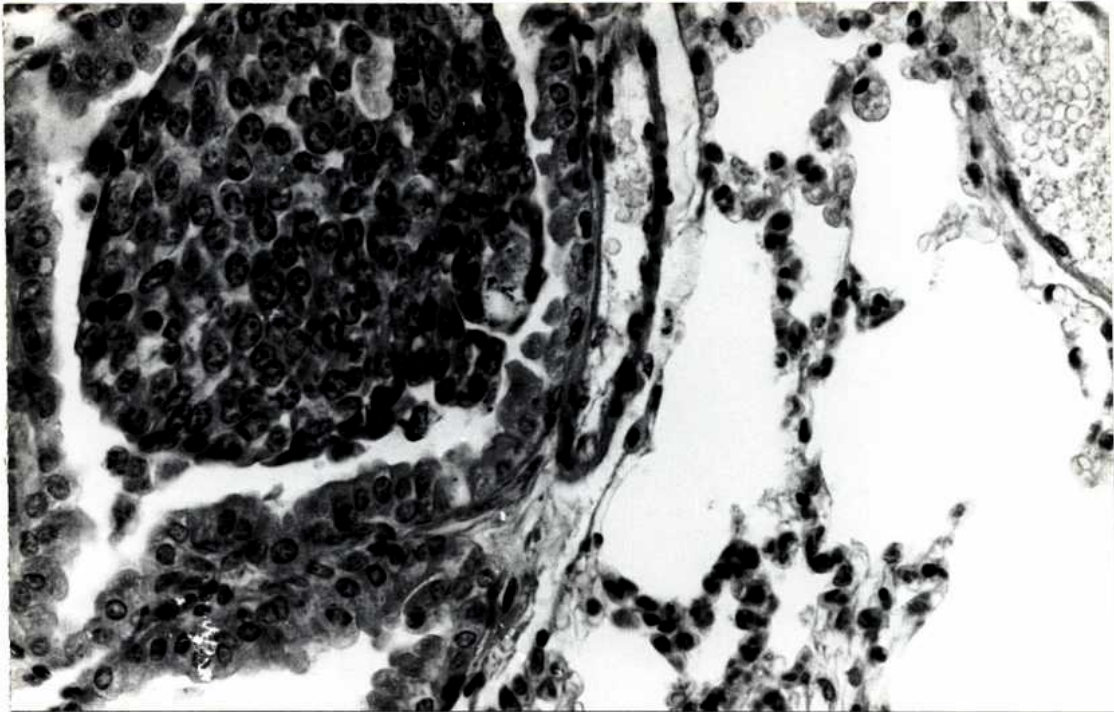


Imagen a mayor aumento de la Figura 13, en la que se observa claramente la invasión del bronquio y la ruptura de su epitelio (250 X).

FIGURA 14



Embolo tumoral de MM3 ya dentro del bronquio. (250 X).

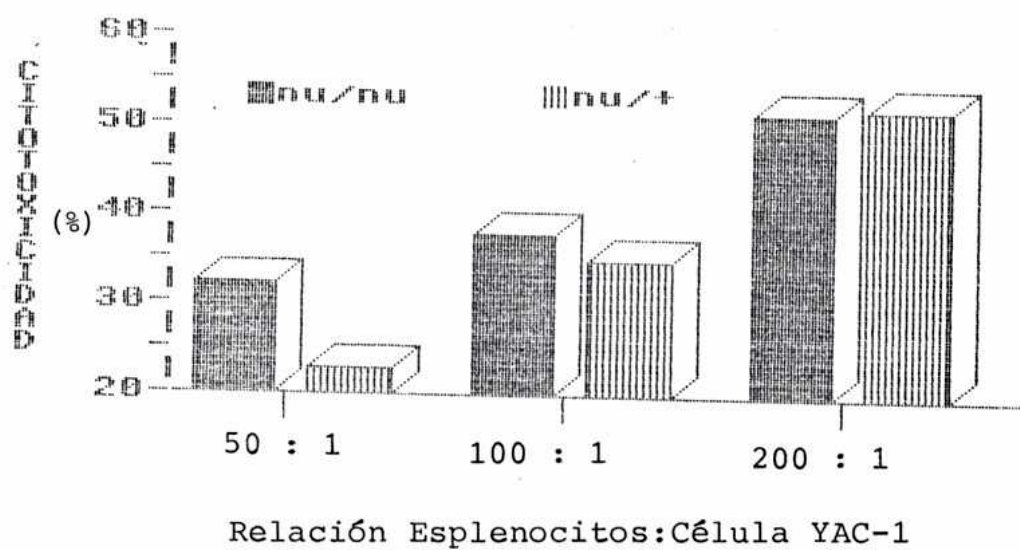


## Función T y metástasis espontáneas y experimentales

Se utilizaron ratones BALB nude de entre 4 y 6 meses de edad, y BALB heterocigotas para el gen nu como controles. Se emplearon 6 animales nude y 6 nu/+ para evaluar la actividad NK de sus esplenocitos frente a las células YAC-1 "in vitro". Se observó que no existía diferencia en cuanto al porcentaje de lisis celular, lo que habla de una actividad NK similar en ambos grupos (Figura 15).

En base a lo anterior se supuso que los ratones nude y nu/+ sólo diferían, desde el punto de vista inmunológico, en el nivel de "linfocitos T funcionantes", que como se sabe, no se hallarían presentes en los homocigotas para el gen nu pero sí en los heterocigotas (nu/+) (161). Con el objeto de evaluar si los linfocitos T podían, de alguna manera, alterar el patrón metastásico, se inocularon subcutáneamente ratones nude con M3 o MM3 y, cuando moribundos, se evaluó el crecimiento metastásico en pulmón. El tumor M3 no metastatizó ni en nude ni en los controles (Tabla 2). MM3, en cambio, dio metástasis pulmonares en ambos grupos, pero no se observaron diferencias significativas en cuanto a la incidencia y al número de las metástasis (Tabla 2), así como tampoco en el diámetro de las mismas.

FIGURA 15



ACTIVIDAD DE CELULAS NK EN NUDE DE 4-5 MESES

Con el objeto de observar la influencia de los linfocitos T en la producción de metástasis experimentales, se inocularon endovenosamente ratones nude y nu/+ con dos dosis de M3 y MM3. Nuevamente no se hallaron diferencias significativas (Tablas 3 y 4).

TABLA 2

## CAPACIDAD METASTASICA DE M3 Y MM3 EN NUDE DE 4-5 MESES

Genotipo	Tumor <sup>a</sup>	Incidencia tumoral	Incidencia <sup>b</sup> metastásica	Nr. Met. Pulmonares	
				Media	Rango
nu/nu	M 3	5/5 (100%)	0/5 (0%)	-	-
nu/+	M 3	6/6 (100%)	0/6 (0%)	-	-
nu/nu	MM 3	17/17 (100 %)	14/17 (82 %)	13,6	0-36
nu/+	MM 3	11/11 (100 %)	10/11 (90%)	16,7	0-31

a= Los tumores fueron extraídos e inoculados en condiciones asépticas.

b= Ratones con metástasis pulmonares / ratones con tumor.

Los datos se analizaron estadísticamente por Test U de Mann-Whitney.

TABLA 3

## METASTASIS EXPERIMENTALES DE M3 EN NUDE DE 4-5 MESES

Genotipo <sup>a</sup>	M3 e.v.	Incidencia <sup>b</sup> Metastásica	Nro. Metast. Pulmonares	
			Media	Rango
nu/nu	10 <sup>4</sup>	8/9 (89 %)	3,7	0-8
nu/+	10 <sup>4</sup>	9/9 (100 %)	3,7	1-8
nu/nu	5 x 10 <sup>4</sup>	5/5 (100 %)	29,8	15-49
nu/+	5 x 10 <sup>4</sup>	6/6 (100 %)	19,0	9-37

a= Fueron sacrificados al día 18 post inóculo e.v. para evaluar metástasis. Los nódulos metastásicos fueron similares en tamaño en ambos grupos (<1,5 mm).

b= Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados e.v. con M3.

Los datos se analizaron estadísticamente por el Test U de Mann-Whitney.

TABLA 4

METASTASIS EXPERIMENTALES DE MM3 EN NUDE DE 4-5 MESES

Genotipo <sup>a</sup>	MM3 e.v.	Incidencia <sup>b</sup> Metastásica	Nro. Metast. Pulmonares	
			Media	Rango
nu/nu	10 <sup>4</sup>	6/7 (86 %)	5,3	0-12
nu/+	10 <sup>4</sup>	7/7 (100 %)	7,6	3-18
nu/nu	5 x 10 <sup>4</sup>	8/8 (100 %)	99,5	54-187
nu/+	5 x 10 <sup>4</sup>	7/7 (100 %)	78,4	16-129

a= Se sacrificaron 18 días después del inóculo e.v. para evaluar metástasis. Los nódulos metastásicos fueron en ambos grupos < 1,5 mm.

b= Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados e.v. con MM3.

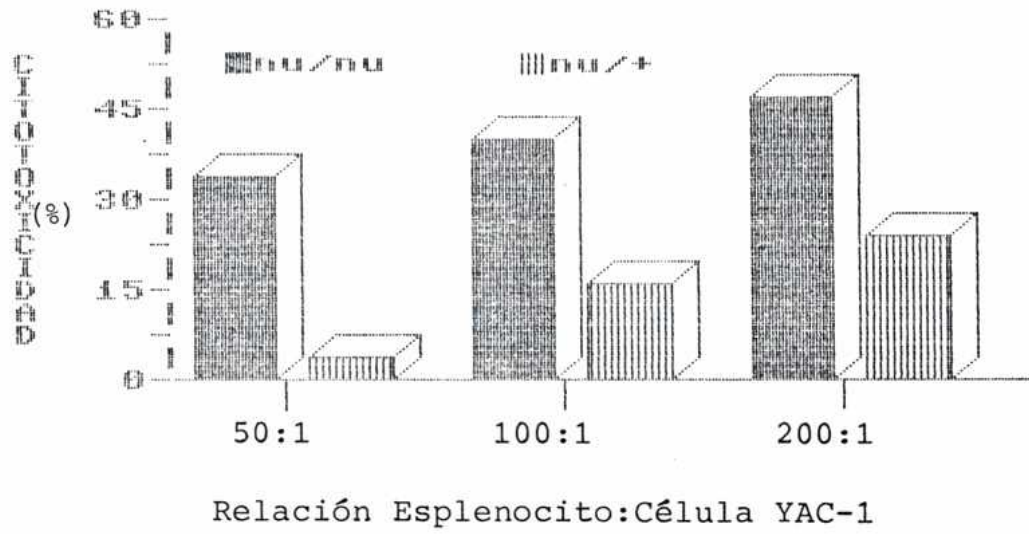
Los datos se analizaron estadísticamente por el Test U de Mann-Whitney.

## Funcion NK y metástasis experimentales

Se usaron ratones BALB nude de 5 a 8 semanas de edad que, según diversos estudios, han mostrado poseer una actividad NK en bazo exacerbada respecto de los controles (96, 99, 110). Con el objeto de confirmar que los ratones que se utilizarían se hallaban en esas condiciones, se usaron 6 nude y 6 nu/+ para evaluar el nivel de células NK esplénicas a través del ensayo de citotoxicidad por liberación de Cr frente a células YAC-1. Se observó una marcada diferencia en la actividad NK al comparar nude y nu/+ de 7-8 semanas de edad. (Fig. 16)

Como ya se había visto que la ausencia o presencia de actividad de los linfocitos T no afectaba el desarrollo de las metástasis experimentales de M3 ni de MM3, se usaron los ratones nude de 7 a 8 semanas para evaluar la importancia de las células NK en el control del desarrollo metastásico experimental. Los animales se inocularon endovenosamente con las células tumorales y 18 días más tarde se sacrificaron para cuantificar el crecimiento metastásico en pulmones. En ninguno de los dos tumores utilizados se observó diferencia significativa alguna entre el grupo experimental y el control (Tabla 5).

FIGURA 16



ACTIVIDAD DE CELULAS NK EN NUDE DE 7-8 SEMANAS



TABLA 5

METASTASIS EXPERIMENTALES DE M3 Y MM3 EN RATONES NUDE DE 7-8  
SEMANAS

Genotipo	Tumor e. v.	Incidencia <sup>a</sup> Metastásica	Nro. Metástasis Pulmonares	
			Media	Rango
nu/nu	3x10 <sup>4</sup> M3	7/7 (100%)	39,3	6-76
nu/+	3x10 <sup>4</sup> M3	5/7 (71%)	22,0	0,45
nu/nu	3x10 <sup>4</sup> MM3	7/7 (100%)	63,0	24-128
nu/+	3x10 <sup>4</sup> MM3	7/7 (100%)	64,6	15-123

<sup>a</sup>= Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados e. v. con células tumorales. Los nódulos metastásicos fueron de tamaño similar en todos los grupos.

Los resultados se analizaron por Test U de Mann-Whitney.

Función macrofágica y metástasis experimentales

Para observar el efecto de los macrófagos sobre la metástasis experimentales de M3 y MM3, se utilizaron ratones inoculados con sílica, ya que este tratamiento se considera que depleciona la función macrofágica (4, 118). Con el objeto de verificar si ello se cumplía en el sistema experimental utilizado, se uso un grupo de los animales normales tratados con sílica para determinar la actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial a través del ensayo de "clearance de carbón coloidal". Por este método pudo confirmarse que los animales inoculados con sílica mostraban una actividad fagocítica significativamente deprimida (Tabla 6).

Los animales restantes, tratados de igual forma con sílica e.v., fueron inoculados e.v. con células tumorales M3 o MM3, tres horas más tarde de la inyección de la suspensión de sílica. Los ratones fueron sacrificados 18 días después para evaluar el desarrollo metastásico en pulmón. Con ambos tumores se observó un aumento significativo del número de metástasis en los animales tratados respecto de los controles (Tabla 7).

TABLA 6  
EFECTO DE SILICA ENDOVENOSA

Grupo	N	Actividad Fagocítica (K)	p*
BALB tratados con sílica (a)	6	$0,038 \pm 0,008$	$<0,01$
BALB normales	5	$0,080 \pm 0,005$	

\*según test t de student.

a. 2 mg de sílica e.v. un día antes de la medición de la actividad fagocítica.

b.  $K = \frac{\log D03 - \log D015}{12}$

12

donde D03 y D015 representan las densidades ópticas de la sangre 3 y 15 minutos luego de la inyección de carbón coloidal.

TABLA 7

METASTASIS EXPERIMENTALES DE M3 Y MM3 EN RATONES TRATADOS CON  
SILICA

Grupo	Tumor e. v.	Incidencia <sup>a</sup> Metastásica	Nro. Metast. Pulmonares	
			Media	Rango
-----				
BALB tratados con sílica	5x10 <sup>4</sup> M3	17/17 (100%)	141,9 *	71-234
BALB normales	5x10 <sup>4</sup> M3	12/12 (100%)	85,9	38-157
-----				
BALB tratados con sílica	4x10 <sup>4</sup> MM3	19/19 (100%)	165,0**	32-290
BALB normales	4x10 <sup>4</sup> MM3	16/16 (100%)	82,8	10-211
-----				

a. Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados con células tumorales. Los nódulos metastásicos eran de similar tamaño en todos los grupos.

\* p<0,01 ; \*\* p<0,002 (Test U de Mann-Whitney).

## Anticuerpos y metástasis

Se quiso saber si en el suero de portadores de M3 o MM3 podía detectarse alguna diferencia a nivel de anticuerpos específicos, que se correlacionara con el poder metastásico espontáneo. Con ese objeto se realizó inmunofluorescencia frente a ambos tipos de células tumorales usando 1) sueros de portadores de M3 y MM3, 2) sueros de ratones que estuvieron en protocolos de inmunización frente a M3 y MM3, y que luego del desafío tumoral no desarrollaron crecimiento neoplásico, 3) suero singeneico normal (como control), y 4) solución fisiológica. En todos los casos sólo se consideró positiva la fluorescencia en membrana, ya que de existir un antígeno tumoral específico relevante, la célula tumoral lo expondría al sistema inmune a través de su membrana plasmática.

En los tres ensayos llevados a cabo con MM3 todos los resultados fueron negativos, mientras que en las dos oportunidades en que se trabajo con M3 todos los casos dieron inmunofluorescencia positiva. El hecho de que aun las células M3 con solución fisiológica fluorescieran podía explicarse de al menos dos maneras: la célula M3 poseía anticuerpos pegados en su superficie, o poseía receptores para el Fc de las inmunoglobulinas. En el primer caso el suero anti-IgG de ratón,

fluoresceinado, se uniría al Fc de los anticuerpos ya presentes sobre la célula; en el segundo caso serían las inmunoglobulinas del antisuero mismo las que se asociarían con la membrana de M3 por el receptor para Fc.

### Receptores para Fc

Para descartar una de las dos alternativas recién mencionadas se hicieron Rosetas EA (eritrocito de carnero-anticuerpo) que se usan habitualmente para detectar receptores para Fc (107). En dos experimentos llevados a cabo con M3, en cada uno de los cuales se contaron 200 células tumorales vivas, se observó la formación de Rosetas EA en 76,1 % de los casos. Este alto porcentaje obtenido en M3, indicador de la existencia de receptores para Fc en su membrana, no se vio al utilizar la misma metodología en el tumor MM3, ya que en él no se observó la formación de Rosetas. Tampoco se formaron rosetas en ninguno de los dos tumores al usar eritrocitos de carnero no expuestos al suero antieritrocito.

### Resistencia concomitante

Con el objeto de evaluar la importancia del fenómeno de resistencia concomitante en el desarrollo metastásico de ambos

carcinomas, animales portadores de M3 o MM3 subcutáneo recibieron un inóculo endovenoso secundario de las células tumorales para observar el número de metástasis pulmonares obtenidas al cabo de un tiempo.

En un caso se inocularon ratones normales o portadores de tumor M3 o MM3, de 14 días de evolución, con células M3 en forma endovenosa. A los 18 días se observó un número significativamente menor de nódulos metastásicos en los pulmones de los portadores de M3 respecto de los normales y de los portadores de MM3, que no diferían entre sí (Tabla 8). Los resultados obtenidos al inocular endovenosamente con MM3 a ratones normales o a portadores de M3 o MM3, de 20 días de evolución, que fueron sacrificados 20 días más tarde para evaluar el patrón metastásico, fueron similares a los anteriores (Tabla 8).

Se analizaron histológicamente los pulmones de portadores de M3, en los que se detectó menor número de nódulos metastásicos, para observar si existía algún tipo de reacción celular local por parte del huésped que pudiese explicar el fenómeno de resistencia concomitante. En ninguno de los cortes se detectó diferencia alguna, en cuanto a ese parámetro, respecto de sus

controles (Figuras 17, 18, 19). Por otra parte pudo observarse que el número de mitosis por campo en nódulos producidos por la inoculación e.v. de M3 o MM3 era significativamente menor en portadores de M3 s.c. que en portadores de MM3 s.c. o ratones normales (Tabla 9).



RESISTENCIA CONCOMITANTE DE M3 Y MM3

Tumor primario	Inóculo e.v.	Incidencia a Metastásica	Nr. Metástasis Pulmonares	
			Media	Rango
A. M3	4x10 <sup>4</sup> M3	10/12 (83%)	5,8 (1)	0-19
B. MM3	4x10 <sup>4</sup> M3	12/12 (100%)	40,5	3-95
C. -	4x10 <sup>4</sup> M3	11/11 (100%)	33,6	2-54
D. M3	2x10 <sup>4</sup> MM3	7/7 (100%)	25,0 (2)	7-49
E. MM3	2x10 <sup>4</sup> MM3	12/12 (100%)	106,0	8-185
F. -	2x10 <sup>4</sup> MM3	12/12 (100%)	82,3	22-142

a. Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados e.v. con tumor. En todos los grupos el tamaño de los nódulos metastásicos fue similar (la mayoría <1,5 mm).

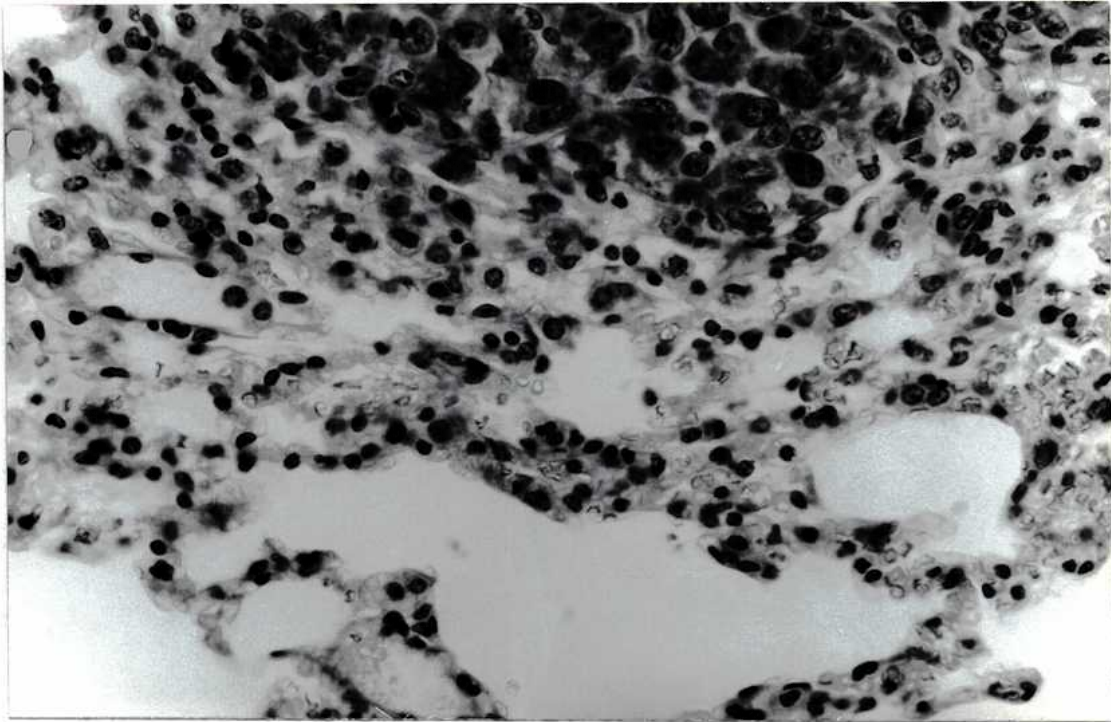
(1) p < 0,001 respecto de B y C.

(2) p < 0,001 respecto de E y p < 0,01 respecto de F.

(Test U de Mann-Whitney)

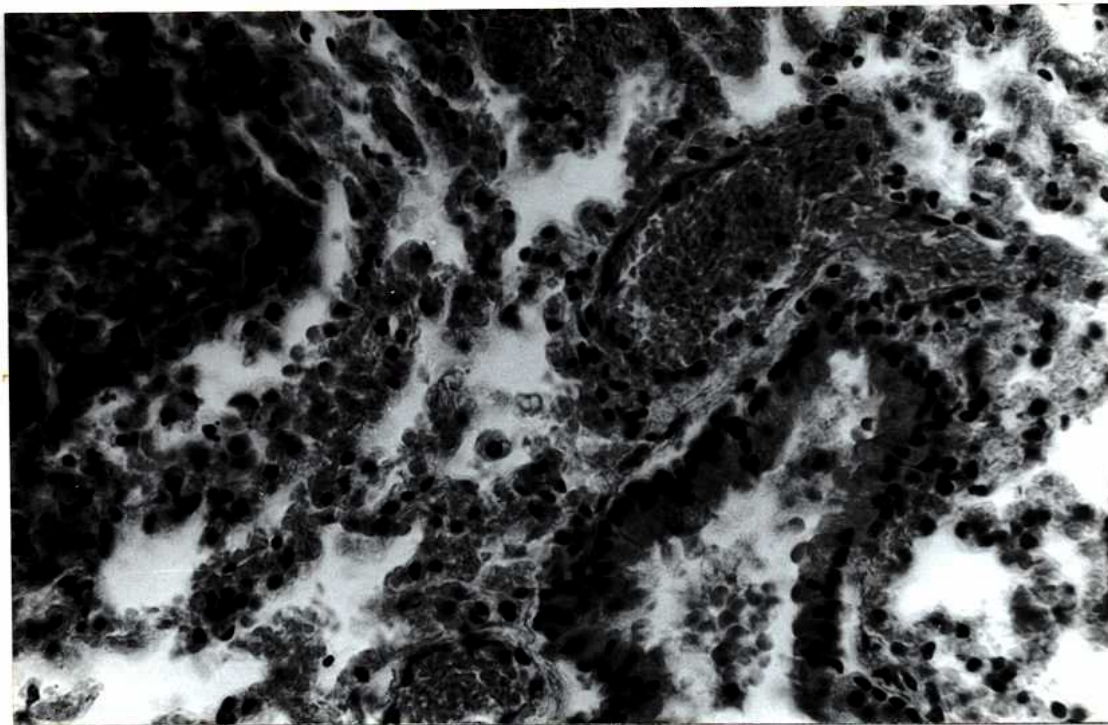
e.v. = endovenoso

FIGURA 17

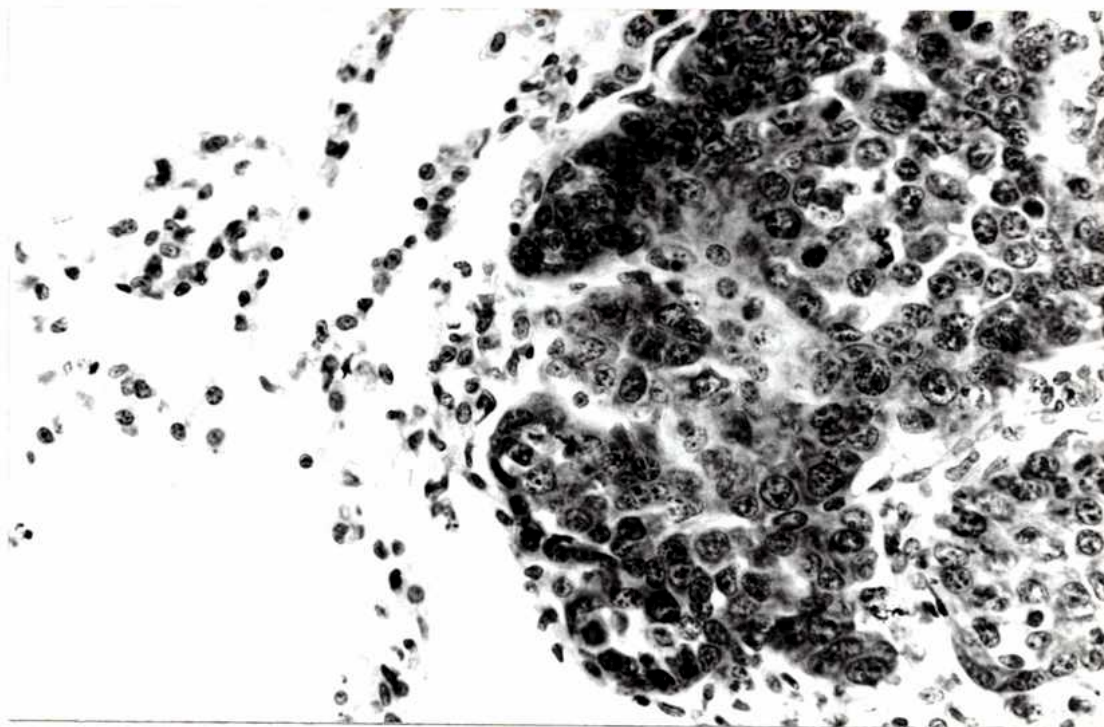


Nódulo metastásico pulmonar originado por la inoculación endovenosa de células MM3 en un portador de M3 sc. Nótese la ausencia intra o perinodularmente de células linfoides del huésped (100x).

FIGURA 18



Metástasis pulmonar "experimental" de MM3 en un ratón con tumor MM3 sc. No se observa infiltración alguna por parte de células del huésped, dentro o en la periferia del nódulo metastásico (100x).

FIGURA 19

Metástasis pulmonar "experimental" de MM3 en un ratón normal. Al igual que en Figs. 17 y 18, no se observan células linfoides del huésped que infiltren el nódulo (100x).

FRECUENCIA MITOTICA EN RATONES CON RESISTENCIA CONCOMITANTE

Grupo <sup>a</sup>	Mitosis por H.P.F. <sup>b</sup> (X + SD)	Nro.campos 1000 X observados
A. M3 sc + M3 ev	2,25 + 0,54	40
B. MM3 sc + M3 ev	3,74 + 0,87	50
C. - + M3 ev	3,90 + 1,11	50
D. M3 sc + MM3 ev	2,68 + 0,59	50
E. MM3 sc + MM3 ev	3,44 + 0,67	50
F. - + MM3 ev	4,42 + 1,01	50

sc= subcutáneo; ev= endovenoso

a. Los grupos A-F son los mismos citados en Tabla 8

b. Mitosis por campo a gran aumento

Por t de student: A vs. B y C:  $p \ll 0,001$

### Extractos de material necrótico y metástasis

Aunque ambos tumores muestran grandes áreas de necrosis, llamaba la atención el aparentemente distinto volumen relativo de necrosis de M3 y MM3. Se quiso entonces comprobar si eso era cierto, y a la vez evaluar si de alguna manera la necrosis tenía algo que ver con el desarrollo de la metástasis. En primer lugar, se pesaron tumores primarios M3 y MM3 de tamaño similar, y luego sus necrosis, que se obtuvieron por curetaje, para determinar el porcentaje que representaba la masa necrótica respecto de la masa tumoral primaria total. Se observó que en M3 representaba el  $18,9 + 2,5 \%$  ( $n=6$ ), mientras que en MM3 el  $37,5 + 4,2 \%$  ( $n=5$ ), es decir M3 poseía una masa necrótica significativamente menor que MM3 ( $p \ll 0,001$  según test T de student). Por otra parte, era llamativa la diferencia que, macroscópicamente, se observaba en la consistencia de ambas necrosis. La necrosis de M3 aparentaba ser más consistente y mostraba mayor resistencia al rasparse con el bisturí; la de MM3, era más lábil, de fácil desprendimiento y hasta licuificación al raspaje, e incluso, en muchos tumores MM3 al final de su evolución, la necrosis hallada era totalmente líquida, de aspecto lechoso y denso.

Con el objeto de evaluar la actividad de las necrosis de

ambos carcinomas se prepararon extractos celulares cuyas concentraciones proteicas y sus pH respectivos fueron: 3,7 mg/ml y 6,8 para M3, y 3,4 mg/ml y 7,2 para MM3. Sólo se utilizaron extractos del material necrótico, ya que de esa manera se podía trabajar más fácilmente con la sustancia que espontáneamente se liberaba en el área necrótica como consecuencia del daño o muerte celular. (Para no obtener resultados no representativos de la realidad no se usaron extractos del área no necrótica puesto que a partir de células vivas no dañadas se liberarían sustancias que normalmente se mantienen en el interior de la célula).

Se pensó que de existir alguna actividad, se hallaría más fácilmente en el extracto de material necrótico de MM3 ya que este tumor es más metastásico, posee más necrosis y ésta es más "líquida". En base a ello, en el primer experimento sólo se uso el extracto de material necrótico de MM3 que fue inoculado intratumoralmente en portadores de M3 en siete oportunidades. También se inocularon por igual vía grupos con solución fisiológica a 100 °C (para producir una necrosis por coagulación), con solución fisiológica a temperatura ambiente, y un grupo quedó sin inocular. Al día 35 del crecimiento tumoral, se sacrificaron los ratones y se registró el número de focos metastásicos pulmonares. Pudo observarse que mientras en los

controles absolutos el tumor M3 no había dado metástasis, como era habitual en los BALB de nuestro bioterio, en los demás grupos sí, siendo mayor el número de metástasis, en los animales tratados con el extracto de material necrótico de MM3 (Tabla 10). En un segundo experimento se inocularon intratumoralmente en M3 o intraperitonealmente, extractos de material necrótico de M3 o de MM3. Como puede verse en la tabla 10, al fin de la experiencia sólo se observaron metástasis pulmonares en los ratones tratados intratumoralmente con los extractos de material necrótico, tanto de M3 como de MM3. Si bien no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos con los dos extractos, existe una tendencia que podría depender de la concentración utilizada en cada caso (ver notas al pie de la Tabla 10).

Los tratamientos en los experimentos 1 y 2 difirieron en cuanto al número de inoculaciones debido a que se observaba reiteradamente que luego de la tercera o cuarta inoculación de extracto de material necrótico de MM3 intratumoral los animales presentaban, inmediatamente después de inoculados, un cuadro de excitación, taquipnea, disnea, estado de shock, en algunos casos convulsiones, y finalmente en un gran porcentaje, muerte por paro cardíaco. En los animales sobrevivientes el estado de disnea y lasitud se mantenía durante aproximadamente una hora,



MATERIAL NECROTICO Y METASTASIS ESPONTANEAS EN M3

Exper. <sup>a</sup>	Grupo	Incidencia <sup>b</sup> Metastásica	Nro Met. Pulmonares	
			Media	Rango
1	A. Ext.m.n.MM3 i.t.	12/12 (100%)	23,1	1-46
	B. SF a. 100 °C i.t.	9/11 (82 %)	2,4	0-11
	C. SF it	9/13 (69 %)	5,5	0-17
	D. -	0/12 (0 %)	-	
2	E. Ext.m.n.M3 i.t. (dosis menor)	9/9 (100%)	6,6	1-14
	F. Ext.m.n.M3 i.t. (dosis mayor)	8/8 (100%)	13,1	1-38
	G. Ext.m.n. MM3 i.t.	8/8 (100%)	3,9	1-9
	H. Ext.m.n. M3 i.p. (dosis mayor)	0/10 (0 %)	-	-
	I. Ext.m.n. MM3 i.p.	0/10 (0 %)	-	-
	J. SF i.t.	0/9 (0 %)	-	-
	K. SF i.p.	0/8 (0 %)	-	-

Ext. m.n. = extracto de material necrótico de; SF= solución

fisiológica; i.t.= intratumoral; i.p.= intraperitoneal.

(a) En el experimento 1 los ratones (3 meses de edad) recibieron 7 inoculaciones en A,B y C a partir del día 10 de crecimiento tumoral (las tres primeras inyecciones fueron cada 2 días, las siguientes cada 3 días). En cada oportunidad se inoculó en A 0,34 mg proteínas/0,1 ml.intratumoralmente.

En el experimento 2 los ratones (2 meses de edad) recibieron 4 inoculaciones a partir del día 12 de crecimiento tumoral. En el grupo E las dos primeras inoculaciones intratumorales tenían 0,52 mg proteína/0,28 ml; en F y H 1,3 mg proteína/0,28 ml, en G e I 0,45 mg proteína/0,28 ml. En todos los grupos la 3ra. y 4ta. inoculación era la mitad de volumen (y por lo tanto de proteínas).

(b) Ratones con metástasis pulmonares/Ratones portadores de tumor. La distribución de los tamaños de los nódulos metastásicos fue similar en todos los grupos.

Según Test U de Mann-Whitney: Experimento 1: A vs. B:  $p \ll 0,002$ ; A vs. C:  $p < 0,01$ ; A vs. D:  $p \ll 0,002$ ; B vs. D:  $p < 0,01$ ; C vs. D:  $p < 0,05$ .

Experimento 2: E vs H, I, J y K:  $p < 0,002$ ; F vs. H, I, J y K:  $p < 0,002$ ; G vs H, I, J y K:  $p < 0,002$ .

luego de lo cual se recuperaban. Pensándose en la posibilidad de que algún agente tóxico fuese el responsable de dicho fenómeno, se inocularon i.p. 5 animales portadores de M3 con 34 días de evolución (próximos a morir) con 0,5 ml del extracto de material necrótico de MM3 en forma brusca, y se observó que los animales no morían. Animales en similares condiciones tampoco murieron al ser inoculados intratumoralmente con 0,3 ml de solución fisiológica inyectada en forma rápida. Sólo uno de cinco ratones con M3 de 34 días que recibieron 0,2 ml del extracto en forma endovenosa, murió. Pensando entonces en la posibilidad de un shock anafiláctico, antes de inocular por quinta vez el extracto de material necrótico de MM3, se inyectaron 6 animales i.m. con el antihistamínico prometacina (Fenergan, Lab. Rhodia), 0,025 mg/ratón 60 minutos antes (82), no habiéndose modificado el cuadro anteriormente descripto.

Por otra parte se quiso saber si los extractos de material necrótico de M3 y MM3 eran a su vez capaces de matar células tumorales. Con ese objeto se incubaron los extractos con suspensiones celulares de las leucemias linfoideas LB y P 388, que habitualmente tienen muy buena viabilidad celular, observándose la ausencia de efecto necrotizante sobre esas

líneas tumorales aún luego de 24 horas de inoculación.

### Extractos de material necrótico y desprendimiento celular

En base a los resultados obtenidos mediante la inoculación intratumoral de los extractos de material necrótico, se creyó que una de las posibles explicaciones era que el extracto de material necrótico facilitase el desprendimiento celular a partir del tumor primario. Con el objeto de analizar dicha hipótesis, en primer lugar, se trabajó "in vitro" incubando fragmentos tumorales no necróticos con distintas concentraciones de los extractos o con solución fisiológica. Pudo observarse que para los fragmentos M3 tratados con extractos el número de células tumorales desprendidas al medio fue significativamente mayor que en aquellos tratados con solución fisiológica. Por otra parte, la liberación espontánea de células en fragmentos MM3 fue mayor que en los fragmentos M3 (Tabla 11).

Dado el efecto que poseían los extractos de material necrótico de M3 y MM3 al actuar "in vitro", quiso observarse si ese mismo efecto se detectaba con el tratamiento "in vivo" y por lo tanto podía explicar la aparición de metástasis en los portadores de M3 tratados. Con ese objeto fragmentos de tumor M3

DESPRENDIMIENTO CELULAR DE TUMORES TRATADOS "IN VITRO" CON  
EXTRACTOS DE MATERIAL NECROTICO

Tumor <sup>a</sup>	Tratamiento <sup>b</sup> 'in vitro"	Nro. Células desprendidas/ml (x)	n	% Células vivas (x %)
A. M3	Ext. m.n. MM3 (dosis mayor)	22,6 x 10 <sup>5</sup>	6	34,0
B. M3	Ext. m.n. MM3 (dosis menor)	12,2 x 10 <sup>5</sup>	6	33,2
C. M3	Ext. m.n. M3 (dosis mayor)	14,8 x 10 <sup>5</sup>	5	38,0
D. M3	Est. m.n. M3 (dosis menor)	14,4 x 10 <sup>5</sup>	6	31,0
E. M3	Solucion. Fisiol.	4,2 x 10 <sup>5</sup>	7	8,5
F. MM3	Solucion. Fisiol.	41,0 x 10 <sup>5</sup>	6	11,8

Ext. m.n. = extracto de material necrótico de

n = número de ratones por grupo.

(a) = Los fragmentos tumorales de M3 y MM3 provenían de

regiones no necróticas y poseían un tamaño similar (aprox. 0,5 cc.)

(b) = En cada uno de los pocillos experimentales la mitad del volumen correspondía al extracto y la otra mitad a solución fisiológica. La dosis mayor del extracto de MM3 poseía 3,4 mg proteínas /ml, mientras que la mayor de M3 poseía 3,7 mg/ml. En ambos casos las dosis menores estaban diluidas a la mitad.

Según test U de Mann-Whitney: A vs E:  $p= 0,002$ ; B vs E:  $p < 0,05$ ; C vs E:  $p < 0,01$ ; D vs E:  $p= 0,01$ ; B vs F:  $p=0,01$ ; C vs F:  $p= 0,05$ ; D vs F:  $p= 0,01$ ; E vs F:  $p= 0,01$ .

provenientes de animales que se habían inoculado 4 veces intratumoralmente con solución fisiológica o con extracto de material necrótico de MM3, se incubaron "in vitro" con solución fisiológica. Pudo observarse que el tratamiento "in vivo", que permitía el crecimiento metastásico en M3, también aumentaba en forma significativa el número de células desprendidas respecto del control, y que ese resultado era semejante al obtenido con tumores inyectados "in vivo" con solución fisiológica pero tratados "in vitro" con extracto de material necrótico de MM3 (Tabla 12). Por otra parte fragmentos de MM3 se incubaron con solución fisiológica o con extracto de material necrótico de MM3, observándose que la liberación de células tumorales, que era mucho mayor que la espontánea de M3, no se alteraba (Tabla 12). Un grupo de MM3 conformado por sólo 3 casos (no figura en tabla) fue incubado con solución fisiológica con 0,02 g% de  $\text{ClCa}_2$  (concentración a la que se halla en líquido Ringer-Tyrode), sin observarse alteración alguna en el número de células desprendidas.

Tanto en el experimento que figura en la Tabla 11 como el de la Tabla 12 es interesante señalar que el porcentaje de células vivas desprendidas era bajo, siendo menor aún en todos los casos en que el tratamiento "in vitro" o "in vivo" era exclusivamente con solución fisiológica. Sin embargo, es importante destacar que a pesar de la baja viabilidad celular a

DESPRENDIMIENTO CELULAR A PARTIR DE TUMORES TRATADOS "IN VIVO" O  
"IN VITRO" CON EXTRACTOS DE MATERIAL NECROTICO

Tumor <sup>a</sup>	Tratamiento <sup>b</sup> "in vivo"	Tratamiento "in vitro"	Nr. Células desprend./ml (x)	n	% Cél. Vivas (x %)
A. M3	Sol. Fisiol i.t.	Sol. Fisiol.	6,2 x 10 <sup>5</sup>	6	8,3
B. M3	Ext. m.n. MM3 i.t.	Sol. Fisiol.	22,4 x 10 <sup>5</sup>	8	42,0
C. M3	Sol. Fisiol. i.t.	Ext. m.n. MM3	33,0 x 10 <sup>5</sup>	5	16,8
D. MM3	-	Sol. Fisiol.	44,8 x 10 <sup>5</sup>	5	14,5
E. MM3	-	Ext. m.n. MM3	34,5 x 10 <sup>5</sup>	6	21,7

Ext. m.n. MM3= extracto de material necrótico de MM3.

n= número de ratones por grupo.

i.t.= intratumoral.

(a) Los fragmentos de M3 y MM3 provenían de regiones no necróticas y poseían un tamaño similar (aprox. 0,5 cc.).

(b) Los grupos A, B y C fueron inoculados i.t. 4 veces con Ext. m.n. MM3 (0,34 mg/0,1 ml) a partir del día 12 de crecimiento tumoral, con un intervalo de 3 días entre inyección e inyección.



(c) En cada uno de los pocillos experimentales la mitad del volumen correspondía al extracto y la otra mitad a solución fisiológica. El Ext. m.n. MM3 poseía 3,4 mg proteínas /ml.

Según test U de Mann-Whitney: A vs B:  $p < 0,01$ ; A vs C:  $p < 0,01$ ; A vs D:  $p < 0,01$ ; A vs E:  $p < 0,01$ ; B vs D:  $p < 0,02$ ; B vs E:  $p < 0,05$ .

igual porcentaje de células vivas, la probabilidad de liberar más células vivas es mayor conforme aumenta el número total de células liberadas. En base a lo anterior se podría decir que cualquier método que favorezca el desprendimiento celular aumentará el número de células vivas liberadas y por ende la probabilidad de que se formen eventuales metástasis.

Otro punto a destacar es el hecho de que mientras las células vivas liberadas de fragmentos de M3 (tratados o no) generalmente se ven aisladas de otras células, las de MM3 se hallan, en muchos casos, rodeadas de un gran número de células tumorales muertas conformando émbolos tumorales.

Extracto de material necrótico tumoral, resistencia concomitante y metástasis

Cuando se realizó la primera prueba piloto para observar el efecto del extracto de material necrótico "in vivo" y se vio crecimiento metastásico en los pulmones de portadores de M3, que nunca daba metástasis espontáneas en nuestros ratones, la pregunta que surgió fue: el tumor M3 tratado con extracto perdió su capacidad de generar resistencia concomitante y por ello hay metástasis, o mantiene esa capacidad y el número de metástasis sería aún mayor de no existir?

Se intentó responder a esta pregunta realizando un experimento en el cual ratones portadores de tumor M3 tratados intratumoralmente con extracto de material necrótico de MM3 (igual que en experimento 1 de la Tabla 10), ratones portadores de M3 intactos, y ratones normales se inocularon al día 14 del crecimiento tumoral con 50.000 células M3 por vía endovenosa y se sacrificaron al día 35 para evaluar el crecimiento metastásico en pulmón. A partir de los resultados obtenidos se puede observar una fuerte resistencia concomitante generada por el tumor M3 intacto. Con el M3 tratado intratumoralmente con extracto, si bien se observa resistencia concomitante al comparar con el control, es menor que la del M3 sin tratar

(Tabla 13). Sin embargo,, si tenemos en cuenta las metástasis que sólo se detectan como consecuencia del tratamiento intratumoral, y lds restamos a las obtenidas en el grupo de M3 tratado e inoculado endovenosamente, observamos a partir de estos resultados modificados que la resistencia concomitante obtenida con M3 intacto o M3 tratado no difiere (Tabla 13).

TABLA 13

RESISTENCIA CONCOMITANTE EN M3 TRATADOS CON EXTRACTO DE MATERIAL  
NECROTICO TUMORAL

Grupo	Inóculo <sup>a</sup> e. v.	Incid. <sup>b</sup> Metast.	Nro. Metast. Pulmonares	
			Media	Rango
A. M3 s. c.	5x10 <sup>4</sup> M3	11/11	18,1	4-31
B. M3 s. c. + Ext. m. n. MM3 i. t. <sup>c</sup>	5x10 <sup>4</sup> M3	8/8	36,3 (13,0) <sup>d</sup>	11-79
C. Normal	5x10 <sup>4</sup> M3	12/12	85,9	38-157

s. c. = subcutáneo; Ext. m. n. = extracto de material necrótico  
i. t. = intratumoral

(a) = Las inoculaciones e. v. se efectuaron al día 14 del crecimiento tumoral.

(b) = Ratones con metástasis pulmonares / Ratones inoculados con M3 e. v.

(c) El grupo B recibió 7 inoculaciones intratumorales de Ext. m.n. MM3 (0,34 mg proteínas/0.1 ml) a partir del día 10 de crecimiento tumoral. Este experimento fue hecho en paralelo al Experimento 1 de la tabla 10; en iguales condiciones, de tal manera que el grupo con M3 tratado intratumoralmente con Ext. m.n. MM3 en dicha ocasión, se usa como control de metástasis espontáneas. Dicho resultado (23,1 nódulos) fue restado al obtenido con el grupo B de esta tabla para tener una aproximación al número de metástasis experimentales.

(d) Corrección por resta del número de metástasis espontáneas.

Se considera que:

$$(\text{metástasis de B}) = (\text{metástasis espontáneas de B por tratamiento con Ext. m.n. MM3}) + (\text{metástasis experimentales de B por inoc. e.v. de M3})$$

Como aquí se evalúa la resistencia concomitante a través de las metástasis experimentales:

$$(\text{metástasis experimentales de B}) = (\text{metástasis de B}) - (\text{metástasis espontáneas de B por tratamiento con Ext. m.n. MM3})$$

Como el número de metástasis por Ext. m.n. MM3 es 23,1, se resta ese valor (ver (c)).

-Por Test U de Mann-Whitney:

$$A \text{ vs } B: p < 0,05; A \text{ vs } C: p \ll 0,001; B \text{ vs } C: p < 0,01$$

Con datos corregidos:

$$A \text{ vs } C: p \ll 0,001 ; B \text{ vs } C: p \ll 0,001$$

## DISCUSSION

Como ya se ha mencionado, la mayor parte de los pacientes cancerosos mueren a consecuencia de sus metástasis que, por lo general, ya están presentes en el momento del diagnóstico clínico de la neoplasia primaria. A pesar de los progresos terapéuticos, sólo el 35 % de los enfermos se curan (163) y es por eso que durante los últimos años, se ha puesto tanto énfasis en las investigaciones sobre metástasis cancerosas, que se supone son las responsables del fracaso obtenido en el 65 % restante de los casos.

Como ocurre con la gran mayoría de las enfermedades para las cuales se busca un tratamiento efectivo, el mayor problema radica en hallar un modelo que refleje lo mejor posible lo que ocurre en el hombre, dado que por razones éticas no es factible realizar experimentos "in vivo" con seres humanos. Fundamentalmente, el modelo animal que más se ha utilizado ha sido el ratón. La existencia de cepas murinas singeneicas ha permitido la sobrevida "in vivo" de tumores malignos surgidos en alguno de sus integrantes, empleando pasajes seriados. Si bien no se pueden hacer extrapolaciones directas al humano, hay que destacar que la gran parte de los conocimientos que se han adquirido en el tema provienen de experimentos realizados en ratones. Otro inconveniente es la elección del sistema tumoral. En general se cree que lo más correcto es utilizar tumores de origen espontáneo, ya que reflejarían mejor la fenomenología de



los tumores humanos (98) al no evocar, en la mayoría de los casos, una respuesta inmunológica fuerte en el huésped singeneico. Pero, si bien hay algunos buenos modelos, en general son pocos los tumores espontáneos metastatizantes en el ratón y sólo muestran crecimiento secundario luego de la extirpación quirúrgica del tumor primario (97, 104).

En la presente Tesis se han utilizado dos adenocarcinomas mamarios con diferente capacidad metastatizante en pulmón, que poseen un origen comun. Este modelo, cuyo tumor parental surgió espontáneamente, resultó adecuado para el estudio de las diferencias existentes entre ambas líneas tumorales que pudieran ser responsables del distinto potencial metastásico. Ese fue el objetivo de esta Tesis.

En primer lugar se ha analizado por técnicas clásicas de inmunización antitumoral la inmunogenicidad de M3 y MM3, que en ambos casos resultó ser débil al ensayarse en los ratones de nuestro bioterio. Estos resultados coinciden en parte con los hallados para el tumor M3 al realizarse implantación y excisión en la población de ratones donde se originó el tumor (Instituto de Oncología); en dicha oportunidad, los autores no sólo no hallaron mayor resistencia que en los controles (no mostraron inmunogenicidad), sino que incluso observaron una exacerbación tumoral (115). Estos resultados se contradicen con los obtenidos

por los mismos autores (28) nuevamente en la población de origen, pero utilizando un ensayo no tradicional consistente en pesar el ganglio drenante del sitio de inoculación de las células tumorales cinco días después de inyectadas. Ellos concluyen que ambos tumores son antigénicos pero MM3 lo es en grado menor que M3 y además que, por un ensayo similar a la hipersensibilidad retardada, se pudo observar que los dos carcinomas son capaces de provocar una respuesta inmune en el huésped. Los diferentes resultados hallados en las dos poblaciones de ratones pueden deberse justamente a pequeñas diferencias genotípicas, o incluso fenotípicas por influencia del ambiente, en dos sublíneas de una misma cepa endocriada. Como prueba de ello, estaría el hecho de que el tumor M3 nunca dio metástasis espontáneas en los ratones usados en los experimentos descritos en esta Tesis, mientras que sí lo hacía en la población original. Esto incluso podría decirse que hasta resulto ventajoso, pues me permitió trabajar con un tumor que no daba metástasis y su variante metastatizante.

Hay que aclarar que aún cuando los tumores no mostrasen inmunogenicidad alguna, ello no significa que el huésped no pueda detectar, a través de su sistema inmunológico, antígenos que nosotros, por medio de ensayos quizás no demasiado sensibles, no detectemos. Es por eso que, independientemente de la inmunogenicidad de M3 y MM3, se estudió la importancia de los linfocitos T en el desarrollo metastático de ambos tumores. Con

ese objeto se utilizaron animales genéticamente timoprivos que poseían un nivel de actividad de células NK similar. El patrón metastásico de MM3 no se vio alterado respecto de los controles, mientras que M3 no desarrolló metástasis en ninguno de los grupos. Si bien en base a estos resultados se podría suponer que la célula MM3 no es afectada por la acción del linfocito T, no podríamos pensar lo mismo para M3 ya que, si bien no se alteró el crecimiento de su tumor primario, no sabemos si la célula M3 llegó a entrar en la circulación donde se vería más expuesta a la acción de los linfocitos T. Por ello se trató de evaluar la sensibilidad "in vivo" de M3 y MM3 a las células T, para lo cual se inyectaron las células tumorales por vía endovenosa (ensayos de metástasis experimentales) en ratones nude y nu/+. Nuevamente no se vieron cambios significativos en el número de nódulos metastásicos surgidos a partir de las células de uno u otro tumor. En base a los experimentos realizados se considera que M3 y MM3 no diferirían en cuanto a su sensibilidad a los linfocitos T y por ende estas células no jugarían un papel esencial en la regulación del desarrollo metastásico ni justificarían la diferente capacidad metastatizante de las líneas tumorales en estudio. Otros autores han observado resultados similares a los aquí obtenidos pero siempre utilizando tumores murinos singeneicos de poca o nula inmunogenicidad detectable (2, 3, 41, 64), mientras que con varios tumores fuertemente inmunogénicos los linfocitos T parecían tener una importante función en la regulación de las metástasis (2, 3, 33, 41, 42).

Si bien hay sugerencias de que los anticuerpos pueden ser responsables de la inhibición del desarrollo de las metástasis en algunos sistemas (152) en general suele decirse que la respuesta inmune humoral no es de gran importancia para impedir el crecimiento tumoral (176). Se ensayó inmunofluorescencia con sueros de portadores de M3 y MM3, y de ratones sujetos a protocolos de inmunización en los que M3 y MM3 no habían crecido, con el fin de averiguar si existían anticuerpos que se asociaran con componentes de la membrana celular de uno de los dos tumores. De estar presentes dichos anticuerpos y de tener alguna importancia en la regulación de las metástasis, ellos podrían cumplir funciones efectoras, en cuyo caso lo más lógico sería haberlos hallado asociados a células M3; o incluso facilitadoras del crecimiento metastásico (anticuerpos bloqueantes) (92), encontrándoselos sobre células MM3. Los resultados obtenidos indicaron que tampoco los anticuerpos podrían explicar la diferente capacidad metastásica de ambos tumores. Sin embargo, pudo observarse a través de los experimentos de inmunofluorescencia y luego de formación de rosetas EA, que las células M3 poseían un alto porcentaje de receptores para Fc de inmunoglobulinas, mientras que MM3 carecía totalmente de ellos. Al respecto, diversos autores han hallado que algunos tumores poseen células con receptores para Fc y han postulado diversas hipótesis para explicar la ventaja que poseerían las células tumorales con esa característica (107,

197). Así, podrían neutralizar anticuerpos efectores contra la célula tumoral fijando su porción Fc o, simplemente, asociando por esa región anticuerpos que enmascararían a los antígenos tumor-específicos; podrían estimular el crecimiento tumoral; podrían activar células supresoras; o podrían desprenderse y alterar la regulación de las respuestas inmunes (107, 197). Schirmacher (166) ha visto un caso en el que un linfoma T no metastásico expresaba poca cantidad de receptores para Fc, mientras que su variante metastásica poseía un alto porcentaje de dichos receptores. En dicho modelo no se ha establecido una relación causal entre el fenotipo positivo para receptores para Fc y el potencial metastásico. En base a los resultados tan extremos de M3 y MM3, a pesar de ser opuestos a los obtenidos por Schirmacher, no se puede descartar que la presencia de receptores para Fc no esté asociado de alguna manera con el potencial metastásico en el modelo en estudio, si bien hasta el momento no se ha hallado una explicación satisfactoria para ello.

Muchos consideran que mecanismos inmunes inespecíficos como el mediado por células NK serían de gran importancia en el control de las metástasis (20, 87, 184). Para probar esta hipótesis lo ideal hubiera sido utilizar animales genéticamente NK-privos, pero lamentablemente, aún no existe una cepa con estas características en la cual pueda transplantarse M3 o MM3 sin que sean rechazados inmunológicamente por

histo-incompatibilidad. Si bien puede obtenerse una depleción crónica de NK mediante la implantación subcutánea de tubos de silastic conteniendo  $\beta$ -estradiol (167), se consideró que no era lo apropiado en este caso por tratarse de adenocarcinomas mamarios sobre los cuales podría actuar la hormona. Otra opción para poder evaluar la importancia de las células NK sobre las "metástasis espontáneas" hubiese sido la inoculación crónica de drogas depresoras o exacerbadoras de la función NK. Pero, se consideró que, si bien las "metástasis experimentales" no representan al fenómeno metastásico en su totalidad, a través de ellas se podía evaluar la sensibilidad a NK de M3 y MM3 "in vivo". Con ese objeto se inyectaron e.v. las células tumorales en ratones nude con diferente nivel NK en el momento de la inoculación. A pesar del tan generalizado concepto de que las células NK actúan en la destrucción de las células tumorales en circulación, previniendo de esta manera el desarrollo metastásico (16, 17), M3 y MM3 no han mostrado ser sensibles a la actividad NK de tal manera que dichas células no jugarían un papel importante en el control de las metástasis en el modelo en estudio y, por lo tanto, no justificarían el diferente potencial metastásico de M3 y MM3. Los resultados obtenidos son similares a los de Fodstad y col. (65), quienes plantean que en muchos trabajos que apoyan la importancia de las NK, no se ha estudiado bien la depresión selectiva de dichas células y por lo tanto los resultados podrían deberse a otras alteraciones inmunes no buscadas. Es importante entonces, no sobredimensionar la

importancia de las NK en el control de las metástasis, ya que no se trata de un sistema que sea efectivo en todos los casos. Por otra parte no hay que atribuir a las NK sólo una acción frente a las células tumorales en circulación, dado que, recientemente, se ha observado acción NK en ciertos órganos blancos como pulmón e hígado, que parece inhibir la formación de metástasis en algunos sistemas experimentales (196).

Otro mecanismo inmune inespecífico al cual se le ha dado mucha importancia son los macrófagos. Al respecto en esta Tesis se ha evaluado la sensibilidad "in vivo" de M3 y MM3. Nuevamente, debido a la no existencia de una cepa singeneica con los tumores con depleción macrofágica crónica, se ha utilizado el ensayo de "metástasis experimentales" en ratones inoculados previamente con sílica, que es un tóxico macrofágico. Pudo observarse que ambas líneas tumorales eran sensibles a la acción de los macrófagos; sin embargo, la sensibilidad en ambos casos fue muy similar por lo cual no podría explicarse de esta manera la diferente capacidad metastásica de M3 y MM3. Diversos investigadores han asociado la depresión macrofágica sistémica con una incidencia metastásica espontánea (37, 103) y experimental (53, 123) aumentada, así como también tratamientos exacerbadores de la función macrofágica con inhibición de metástasis (53, 119). Reading y col. (154) han visto que la supresión de la función macrofágica "in vivo" aumenta el potencial maligno de una línea parental poco metastásica, pero

no tiene efecto sobre sublíneas altamente metastásicas. Por otro lado, se ha visto que macrófagos provenientes de ratones tratados con Tioglicolato pueden aumentar la formación de metástasis (79, 80), lo cual se debería fundamentalmente a las reacciones inflamatorias que producen y tal vez por supresión de la actividad NK (80). Pero, sin duda los macrófagos pueden llegar a ser un importante mecanismo de control de las metástasis e incluso de erradicación de tumores secundarios ya establecidos provenientes de neoplasias primarias subcutáneas, como se ha visto a través del uso de activadores macrofágicos encapsulados en liposomas (54).

En resumen, a través de los estudios realizados se podría concluir que el sistema inmunológico del huésped no actuaría en forma diferente frente a M3 o MM3, como para justificar el distinto comportamiento metastásico. Los estudios histológicos realizados en un gran número de cortes de los tumores primarios y de las metástasis confirmarían la anterior conclusión, al menos a nivel de inmunidad celular local, por la ausencia de infiltración intratumoral o peritumoral por parte de células linfoides del huésped.

Una de las diferencias más notorias entre M3 y MM3, que se ve perfectamente al observar la cinética de crecimiento tumoral de ambos, es la velocidad de crecimiento y la sobrevida del huésped. El tumor parental M3 crece mucho más rápido y mata al



portador en menos tiempo que la sublínea MM3. Este diferente crecimiento tumoral podría deberse a una distinta frecuencia de mitosis, a una diferente proporción de células vivas con potencialidad para dividirse (por ejemplo por un porcentaje de necrosis relativo distinto), o a ambas cosas. El estudio histológico de ambos tumores mostró una frecuencia de mitosis por campo mayor en M3 que en MM3, y un porcentaje de necrosis relativo mayor en el tumor primario MM3 que en el M3; ambas cosas justificarían el más rápido crecimiento del tumor parental M3. Si bien en clínica suele decirse que las neoplasias malignas de crecimiento más veloz suelen ser más metastatizantes (por ejemplo, el linfoma de Burkitt en los niños) (165), quizás para poder establecer una correlación entre velocidad de crecimiento y metástasis en cada tumor en particular, habría que analizar el efecto producido sobre el patrón metastático por la alteración de la frecuencia mitótica en dicho tumor, lo que es muy difícil de realizar. Muy recientemente en el modelo murino B16 se ha logrado, mediante restricción calórica, una tasa de crecimiento tumoral menor; en ese caso, al igual que con M3 y MM3, se observó que junto con una menor velocidad del crecimiento del primario se observaba un mayor número de metástasis (46). La mayoría de los cánceres de animales de laboratorio no dan metástasis (163), lo cual se cree que podría deberse a la corta sobrevida de los portadores. En base a ello se pensó que M3 necesitaría tiempo para poder llegar a dar metástasis, ventaja que sí tendría MM3 por la mayor sobrevida de sus portadores. Se

ha intentado prolongar la sobrevida de portadores de M3 por diferentes métodos (inyecciones intratumorales con el antimitótico colchicina, reducción de masa tumoral viva a través de la inoculación intratumoral de solución fisiológica a 100 °C, extirpación quirúrgica parcial, extirpación total y trasplante en flanco contralateral), sin obtener éxito en ninguno de los casos. A pesar de ello, puede decirse que, si bien una prolongación de la sobrevida puede favorecer la manifestación de las metástasis, no es esencial. En efecto, como se verá más adelante, se pueden producir metástasis en el corto período de sobrevida de los portadores de M3.

Es sabido que la intensidad de la resistencia concomitante es proporcional al volumen tumoral del primer implante (74, 159). El hecho de que M3 alcance un volumen tumoral subcutáneo mayor que MM3 en igual tiempo, y que el primero sea poco o nada metastásico, hizo sospechar que un mecanismo de resistencia concomitante pudiese ser responsable del diferente número de metástasis, o implantes secundarios naturales, en ambos adenocarcinomas. En diversos trabajos se ha dicho que la extirpación quirúrgica del tumor primario a menudo es seguida por una recurrencia metastásica (30, 73, 164) y que ello no sería consecuencia de una diseminación durante la intervención

quirúrgica (105), sino de la desaparición de la resistencia concomitante generada por el tumor primario (73). Sería interesante comprobar si en líneas tumorales relacionadas pero con diferente capacidad metastásica, la resistencia concomitante juega un papel importante. Con ese objeto se evaluó la resistencia concomitante de portadores de M3 o MM3 s.c. frente a inyecciones endovenosas de ambos tumores. A través de este ensayo de metástasis experimentales pudo observarse que M3 era capaz de generar resistencia concomitante frente a sí mismo y a su variante metastásica. MM3 no era capaz de generar resistencia concomitante pero sí era sensible al fenómeno, al menos en estas condiciones. Con respecto a la ausencia de resistencia concomitante de MM3 cabe aclarar que el conteo de nódulos metastásicos fue realizado entre los días 32 y 40 de crecimiento tumoral, de tal manera que las metástasis formadas a partir del tumor primario eran despreciables, ya que por la cinética de aparición de metástasis espontáneas, éstas comenzaban a manifestarse recién al día 45. Estos resultados fueron presentados en la XXX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (17) simultáneamente con los de otro grupo de investigadores (del Instituto de Oncología) (114) que tuvieron resultados casi iguales, ya que la única diferencia radicó en que en sus ratones MM3 presentaba una ligera "inmunidad concomitante".

En nuestro laboratorio hemos investigado el fenómeno de resistencia concomitante en diferentes tumores murinos de no detectable inmunogenicidad (159). En dichos modelos observamos, entre otras cosas, que el fenómeno no estaba mediado por reacciones inmunes dependientes de linfocitos T o macrófagos, que tenía cierto grado de inespecificidad y que involucraba algún tipo de citostasis, y no de citolisis, del implante tumoral secundario (159). Por otra parte hemos detectado actividad antimitótica en el suero de portadores de tumor que parecería correlacionarse con el fenómeno de resistencia concomitante (160). Recientemente, mediante estudios histológicos, hemos visto que no había una participación local de células linfoides del huésped en el tumor sujeto a resistencia concomitante, y que allí la frecuencia mitótica estaba disminuida (125). Con el objeto de evaluar si la resistencia concomitante de M3 se manifestaba en forma similar a la observada en otros modelos tumorales de nuestro laboratorio, se realizó el análisis histológico de las metástasis originadas por la inoculación e.v. de células tumorales en portadores de M3 s.c., de MM3 s.c. y en ratones normales. En los pocos nódulos metastásicos "experimentales" que se desarrollaron en ratones portadores de un tumor primario M3 s.c. se observó una menor frecuencia mitótica con respecto a la observado en portadores de un tumor primario MM3 s.c. o de controles, repitiéndose en cierta manera los resultados previamente vistos en otros sistemas (125, 159). En ninguno de los tres casos se observaron

elementos linfoides infiltrantes del huésped en los crecimientos metastásicos. Diversos autores han estudiado la resistencia de huéspedes portadores de tumores a desafíos endovenosos de células tumorales, observando en algunos casos la presencia de resistencia concomitante (127, 151, 198), en otros la exacerbación del número de metástasis artificiales (7), o incluso ambas cosas, dependiendo del tamaño del tumor primario (102). Esto indicaría que, dependiendo del modelo tumoral utilizado, los resultados obtenidos pueden diferir, dado que habría tumores capaces de ejercer resistencia concomitante y otros no. Volviendo al modelo M3-MM3 podría decirse que la ausencia de resistencia concomitante en portadores de MM3 sería responsable, al menos en parte, del diferente patrón metastásico observado con ambos tumores, y que ese fenómeno no se explicaría por la participación local de elementos celulares linfoides del huésped y que se vería mediado a través de un mecanismo que podría actuar inhibiendo la proliferación celular.

Otro aspecto que llamó la atención fue el diferente porcentaje de necrosis contenido en los tumores primarios de M3 y MM3, así como su distinta consistencia y distribución respecto de áreas no necróticas. Se quiso evaluar entonces, si existía alguna correlación entre esas observaciones y la diferente capacidad metastatizante en ambos tumores. Con ese objeto se inocularon intratumoralmente con extractos de material necrótico de M3 y MM3 a portadores de M3 s.c., observándose que en ambos

casos aumentaba el número de metástasis pulmonares. Es interesante señalar que este resultado se observó sin que se alterase la supervivencia de los portadores de M3. El hecho de que en uno de los experimentos la inoculación intratumoral de SF condujese a la aparición de unas pocas metástasis, sugirió que la mera inoculación del líquido dentro del tumor podía favorecer la movilización y desprendimiento de algunas células y en consecuencia la aparición de metástasis en un tumor que nunca metastatizó en nuestra cepa de ratones. Más aún, la solución fisiológica a 100 °C no provocó un mayor número de metástasis, lo que podría deberse a la necrosis coagulativa originada que impediría una mayor liberación de células. Estos leves indicios me llevaron a pensar en la posibilidad de que los extractos favorecían el desprendimiento celular y finalmente la aparición de metástasis. Si bien, en el Instituto de Oncología se ha visto que la inoculación de extractos solubles de tumor M3 en animales operados de su tumor primario M3, produce una exacerbación de la incidencia metastásica en la cual se involucra al sistema inmune (113), no creo que este sea el caso. En primer lugar, la reiterada inoculación intraperitoneal de los extractos de material necrótico (posterior a la implantación del tumor y realizada en animales intactos) no condujo a la formación de metástasis pulmonares. En segundo lugar, en los experimentos realizados "in vitro", como se verá en seguida, los extractos de material necrótico también ejercieron una acción sobre fragmentos del tumor primario M3, no pudiendo postularse en ese

caso al sistema inmune del huésped como responsable de la actividad observada.

Con el objeto de evaluar la acción de los extractos de material necrótico sobre el desprendimiento celular, ellos se incubaron "in vitro" con fragmentos de M3. Se vio que dichos extractos favorecían el desprendimiento celular, y que además, la liberación celular espontánea a partir de fragmentos de MM3 era mayor aún sin tratamiento. Ahora se sabía cuál era la acción de los extractos de material necrótico "in vitro" sobre M3, pero: ese mayor desprendimiento celular, por acción de los extractos, también ocurría en el tratamiento "in vivo" ?. Se trató de contestar a esa pregunta observando ahora el desprendimiento celular espontáneo "in vitro" de fragmentos de M3 tratados "in vivo" con extractos de material necrótico de MM3, y que en el animal producían metástasis . Pudo verse en ese caso que la liberación celular estaba aumentada (en forma similar al M3 tratado con extracto "in vitro"), de tal manera que el extracto parecía actuar "in vivo" favoreciendo el desprendimiento celular, lo que aumentaría la probabilidad de dar metástasis. Este efecto no se vio "in vitro" con fragmentos de M3 tratados con solución fisiológica "in vivo". Además, el tratamiento "in vitro" de MM3 con extracto no pudo aumentar el número de células desprendidas respecto del control, como si MM3 estuviese en una condición cercana a la de su máxima posibilidad de liberar células.

En base a los resultados obtenidos se cree que en los extractos de material necrótico analizados podría existir alguna actividad enzimática que al debilitar las uniones intercelulares en el tumor primario favorecería el desprendimiento celular. Weiss (192) que ha obtenido resultados "in vitro" similares a los aquí hallados, aunque con tumores alogeneicos, ha detectado la presencia de enzimas lisosomales en los extractos necróticos (193). Esto podría ser análogo al fenómeno de "autolisis subletal", en el cual la liberación de enzimas lisosomales podría modificar la membrana de las células sin llegar a injuriarlas, pero alterando la cohesión y adhesividad celulares (142). Por otra parte, se hallaron otras enzimas que también podrían favorecer el desprendimiento celular como proteasas neutras, aminopeptidasas, prolina hidroxilosa, y colagenasa, en regiones necróticas de tumores (132, 134). Si bien Weiss ha correlacionado la necrosis tumoral con el desprendimiento celular "in vitro", el resultado obtenido mediante el tratamiento intratumoral con extractos de material necrótico en portadores de M3, sería la primera confirmación de que la actividad se mantiene "in vivo" y de que podría favorecer la aparición de metastasis.

Habiendo establecido que ambos extractos de material necrótico favorecían el desprendimiento celular, quedaba por contestar si a través de ello se podía explicar el diferente



potencial metastásico de M3 y MM3. En base al cálculo del porcentaje relativo de necrosis por peso, se había observado que MM3 poseía, en relación a la masa tumoral primaria, mucho más necrosis que M3. Por otro lado, a través del estudio histológico, se había visto que la distribución de la necrosis era diferente en ambos tumores: en M3 era sólo central y separada del área no necrótica, mientras que en MM3 se alternaban áreas necróticas y no necróticas. Weiss había visto que el desprendimiento celular era mayor en las regiones vecinas a la necrosis que en aquellas alejadas unos pocos milímetros hacia la periferia (192, 195). Dado que en M3 el espesor del anillo externo de células vivas era mayor que en el tumor MM3, el material necrótico, que a su vez se halla en menor cantidad, poco podría afectar a las células más periféricas capaces de diseminarse. En MM3 en cambio, debido a la existencia de un anillo periférico de células vivas más delgado, la sustancia que favorecería el desprendimiento celular se difundiría desde el área necrótica alcanzando con mayor facilidad la región periférica del tumor. Por otro lado, MM3 posee en total más "sustancia" necrótica, y además toda área no necrótica esta habitualmente rodeada por varias áreas necróticas, de tal manera que las "sustancias" necróticas llegan a áreas no necróticas desde distintas zonas sumando así su actividad. Además, en los experimentos "in vitro", se ha visto que la liberación celular espontánea de MM3 es mayor que M3, lo que podría deberse a que los fragmentos aparentemente no necróticos de MM3 tuviesen

pequeñas zonas necróticas alternadas no detectables a simple vista, que ya estuviesen actuando sobre la liberación celular. Podría ocurrir también que las células MM3 tuviesen uniones intercelulares más lábiles que M3. Tanto en M3 como en MM3 se observó liberación celular con un gran porcentaje de células muertas. Pero en el primer tumor era tan bajo el desprendimiento que la posibilidad de hallar células vivas era baja, mientras que en MM3, debido al mayor número desprendido, la probabilidad era mayor. Otra observación interesante era que en MM3 las células vivas desprendidas "in vitro" solían constituir la región central de un émbolo con un gran número de células muertas, mientras que en M3 las células vivas, por lo general, se hallaban aisladas y por lo tanto más susceptibles a cualquier ataque por parte del huésped. En conclusión, en base a los estudios "in vivo" e "in vitro" realizados con extractos de material necrótico, y a los análisis histológicos y de porcentajes de necrosis, puede decirse que el diferente potencial metastásico de M3 y MM3 podría explicarse por la diferente cantidad y disposición de la sustancia necrótica, que sería la fuente de "sustancias" que favorecen el desprendimiento celular; sin descartar también la posibilidad de que posean uniones intercelulares con diferente "fuerza".

Queda por ver cuál es la relación entre "sustancia" necrótica, resistencia concomitante y metástasis. Puede la resistencia concomitante generada por M3 actuar aún en presencia

de un "factor" que favorezca el desprendimiento celular y las metástasis ?. En portadores de M3 inoculados intratumoralmente con extracto de material necrótico de MM3 se observó un número de metástasis artificiales significativamente menor que en los controles. Además, si se restaban las metástasis inducidas por la inoculación intratumoral del material necrótico, se observaba que la resistencia concomitante a un inóculo endovenoso de células tumorales, permanecía inalterada en los portadores de M3. En base a ello se podría suponer que las pocas células liberadas espontáneamente de tumores M3 podrían, a su vez, ser controladas por el fenómeno de resistencia concomitante.

Como se ha descrito al comienzo de esta Tesis para que una célula cancerosa llegue a conformar una metástasis debe atravesar una serie de pasos, saliendo indemne de cada uno de ellos. En general, hoy se cree que para que ello ocurra, habría dentro del tumor primario células con propiedades especiales que las convierten en células con capacidad metastásica. El uso de modelos como el de M3 y MM3 sería de gran utilidad para evaluar aquellos factores que determinan la aparición de metástasis a partir de una línea parental poco metastásica.

Los resultados aquí obtenidos explicarían la diferente capacidad metastatizante de M3 y MM3 cuando crece en la cepa BALB de nuestro bioterio. No se descartan otros mecanismos adicionales sugeridos por otros autores (9, 25, 26, 29, 153). Es

posible que los factores aquí actuantes puedan tener importancia en la generación de metástasis en tumores humanos. Con relación a ello sería importante poder reconocer de alguna manera aquellas neoplasias capaces de generar resistencia concomitante de aquellas que no la generan para poder llegar a predecir en qué casos la extirpación quirúrgica no sería aconsejable por la posible exacerbación del número de focos metastásicos. Con respecto a la necrosis tumoral, habría que tener en cuenta que la muerte celular, siempre inferior al 100 %, obtenida por quimioterapia o radioterapia, podría causar a su vez una diseminación celular relacionada con la necrosis. Al respecto se ha visto que el tratamiento "in vitro" con antimetabolitos facilita el desprendimiento de las células tumorales (195).

A través del desarrollo de esta Tesis, se llegó a la conclusión de que la diferente capacidad metastatizante de M3 y MM3, si bien podría atribuirse a un gran número de factores, se debería fundamentalmente a la diferencia en resistencia concomitante inducida por ambos tumores, así como también a la diferente cantidad y distribución del material necrótico presente en los tumores primarios, que sería responsable de un aumento en el desprendimiento celular.

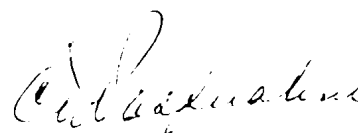
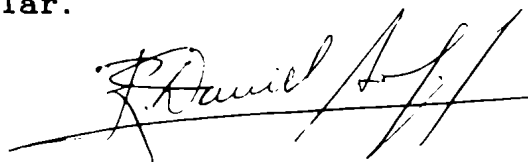
## RESUMEN

Se ha utilizado un modelo experimental en el raton BALB que consiste en comparar dos carcinomas mamarios con diferente capacidad metastatizante en pulmón: el tumor M3, que surgió espontáneamente en una hembra BALB en el Instituto de Oncología, posee bajo poder metastásico; el MM3, seleccionado a partir del primero, es altamente metastatizante. El objetivo de esta Tesis fue analizar diferentes factores que pudiesen de alguna manera explicar la distinta capacidad metastásica de ambos tumores.

Los resultados obtenidos indican que M3 y MM3 poseen una similar baja inmunogenicidad y que ni los linfocitos T, las células NK, los macrófagos o los anticuerpos actuan de manera diferencial sobre los mismos como para justifiçar sus diferentes patrones metastásicos. Sin embargo, se ha observado una alta frecuencia de receptores para Fc de inmunoglobulinas en M3 y una ausencia total de ellos en MM3; si bien esta diferencia tan notoria podría tener alguna relación con el potencial metastásico, no se ha hallado aun una explicación satisfactoria. Se ha analizado la resistencia concomitante inducida por ambos tumores frente a inóculos secundarios endovenosos, observándose en M3 una fuerte resistencia concomitante que MM3 no mostro. El

El análisis histológico de ambos tumores muestra que la resistencia concomitante no estaría mediada por células linfoides del huésped, al menos localmente, y que actuaría retardando el crecimiento de las células tumorales establecidas en el pulmón. Por otro lado se observó en MM3 una mayor necrosis tumoral respecto de M3 y una distribución en forma alternada con áreas no necróticas. El tratamiento de M3 con extractos de material necrotico condujo a la formación de metástasis espontáneas, que nunca se observaron en los controles, y a un mayor desprendimiento celular "in vitro". En MM3 los extractos de material necrótico no aumentaron la liberación celular "in vitro", por lo que se postula que en dicho tumor ésta sería máxima.

En base a los resultados obtenidos se concluye que, la presencia de algún factor en las áreas necróticas favorecería el desprendimiento celular a partir del tumor primario y luego las metástasis. Por otra parte, se considera que la resistencia concomitante podría ser importante en el control de las metástasis en ratones con M3 s.c. Así, MM3 daría metastasis debido a su menor resistencia concomitante y a su mayor desprendimiento celular.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Alexander P: Surveillance against neoplastic cells. Is it mediated by macrophages?. Br J Cancer 33: 344, 1976
2. Alexander P: The role of the host in metastasis. De "Accomplishments in Cancer Research", Fortner JG and Rhoads JE (ed.), p. 138. General Motors Cancer Research Foundation, 1981.
3. Alexander P, Eccles SA: Host-mediated mechanisms in the elimination of circulating cancer cells. De "Cancer Invasion and metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects", Nicolson GL & Milas L (ed.), p 293. Raven Press, NY, 1984.
4. Allison AC, Harrington J, Birbeck M: An examination of the cytotoxic effect of silica on macrophages. J Exp Med 124: 141, 1966.
5. Anderson DE: Genetic predisposition to cancer. En "Advances in medical oncology, research and education", Vol. 3: Epidemiology, Birch J (ed). Pergamon Press, NY, p. 195, 1979.
6. Anderson JR: Patologia de Muir. Compendio de Anatomía Patológica y Patología general. Espaxs, Barcelona, 1982.
7. Ando K, Hunter N, Peters LJ: Immunologically non specific enhancement of artificial lung metastases in tumour-bearing mice. Cancer Immunol Immunother 6: 151, 1979.



8. Attia MA, Weiss DW: Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res* 26: 1787, 1966.
9. Bal de Kier Joffe E, Puricelli LI, Vidal MCC, Lustig ES: Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J Exp Clin Cancer Res* 2: 151, 1983.
10. Bancroft H: *Introducción a la Bioestadística*. Eudeba, 1976.
11. Barsky SH, Baker A, Siegel GP, Togo S, Liotta LA: Use of anti-basement membrane antibodies to distinguish blood vessel capillaries from lymphatic capillaries. *Am J Surg Pathol* 7: 667, 1983.
12. Bashford E, Murray J, Haaland M, Bowen W: General results of propagation of malignant new growths. *Third Scientific Report on the Investigations of the Imperial Cancer Research Foundation* 3: 262, 1908.
13. Baylin SB, Weisburger WR, Eggleston JC, Mendelsohn G, Bearnen MA, Abeloff MD, Ettinger DS: Variable content of histaminase, L-dopa decarboxylase and calcitonin in small-cell

carcinoma of the lung. Biologic and clinical implications. N Engl J Med 299: 105, 1978.

14. Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN: Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticuloendothelial system. II. A study of the kinetics of the granulopoietic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Br J Exp Pathol 34: 441, 1953.

15. Bishop JM: Oncogenes. Scientific American 246: 69, 1982.

16. Bishop CJ, Whiting VA: The role of natural killer cells in the intravascular death of intravenously injected murine tumour cells. Br J Cancer 48: 441, 1983.

17. Bonfil RD, Ruggiero RA, Meiss RP, Pasqualini CD: Resistencia concomitante en dos carcinomas mamarios murinos con diferente capacidad metastatizante. Medicina (Bs Aires) 45: 330, 1985.

18. Bosslet K, Schirmacher V: Escape of metastasizing clonal tumor cell variants from tumor-specific cytolytic T-lymphocytes. J Exp Med: 154: 557, 1981.

19. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248, 1976.

20. Brunda MJ, Rosenbaum D, Stern L: Inhibition of experimentally-induced murine metastases by recombinant alpha interferon: correlation between the modulatory effect of interferon treatment on natural killer cell activity and inhibition of metastases. *Int J Cancer* 34: 421, 1984.
  
21. Burnet, FM: The concept of immunological surveillance-disease. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1, 1970.
  
22. Cairns J: El problema del cáncer. *Investigación y Ciencia* 1: 88, 1976.
  
23. Cairns J: The origin of human cancers. *Nature* 289: 353, 1981.
  
24. Cairns J: Aging and cancer as genetic phenomena. *Natl Cancer Inst Monograph* 60: 237, 1982.
  
25. Colombo LL: Paradojal menor poder de crecimiento en pulmón de una línea de mayor capacidad metastatizante en dicho órgano. *Medicina (Bs Aires)* 43: 827, 1983.
  
26. Colombo LL: Manifestación de la potencialidad metastatizante por masajes del tumor primario. *Medicina (Bs Aires)* 43: 828, 1983.

33. Davey GC, Currie GA, Alexander P: Immunity as the predominant factor determining metastasis by murine lymphomas. Br J Cancer 40: 590, 1979.
34. De Vore DP, Houchens DP, Overjera AA, Dill GS (Jr), Hutson TB: Collagenase inhibitors retarding invasion of a human tumor in nude mice. Exp Cell Biol 48: 367, 1980.
35. De Wys, WD: Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors. Cancer Res 32: 374, 1972.
36. Deckers PJ, Davis RC, Parker GA, Mannick JA: The effect of tumour size on concomitant tumor immunity. Cancer Res 33: 33, 1973.
37. Deichman GI, Kashkina LM, Kluchareva TE, Vendrov EL, Matveeva VA: Inhibition of experimental and spontaneous lung metastases of highly metastatic syrian hamster sarcoma cells by non-activated bone marrow and peritoneal exudate cells. Int J Cancer 31: 609, 1983.
38. Don I, Melloni BJ, Eisner GM: Melloni's Illustrated medical Dictionary. The Williams & Wilkins Company, 1983.
39. Easty DM, Easty GC: Measurement of the ability of cells to

infiltrate normal tissues in vitro. Br J Cancer 19: 36, 1974.

40. Eaves G: The invasive growth of malignant tumors as a purely mechanical process. J Pathol 109: 233, 1973.

41. Eccles SA, Heckford SE, Alexander P: Effect of cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumours. Br J Cancer 42: 252, 1980.

42. Eccles SA, Styles JM, Hobbs SM, Dean CJ: Metastasis in the nude rat associated with lack of immune response. Br J Cancer 40: 802, 1979.

43. Ehrlich P: Experimentelle Carcinomstudien an mausen. Arb Inst Exp Ther. Frankfurt 1: 65, 1906.

44. Eisenstein R, Kuettner KE, Neapolitan C, Soble LW, Sorgente N: The resistance of certain tissues to invasion: III. Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblasts and endothelial cells in culture. Am J Pathol 81: 337, 1975.

45. Embleton MJ, Middle JG: Immune responses to naturally occurring rat sarcomas. Br J Cancer 43: 44, 1980.

46. Ershler WB, Berman E, Moore AL: Slower B16 melanoma growth but greater pulmonary colonization in calorie-restricted mice.

47. Ewing J: Neoplastic diseases. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1928 (citado por Nicolson GL & Poste G en "Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis Part I. Properties of metastatic cells". Current Prob. Cancer 7, 1982).

48. Fialkow PJ: Clonal origin of human tumors. Biochem Biophys Acta 458: 283, 1976.

49. Fidler IJ: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with I-5-iodo-2'-deoxyuridine. JNCI 45: 775, 1970.

50. Fidler IJ; Selection of successive tumor lines for metastasis. Nature (New Biol) 242: 148, 1973.

51. Fidler IJ: The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. Eur J Cancer 9: 223, 1973.

52. Fidler IJ: Immune stimulation-inhibition of experimental cancer metastasis. Cancer Res 34: 491, 1974.

53. Fidler I: Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. Cancer Res 34:

1074, 1974.

54. Fidler IJ: The generation of tumoricidal activity in macrophages for the treatment of established metastases. De "Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects", Nicolson GL & Milas L (eds). Raven Press, p. 421. NY, 1984.

55. Fidler IJ: The Ernst W Bertner Memorial Award Lecture: The evolution of biological heterogeneity in metastatic neoplasms. De "Cancer invasion and metastasis: biologic and therapeutic aspects", Nicolson GL & Milas L (eds). Raven Press, p. 5, 1984.

56. Fidler IJ, Cifone MA: Properties of metastatic and non-metastatic cloned subpopulations of an ultraviolet light-induced fibrosarcoma of recent origin. Am J. Pathol 97: 633, 1979.

57. Fidler IJ, Gersten DM, Budmen MB: Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte mediated cytotoxicity. Cancer Res 36: 3160, 1976.

58. Fidler IJ, Gersten DM, Kripke ML: The influence of immunity on the metastasis of three murine fibrosarcomas of differing immunogenicity. Cancer Res 39: 3816, 1978.

59. Fidler IJ, Gruys MA, Cifone MA, Barnes Z, Bucana C: Demonstration of multiple phenotypic diversity in a murine melanoma of recent origin. JNCI 67: 947, 1981.
60. Fidler IJ, Hart IR: Principios de la biologia del cancer: Biologia de las metastasis. En "Cancer: principios y practica de Oncologia", De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenber SA (eds), Cap. 5, Tomo I, Salvat, España, 1984.
61. Fidler IJ, Kripke ML: Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. Science: 197, 893, 1977.
62. Fidler IJ, Nicolson GL: Organ selectivity for implantation, survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. JNCI 57: 1119, 1976.
63. Fidler IJ, Nicolson GL: Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. JNCI 58: 1867, 1977.
64. Fisher B, Soliman O, Fisher ER: Effect of antilymphocyte serum on parameters of tumor growth in a syngeneic tumor-host system. Proc Soc Exp Biol Med 131: 16, 1969.
65. Fodstad O, Hansen CT, Cannon GB, Statham CN, Lichtenstein GR, Boyd MR: Lack of correlation between natural killer activity



and tumor growth control in nude mice with different immune defects. *Cancer Res* 44: 4403, 1984.

66. Folkman J: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 34: 2109, 1974.

67. Forni L: Reagents for immunofluorescence and their use for studying lymphoid cell products. De "Immunological methods ", Lefkovits I & Pernis B (eds), p 151, Academic Press, NY, 1978.

68. Foulds L: The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res* 14: 327, 1954.

69. Gasic GJ: Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Review* 3: 99, 1984.

70. Gasic GJ, Gasic TB, Galanti N, Johnson T, Murphy S: Platelet-tumor cells interaction in mice: The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer* 11: 704, 1973.

71. Giavazzi R, Alessandri G, Spreafico F, Garattini S, Mantovani A: Metastasizing capacity of tumor cells from spontaneous metastases of transplanted murine tumours. *Br J Cancer* 42: 462, 1980.

72. Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, Patz A, Fenselau A:

Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. J Cell Biol 84: 298, 1980.

73. Gorelik E: Antimetastatic concomitant immunity. En "Tumor Invasion and Metastasis", Liotta LA & Hart IR (eds), p 113, The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1982.

74. Gorelik E: Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. Adv Cancer Res 39: 71, 1983.

75. Gorelik E: Resistance of tumor-bearing mice to a second challenge. Cancer Res 43: 138, 1983.

76. Gorelik E, Feldman M, Segal S: Selection of 3LL tumor subline resistant to natural effector cells concomitantly selected for increase metastatic potency. Cancer Immunol Immunother 12: 105, 1982.

77. Gorelik E, Fogel M, Feldman M, Segal S: Differences in resistance of metastatic tumor cells and cells from local tumor growth to cytotoxicity of natural killer cells. JNCI 63: 1397, 1979.

78. Gorelik E, Segal S, Feldman M: On the mechanism of tumor "concomitant immunity". Int J Cancer 27: 847, 1981.

79. Gorelik E, Wiltrout RH, Brunda MJ, Holden HT, Herberman RB: Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *Int J Cancer* 29: 575, 1982.
80. Gorelik E, Wiltrout RH, Copeland D, Herberman RB: Modulation of formation of tumor metastases by peritoneal macrophages elicited by various agents. *Cancer Immunol Immunother* 19: 35, 1985.
81. Green EL (ed): *Biology of the laboratory mouse*: 2nd edition, Mc Graw-Hill Book Company, NY, 1966.
82. Grinstein M: Mastocitos y anafilaxia. De "Inmunologia y Alergia Infantil", Academia Americana de Pediatria, Distrito XII, Rama Argentina, p 35, Centro de Ediciones Medicas, 1970.
83. Hagmar B, Norrby K: Influence of cultivation, trypsinization and aggregation on the transplantability of melanoma B 16 cells. *Int J Cancer* 11: 663, 1973.
84. Hakansson L, Trope C: On the presence within tumors of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs. *Acta Pathol Microbiol Scand* 82: 35, 1974.
85. Hanna N: Expression of metastastic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural

killer cell-mediated cytotoxicity. Int J Cancer 26: 675, 1980.

86. Hanna N: Role of natural killer cells in host defense against cancer metastasis. En "Cancer Invasion and metastasis: Biological and Therapeutic Aspects", Nicolson GL, Milas L (eds), p. 309, Raven Press, NY, 1984.

87. Hanna N, Fidler IJ: Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. JNCI 65: 801, 1980.

88. Hanna N, Fidler IJ: Relationship between metastatic potential and resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in three murine tumor systems. JNCI 66: 1183, 1981.

89. Hanna N, Schneider M: Enhancement of tumor metastasis and supression of natural killer cell activity by B-estradiol treatment. J Immunol 130: 974, 1983.

90. Hart IR, Raz A, Fidler IJ: Effect of cytoskeleton-disrupting agents on the metastatic behavior of melanoma cells. JNCI 64: 891, 1980.

91. Hart IR, Fidler IJ: Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. Cancer Res 40, 2281, 1980.

92. Hellstrom KE, Hellstrom I: Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv Immunol* 18: 209, 1974.
93. Heppner GJ, Miller BE: Tumor heterogeneity: Biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Met Rev* 2: 5, 1983.
94. Herberman RB, Aoki T, Nunn M, Lavrin DH, Soares N, Gazdar A, Holden H, Chang KSS: Specificity of Cr-release cytotoxicity of lymphocytes immune to murine sarcoma virus. *JNCI* 53: 1103, 1974.
95. Herberman RB, Holden J: Natural cell mediated immunity. *Adv Can Res* 7: 305, 1978.
96. Herbermann RB, Nunn ME, Lavrin DH: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16: 216, 1975.
97. Hewitt HB, Blake ER: Failure of preoperative C. parvum vaccine to modify secondary disease following excision of two non-immunogenic murine carcinomas. *Br J Cancer* 38: 219, 1978.
98. Hewitt HB, Blake ER, Walden AS: A critique of the evidence

for active host defence, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. Br J Cancer 33: 241, 1976.

99. Hochman PS, Cudkowicz G: Suppression of natural cytotoxicity by spleen cells of hydrocortisone-treated mice. J Immunol 123, 1979.

100. Hooghe R: Cancer: le controle de la dissemination. La Recherche 15: 866, 1984.

101. Irimura T, Gonzalez R, Nicolson GL: Effects of tunicamycin on B16 metastatic melanoma cell surface glycoproteins and blood-borne arrest and survival properties. Cancer Res 41: 3411, 1981.

102. Janik P, Bertram JS, Szanlawska B: Modulation of lung tumor colony formation by a subcutaneously growing tumor. JNCI 66: 1155, 1981.

103. Jones PDE, Castro JE: Immunological mechanisms in metastatic spread and the antimetastatic effect of *C. parvum*. Br J Cancer 35: 519, 1977.

104. Keller R: Induction of microscopic metastases via surgery. Invasion Metastasis 1: 136, 1981.

105. Keller R: Elicitation of macroscopic metastases via surgery: various forms of surgical intervention differ in their induction of metastatic growth. *Invasion Metastasis* 3: 183, 1983.

106. Keller R: Macrophages in primary and secondary tumor growth: some implications for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 39: 7, 1985.

107. Kerbel RS, Davies AJS: The possible biological significance of Fc receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. *Cell* 3: 105, 1974.

108. Kerbel RS, Dennis JW, Lagarde AE, Frost P: Tumor progression in metastasis: An experimental approach using lectin resistant tumor variants. *Cancer Metas Rev* 1: 99, 1982.

109. Kerbel RS, Lagarde AE, Dennis JW, Nestel FP, Donaghue TP, Siminovitch L, Fulchignoni-Lataud MC: Relevance of spontaneous in vivo tumor-host cell fusion to tumor progression and metastasis evaluated using a series of lectin-resistant mutant tumor sublines. De "Cancer Invasion and Metastasis; Biologic and Therapeutic Aspects", Nicolson GL & Milas L (eds) p 47, Raven Press, NY, 1984.

110. Kiesling R, Klein E, Pross H, Wigzell H: "Natural" killers

cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur J Immunol 5: 117, 1975.

111. Kim U: Metastasizing mammary carcinomas in rats; Induction and study of their immunogenicity. Science 162: 72, 1970.

112. Kinsey DL: An experimental study of preferential metastasis. Cancer 13: 674, 1960.

113. Klein S, Bonaparte YP, D'Elia I: Enhancement of the incidence of metastasis in tumor-resected mice. Influence of soluble tumor extract and splenectomy. Invasion Metastasis 5: 309, 1985.

114. Klein S, Colombo LL: Influencia del tumor primario sobre el desarrollo de metastasis artificiales en pulmon. Medicina (Bs Aires) 45: 330, 1985.

115. Klein S, Colombo LL, D'Elia IS, Bonaparte YP: Diferente inmunogenicidad de dos tumores de mama murinos con distinta capacidad metastasica en pulmon. Medicina (Bs Aires) 40: 826, 1980.

116. Kripke ML, Gruys E, Fidler IJ: Metastastic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of



recent origin. *Cancer Res* 38: 2962, 1978.

117. Kwan E, Mishell RI: Fc and complement receptors. In "Selected methods in Cellular Immunology", Mishell BB & Shiigi SM (eds), p. 219, WH Freeman & Company, San Francisco, 1980.

118. Levy MH, Wheelock EF: Effects of intravenous silica on immune and non-immune functions of the murine host. *J. Immunol* 115: 41, 1975.

119. Liotta LA, Gattozi C, Kleinerman J, Saidel G: Reduction of tumor cell entry into vessels by BCG-activated macrophages. *Br J Cancer* 36: 639, 1977.

120. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel G: The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 36: 889, 1976.

121. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636, 1983.

122. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart IR, Foltz CM, Shafie SM: Metastatic propensity correlates with tumor cell degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67, 1980.

123. Mashiva H, Matsunaga K, Hata K, Hosoi M, Nomoto K: The role

of macrophages in preventing metastasis of a homotransplantable hamster lymphoma. *Gann* 74: 548, 1983.

124. Maugh II TH, Marx JL: *Seeds of destruction*. Plenum Press, NY, 1975.

125. Meiss RP, Bonfil RD, Ruggiero RA, Pasqualini CD: Histological aspects of concomitant resistance induced by non-immunogenic murine tumors. *JNCI* (en prensa), 1986.

126. Meissner WA, Diamandopoulos G, Th: *Neoplasia*. En "Pathology", Anderson WAD, Kissane JM (eds), Vol. 1. The C.V. Mosby Co; 7 ed., 1977.

127. Milas L, Hunter N, Mason K, Withers HR: Immunological resistance to pulmonary metastases in C3hf/Bu mice bearing syngeneic fibrosarcoma of different sizes. *Cancer Res* 34: 61, 1974.

128. Nanni P, De Giovanni C, Lollini PG, Nicoletti G, Prodi G: Clones with different metastatic capacity and variant selection during metastasis: A problematic relationship. *JNCI* 76: 87, 1986.

129. Nestel FP, Casson PR, Wiltrout RH, Kerbel RS: Alterations in sensitivity to nonspecific cell-mediated lysis associated

with tumor progression: characterization of activated macrophage- and natural Killer cell-resistant tumor variants. JNCI 73: 483, 1984.

130. Nicolson GL: Metastasis cancerosas. Investigacion y Ciencia 32: 22, 1979.

131. Nicolson GL, Irimura T, Nakajima M, Estrada J: Metastatic cell attachment to and invasion of vascular endothelium and its underlying basal lamina using endothelial cell monolayers. De "Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects", Nicolson GL & Milas L (eds). p. 145, Raven Press, NY, 1984.

132. Nicolson GL, Poste G: Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis - Part I- Properties of metastatic cells. Curr Prob Cancer VII, 1982.

133. Nicolson GL, Poste G: Tumor cell diversity and host responses in cancer metastasis - Part II-. Host immune responses and Therapy of metastasis. Curr Prob Cancer VII, 1983.

134. Nicolson GL, Poste G: Tumor implantation and invasion ar metastatic sites. Int Rev Exptl Pathol 25: 77, 1983.

135. North RJ, Dye ES, Mills CD: T cell-mediated negative regulation of concomitant antitumor immunity as an obstacle to adoptive immunotherapy of established tumors. En "The potential role of T cells in cancer therapy", Fefer & Goldstein (eds) p. 65, Raven Press, NY, 1982.

136. Nowell P: The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194: 23, 1976.

137. Oehl S, Schuening F, Schmidt CG: Growth inhibition of simulated metastases by a large primary tumor. En "Metastasis. Clinical and experimental aspects", Hellmann K, Hilgard P, Eccles S (eds), Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 65, 1980

138. Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast . Lancet 1: 571, 1839 (Citado por cita 60)

139. Pimm MV, Embleton MJ, Baldwin RW: Multiple antigenic specificities within primary 3-methylcholanthrene- induced rat sarcomas and metastases. Int J Cancer 25: 621, 1980.

140. Pitot HC: Fundamentals of Oncology. Marcel Dekker, Inc., NY, 1978.

141. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA, Unanue ER: Activated macrophages induced vascular proliferation. Nature 269: 804, 1977.

142. Poste G: Sublethal autolysis: Modification of the cell periphery by lysosomal enzymes. Exp Cell Res: 67: 11, 1971.

143. Poste G, Doll J, Brown AE, Tzeng J, Zeidman I: A comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors and individual lung tumors. Cancer Res 42: 2770, 1982.

144. Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ: In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue invasive properties. Cancer Res 40: 1636, 1980.

145. Poste G, Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis. Nature 283: 139, 1980.

146. Poste G, Greig R, Tzeng J, Koestler T, Corwin S: Interactions between tumor cell subpopulations in malignant tumors. De "Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects", Nicolson GL & Milas L (eds), p. 223, Raven Press, NY, 1984.

147. Poste G, Nicolson GL: Arrest and metastasis of a

blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrana vesicles from highly metastatic cells. Proc Natl Acad Sci USA 77: 399, 1980.

148. Prehn RT: Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. JNCI 45: 1039, 1970.

149. Prehn RT: The immune reaction as a stimulator of tumor growth. Science 176: 170, 1972.

150. Price JE, Barth RF, Johnson CW, Staubus AE: Injection of cells and monoclonal antibodies into mice: Comparison of tail vein and retroorbital routes. Proc Soc Exp Biol Med 177: 347, 1984.

151. Proctor JW, Mastromatteo WP, Antos M, Hedderson ED: Variations in the level of haematogenous antitumour immunity during progressive tumour growth and spontaneous blood-borne metastatic spread. Oncology 6: 151, 1979.

152. Proctor JW, Rudenstam CM, Alexander P: A factor preventing the development of lung metastases in rats with sarcomas. Nature 242, 1973.

153. Puricelli L, Colombo LL, Bal de Kier Joffe E, Lustig ES: Invasiveness in vitro of two mammary adenocarcinoma tumors with

different metastasizing ability. *Invasion Metastasis* 4: 238, 1984.

154. Reading CL, Kraemer PM, Miner KM, Nicolson GL: In vivo and in vitro properties of malignant variants of RAW 117 metastatic murine lymphoma / lymphosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 1: 135, 1983.

155. Reddy AL, Fialkow PJ: Multicellular origin of fibrosarcomas in mice induced by the chemical carcinogen 3-methylcholanthrene. *J Exp Med* 150: 878, 1979.

156. Reizenstein P: Macrophages, NK cells, NK like cells, and tumor surveillance in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 39: 1, 1985.

157. Ron Y, Gorelik E, Feldman M, Segal S: Effect of splenectomy on the progression of postoperative pulmonary metastases of the 3LL tumor. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18: 391, 1982.

158. Ruggiero RA, Bonfil RD, Pasqualini CD: Etiologia del cancer: Hacia una teoria unificada. *Sangre* 29: 52, 1984.

159. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, Pasqualini CD: "Concomitant immunity" in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 51: 1985.

160. Ruggiero RA, Lanari C, Bonfil RD, Bustuoabad OD, Pasqualini CD: Actividad antimitotica en el suero de ratones portadores de tumores inductores de resistencia concomitante. Medicina (Bs Aires) 45: 330, 1985.

161. Rygaard J: Mouse models and tumor metastases with special reference to the athymic nude mouse. 13th International Cancer Congress, Part C. Biology of Cancer (2), p. 37, Alan R. Liss, Inc. NY, 1983.

162. Saijo N, Ozaki A, Beppu Y, Takahashi K, Fujita J, Sasaki Y, Nomori H, Kimata M, Shimizu E, Hoshi A. Analysis of metastatic spread and growth of tumor cells in mice with depressed natural killer activity by anti-asialo GM1 antibody or anticancer agents. J Cancer Res Clin Oncol 107: 157, 1984.

163. Salomon JC: Les metastases des cancers. La Recherche 13: 52, 1982.

164. Schatten WE: An experimental study of postoperative tumor metastases. I. Growth of pulmonary metastases following total removal of primary leg tumor. Cancer 11: 455, 1958.

165. Schirmacher V: Cancer metastasis: experimental approaches theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. Adv



Cancer Res 43: 1, 1985.

166. Schirrmacher V, Jacobs W: Tumor metastases and cell-mediated immunity in a model system in DBA/2 mice. VII. Expression and shedding of Fc receptors on metastatic tumor cell variants. J Supramol Struct 11: 105, 1979.

167. Seaman WE, Blackman MA, Gindhart TD, Roubinian JR, Loeb JM, Talal N: B-estradiol reduces natural killer cells in mice. J Immunol 121: 2193, 1978.

168. Shanmugaratnam K: Heredity and environment in geographic variations in cancer incidence. En "Advances in medical oncology research and education", Vol. 3: Epidemiology, Birch J (ed), p.189 Pergamon Press, NY, 1979.

169. Sidky YA, Averbach RJ: Lymphocyte induced angiogenesis: A quantitative and sensitive assay of the graft versus host reaction. J Exp Med 141: 1084, 1975.

170. Sinha BK, Goldenberg GJ: The effect of trypsin and neuraminidase on the circulation and organ distribution of tumor cells. Cancer 34: 1956, 1974.

171. Siracky J: An approach to the problem of heterogeneity of human tumor-cell populations. Br J Cancer 39: 570, 1979.

172. Slemmer GT: Host response to antigenic tissues during progression and metastasis of breast neoplasia. En "Tumor progression", Crispen RG (eds), p.3, Elsevier North Holland, NY, 1979.

173. Sluysen M, Van Nie R: Estrogen receptor content and hormone-responsive growth of mouse mammary tumors. Cancer Res 34: 3253, 1974.

174. Stackpole CW: Distinct lung-colonizing and lung-metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. Nature 289: 798, 1981.

175. Stutman O: Immunodepression and malignancy. Adv Cancer Res 22: 261, 1975.

176. Stutman O: Spontaneous, viral and chemically induced tumors in the nude mouse. En "The nude mouse in experimental and clinical research". Fogh J, Giovanella BC (eds), p.411, Academic Press, NY, 1978.

177. Stutman O: NK cells, antitumor surveillance and interleukins. Immunol Today 17: 205, 1981.

178. Stutman O: The immunological surveillance hypothesis. De

"Basic and Clinical Tumor Immunology", Herberman RB (ed), p. 1.  
Martinus Nijhoff Publishers. Boston, 1983.

179. Sugarbaker EV, Cohen AM: Altered antigenicity in spontaneous pulmonary metastases from an antigenic murine sarcoma. *Surgery* 72: 155, 1972.

180. Sugarbaker EV, Ketcham AS: Mecanismos y prevencion de la diseminacion del cancer: Conceptos. De "Seminarios de Oncologia: Metastasis. Gilbert HA & Kagan AR (eds) Ed. Panamericana, Cap 2, 1978.

181. Suess R, Kinzel V, Scribner JD: Cancer: Experiments and concepts. Springer-Verlag, 1973.

182. Talmadge JE, Fidler IJ: Cancer metastasis is selective or random depending on the parent tumor population. *Nature* 297: 593, 1982.

183. Talmadge JE, Key ME, Fidler IJ: Macrophage content of metastatic and nonmetastatic rodent neoplasms. *J Immunol* 126: 2245, 1981.

184. Talmadge JE, Meyers KM, Prieur DJ, Starkey JR: Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature* 284: 622, 1980.

185. Todaro GJ, Huebner RJ: The viral oncogene hypothesis: New evidence. Proc Natl Acad Sci USA 69: 1009, 1972.

186. Upton AC: Principios de la biología del cáncer; etiología y prevención del cáncer. En "Cáncer: principios y práctica de oncología", De Vita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Capítulo 2, Tomo I, Salvat, España, 1984.

187. Urban JL, Schreiber H: Selection of macrophage-resistant progressor tumor variants by the normal host. Requirement for concomitant T cell-mediated immunity. J Exp Med 157: 642, 1983.

188. Vaage J: Concomitant immunity and specific depression of immunity by residual or reinjected syngeneic tumor tissue. Cancer Res 31: 1655, 1971

189. Vaage J: In vivo and in vitro lysis of mouse cancer cells by antimetastatic effectors in normal plasma. Cancer Immunol Immunother 4: 257, 1978.

190. Varani J, Orr W, Ward PA: Hydrolytic enzyme activities, migratory activity and in vivo growth and metastatic potential of recent tumor isolates. Cancer Res 39: 2376, 1979.

191. Weinberg RA: A molecular basis of cancer. Scientific American

249: 102, 1983.

192. Weiss L: Tumor necrosis and cell detachment. Int J Cancer 20: 87, 1977.

193. Weiss L: Some mechanisms involved in cancer cell detachment by necrotic material. JNCI 43: 1045, 1978.

194. Weiss L, Holmes JC, Ward PM: Do metastases arise from pre-existing subpopulations of cancer cells? Br J Cancer 47: 81, 1983.

195. Weiss L, Ward PM: Cell detachment and metastasis. Cancer metastasis Rev 2: 111, 1983.

196. Wiltrout RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green Jr KM, Talmadge JE: Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. J Immunol 134: 4267, 1985.

197. Witz IP, Ran M: Could Fc-receptors facilitate the escape of immunogenic premalignant cells from host defence? A hypothesis. Ann Inst Pasteur/Immunol 136: 423, 1985.

198. Yuhas JM, Pazmiño NH, Wagner E: Development of concomitant immunity in mice bearing the weakly immunogenic line 1 lung

carcinoma. *Cancer Res* 35: 235, 1975.

199. Zeidman I: Metastasis: A review of recent advances. *Cancer Res* 17: 157, 1957.

regiones no necróticas y poseían un tamaño similar (aprox. 0,5 cc.)

(b) = En cada uno de los pocillos experimentales la mitad del volumen correspondía al extracto y la otra mitad a solución fisiológica. La dosis mayor del extracto de MM3 poseía 3,4 mg proteínas /ml, mientras que la mayor de M3 poseía 3,7 mg/ml. En ambos casos las dosis menores estaban diluidas a la mitad.

Según test U de Mann-Whitney: A vs E:  $p=0,002$ ; B vs E:  $p<0,05$ ; C vs E:  $p<0,01$ ; D vs E:  $p=0,01$ ; B vs F:  $p=0,01$ ; C vs F:  $p=0,05$ ; D vs F:  $p=0,01$ ; E vs F:  $p=0,01$ .