

## Tesis de Posgrado

# Heterogeneidad celular en tumores de mama humanos : modificaciones del crecimiento y diferenciación por hormonas y factores de crecimiento

Resnicoff, Mariana

1989

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](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:**

Resnicoff, Mariana. (1989). Heterogeneidad celular en tumores de mama humanos : modificaciones del crecimiento y diferenciación por hormonas y factores de crecimiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2198\\_Resnicoff.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2198_Resnicoff.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Resnicoff, Mariana. "Heterogeneidad celular en tumores de mama humanos : modificaciones del crecimiento y diferenciación por hormonas y factores de crecimiento". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2198\\_Resnicoff.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2198_Resnicoff.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"HETEROGENEIDAD CELULAR EN TUMORES DE MAMA HUMANOS: MODIFICACIONES  
DEL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION POR HORMONAS Y FACTORES DE  
CRECIMIENTO"

Autor: Mariana Resnicoff

Director: Estela E. Medrano

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar"

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Año 1989

2.198  
Ej: 2.

"A mis padres"

## AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas e instituciones que de uno u otro modo colaboraron en la realización de este trabajo de tesis. Quiero expresar aquí mi especial agradecimiento:

- a la Dra. Estela E. Medrano, directora de esta tesis, por su entusiasmo, por el aporte de ideas y proyectos siempre fructíferos, por escuchar atentamente mis propuestas y por haberme permitido libertad de acción en el trabajo.
- a la "Fundación Campomar", en la persona de los miembros de la Comisión Directiva, por haber permitido la realización del presente trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.
- a la Fundación "María Calderón de la Barca" por haberme otorgado la beca que posibilitó este trabajo de investigación y por haber confiado en mí durante estos años.
- a Eduardo Cafferata por sus prácticas enseñanzas en las técnicas de cultivo de células y por su eficiente y responsable colaboración técnica durante todos estos años.
- a mis compañeros de laboratorio -Eduardo Cafferata, Marcela Ferraro, Silvia González y Ariel Wilner- y a Tony Coira, por los momentos tan agradables y divertidos que compartimos en nuestro lugar de trabajo y por haber permitido, gracias a su amistad y afecto, que todo resultara más fácil y placentero.
- a Fernando Larcher, Silvana Ragone, Beatriz Molinari, Irene Larripa, Irma Slavutsky, Inés Bravo y Osvaldo Podhajcer por su colaboración en la realización de algunos experimentos.

- a Hilda Gasparoli por su constante dedicaci3n, apoyo y colaboraci3n proporcionados durante estos a1os.
- a Irene Cangiano por su disposici3n y dedicaci3n en la transcripci3n y procesamiento de textos de esta tesis.
- a Fernando Massironi y a la Sra. Beile Wolf por haberme simplificado los tr3mites administrativos.

Finalmente quiero agradecer muy especialmente a mis padres por su constante apoyo, inclusive econ3mico.

Parte de los resultados descriptos en el presente trabajo de tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

- "13-cis-retinal stimulates proliferation and induces intranuclear protein accumulation in the human mammary tumor cells MCF-7".

M. Resnicoff and E.E. Medrano.

(1987) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 143:309-315.

- "Subpopulations of MCF-7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: a model to analyze the heterogeneity of human breast cancer".

M. Resnicoff, E.E. Medrano, O.L. Podhajcer, A.I. Bravo, L. Bover and J. Mordoh.

(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7295-7299.

- "Effect of estradiol and tamoxifen on the anchorage-independent growth of the subpopulations derived from MCF-7 breast carcinoma cells. Cytogenetic analysis of the stem cell subpopulation".

O.L. Podhajcer, M. Resnicoff, L. Bover, E.E. Medrano, I. Slavutsky, I. Larripa and J. Mordoh.

(1988) Exptl. Cell Res. 179:58-64.

- "Células epitelioides de tumor de mama humano: un modelo para el estudio de factores de crecimiento liberados durante el proceso de la coagulación".

E.E. Medrano, M. Resnicoff, F. Larcher, E.G.A. Cafferata y M. Vizcargüénaga.

(1988) Fisiopatología y clínica de las hormonas de crecimiento, editada por la Sociedad Argentina de Endocrinología, p. 25-38.

- "Growth factors and hormones which affect survival, growth and differentiation of the MCF-7 stem cells and their descendants".  
M. Resnicoff and E.E. Medrano.  
(1989) Exptl. Cell Res. (en prensa).
  
- "Relevant aspects of MCF-7 human breast tumor cell growth which are expressed only in the absence of serum".  
E.E. Medrano, M. Resnicoff, E.G.A. Cafferata, F. Larcher, O.L. Podhajcer, L. Bover and B. Molinari.  
(1989) Exptl. Cell Res. (en prensa).

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico  
AMP<sub>c</sub>: adenosina 5' monofosfato cíclico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARN<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensajero  
BSA: seroalbúmina bovina  
But: butirato de sodio  
CEA: antígeno carcinoembrionario  
Ci: Curie  
cpm: cuentas por minuto  
DMSO: dimetilsulfóxido  
E<sub>2</sub>: 17 $\beta$ -estradiol  
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
FBS: suero fetal bovino  
GTP: guanosina 5' trifosfato  
Ig: inmunoglobulina  
IGF: factor de crecimiento semejante a insulina  
kDa: kilodaltons  
M: molar  
MC: medio condicionado  
Met: metionina  
mM: milimolar  
MQD: medio químicamente definido  
ng: nanogramo  
PBS: solución salina de buffer fosfato  
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas



Pg: prostaglandina  
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro  
Ral: 13-cis-retinal  
RE: receptores estrogénicos  
rpm: revoluciones por minuto  
SDS: sodio dodecil sulfato  
SGF: factor de crecimiento de sarcoma  
TCA: ácido tricloroacético  
TGF: factor de crecimiento transformante  
Thr: trombina  
TLI: índice de marcación con timidina  
Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol  
U: unidades  
ug: microgramo

## INDICE

	Página NQ
<u>RESUMEN</u> .....	1
 <u>INTRODUCCION</u>	
1. Heterogeneidad tumoral .....	9
2. Regulación del crecimiento celular .....	10
3. Crecimiento autócrino en células transformadas .....	16
4. Cultivo de líneas celulares tumorales humanas .....	19
5. Factores de crecimiento .....	21
5.1. Factores tipo I: PDGF .....	23
5.2. Factores tipo II: somatomedinas .....	26
5.3. Factores tipo III .....	28
5.3.1. EGF .....	29
5.3.2. Trombina .....	31
5.3.3. Prostaglandina F <sub>2α</sub> .....	34
6. Efectores o moduladores del crecimiento celular .....	35
6.1. Dimetilsulfóxido .....	35
6.2. Butirato de sodio .....	36
6.3. Compuestos retinoideos: derivados de la Vitamina A .....	38
 <u>OBJETIVOS DE ESTA TESIS</u> .....	 41

## MATERIALES Y METODOS

1. Células .....	42
2. Medios de cultivo .....	42
3. Medios de cultivo libres de metionina .....	42
4. Factores de crecimiento .....	43
5. Moduladores de la diferenciación celular .....	44
6. Cultivo celular .....	44
7. Curvas de crecimiento celular .....	44
8. Marcación de proteínas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	45
8.1. Determinación de las proteínas marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina secretadas al medio de cultivo ...	45
8.2.1. Determinación de las proteínas intracelulares marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	46
8.2.2. Determinación de las proteínas intracelulares (nucleares y citoplasmáticas) marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	46
9. Determinación de proteínas .....	47
10. Medición de transporte .....	47
11. Determinación de queratinas	
11.1. Análisis de Western blot .....	48
11.2. Técnica inmunocitoquímica .....	49
12. Marcación de proteínas con ( <sup>32</sup> P)-ortofosfato .....	49
13. Separación de las células MCF-7 en subpoblaciones	50
14. Ensayos clonogénicos en agar blando .....	51
15. Determinación del efecto de factores de crecimiento sobre células quiescentes .....	51

16. Determinación del "TLI": porcentaje de núcleos mitóticos marcados con metil-( <sup>3</sup> H)-timidina .....	52
17. Determinación de receptores estrogénicos (RE) por la técnica inmunocitoquímica .....	52
18. Determinación de antígeno carcinoembrionario (CEA) por la técnica inmunocitoquímica .....	54
19. Determinación de la proteína p21, codificada por el gen ras, utilizando la técnica inmunocitoquímica ..	55
20. Tinción de lípidos con "oil red O" .....	55
21. Obtención de los medios condicionados .....	56
22. Microscopía electrónica .....	56
23. Análisis citogenético .....	57

## RESULTADOS

A. Análisis de heterogeneidad celular	
A.1. Distribución de las células en gradientes de densidad .....	58
A.2. Análisis de las distintas subpoblaciones .....	60
A.2.1. Capacidad de generar otras subpoblaciones .....	60
A.2.2. Capacidad proliferativa .....	62
A.2.3. Crecimiento independiente del anclaje .....	65
A.2.4. Expresión de distintos marcadores celulares ....	68
A.2.4.1. Expresión de la proteína p21, codificada por el oncogen ras .....	68
A.2.4.2. Determinación del contenido de receptor estrogénico (RE) .....	70
A.2.4.3. Expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA)	71

A.2.4.4. Contenido de lípidos .....	72
A.2.5. Respuesta a distintos factores de crecimiento	72
A.2.5.1. Efecto de diversos factores de crecimiento sobre las subpoblaciones quiescentes .....	72
A.2.5.1.1. Efecto de insulina .....	75
A.2.5.1.2. Efecto de trombina .....	75
A.2.5.1.3. Efecto de $\text{PgF}_2\alpha$ .....	77
A.2.5.1.4. Efecto de estradiol .....	77
A.2.5.1.5. Efecto de PDGF, EGF y una combinación de ambos.....	77
A.2.5.2. Efecto de diversos factores de crecimiento sobre las subpoblaciones en activa proliferación	78
A.2.5.2.1. Efecto de trombina .....	78
A.2.5.2.2. Efecto de $\text{PgF}_2\alpha$ .....	79
A.2.5.2.3. Efecto de EGF .....	81
A.2.5.2.4. Efecto de la combinación PDGF/EGF .....	81
A.2.5.3. Efecto de factores de crecimiento sobre la supervivencia de las subpoblaciones cultivadas en un medio libre de suero .....	83
A.2.5.3.1. Rescate con trombina .....	83
A.2.5.3.2. Rescate con $\text{PgF}_2\alpha$ .....	85
A.2.5.3.3. Rescate con estradiol .....	85
A.2.6. Fosforilación de las proteínas presentes en las subpoblaciones cultivadas en presencia o ausencia de suero .....	86
A.3. Análisis citogenético de la subpoblación E y de la línea parental .....	88

A.4. Interacciones entre las subpoblaciones	
A.4.1. Contribución de la subpoblación E al crecimiento de la línea celular MCF-7 .....	89
A.4.2. Efecto de los medios condicionados	
A.4.2.1. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación celular	
A.4.2.1.1. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación de la subpoblación E .....	91
A.4.2.1.2. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación de la subpoblación F .....	93
A.4.2.2. Efecto de los medios condicionados sobre el crecimiento independiente del anclaje	
A.4.2.2.1. Efecto del medio condicionado por la subpoblación F sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación E .....	93
A.4.2.2.2. Efecto del medio condicionado por la subpoblación E sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación F .....	95
B. Crecimiento de las células MCF-7 en el medio libre de suero	
B.1. Requerimiento de factores de crecimiento .....	98
B.1.1. Requerimiento de factores de crecimiento manifestado al plaquear las células a baja densidad ...	98
B.1.2. Requerimiento de factores de crecimiento manifestado al plaquear las células a alta densidad	100
B.2. Ultraestructura de las células MCF-7 cultivadas en el medio químicamente definido .....	102

B.2.1. Microscopía electrónica de las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero .....	104
B.2.2. Determinación de queratinas .....	104
B.3. Análisis de las proteínas marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	106
B.3.1. Análisis de las proteínas celulares .....	106
B.3.2. Análisis de las proteínas liberadas al medio de cultivo .....	109
B.4. Análisis de los medios condicionados obtenidos a partir de las células cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido .....	109
B.5. Crecimiento independiente del anclaje .....	112
B.6. Distribución de las células en gradientes de densidad de Percoll .....	117
B.7. Expresión de marcadores celulares .....	117
B.7.1. Expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA) .....	117
B.7.2. Expresión de la proteína p21, codificada por el oncogen ras .....	119
B.7.3. Expresión de receptores estrogénicos (RE) .....	119
C. Efecto de los moduladores de la diferenciación	
C.1. 13-cis retinal	
C.1.1. Efecto del 13-cis retinal sobre la proliferación celular .....	124
C.1.2. Efecto del 13-cis retinal sobre la síntesis de proteínas celulares y liberadas al medio de cultivo .....	126
C.1.3. Efecto del 13-cis retinal sobre el crecimiento	

independiente del anclaje .....	130
C.1.4. Efecto del 13-cis retinal sobre la distribución de las células en gradientes de densidad .....	130
C.1.5. Efecto del 13-cis retinal sobre las subpoblacio- nes aisladas .....	132
C.2. Dimetilsulfóxido .....	135
C.2.1. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la prolifera- ción celular .....	135
C.2.2. Efecto del DMSO sobre la diferenciación celular	137
C.3. Butirato de sodio	
C.3.1. Efecto del butirato de sodio sobre la prolifera- ción celular .....	139
C.3.2. Efecto del butirato de sodio sobre la diferencia- ción celular .....	141
C.4. Combinación de moduladores de la diferenciación	
C.4.1. Efecto sobre la proliferación celular .....	141
D. Crecimiento de la línea celular en suspensión	
D.1. Obtención de la línea celular en suspensión .....	145
D.2. Análisis de las células	
D.2.1. Curvas de crecimiento celular .....	147
D.2.2. Distribución de las células en gradientes de den- sidad .....	147
D.2.3. Crecimiento independiente del anclaje .....	149
D.2.4. Contenido de receptores estrogénicos .....	149
D.2.5. Respuesta a factores de crecimiento .....	150
D.2.6. Efecto de moduladores de la diferenciación celu- lar	



D.2.6.1. Efecto del 13-cis retinal .....	150
D.2.6.2. Efecto del butirato de sodio .....	150

## DISCUSION

1. Heterogeneidad celular .....	151
2. Crecimiento de las células en el medio libre de suero	
2.1. Requerimiento de factores de crecimiento .....	158
2.2. Ultraestructura de las células .....	165
3. Moduladores de la diferenciación celular	
3.1. Efectos del 13-cis retinal .....	168
3.2. Efectos de agentes inductores de la diferenciación DMSO y butirato de sodio .....	170
3.3. Efectos del estradiol .....	172

<u>CONCLUSIONES GENERALES</u> .....	175
-------------------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	177
---------------------------	-----

## LISTA DE FIGURAS

Página N<sup>o</sup>

### INTRODUCCION

I.1. Esquema de la jerarquía celular, producto de la diferenciación de la célula "stem" .....	11
I.2. Diagrama de los mecanismos de secreción endócrino (I), paracrino (II) y autócrino (III).....	13
I.3. Ciclo celular regulado .....	15

### RESULTADOS

1. Distribución de las células MCF-7 y T-47D (inserto) en gradientes de densidad de Percoll .....	59
2. Distinta capacidad de las subpoblaciones E y A para dar origen a todas las subpoblaciones que componen la línea parental .....	61
3. Curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones .....	63
4. Índice de marcación con timidina (TLI) y expresión de diversos marcadores: proteína p21, producto del gen ras (p21 <sup>ras</sup> ), receptores estrogénicos (RE) y antígeno carcinoembrionario (CEA) en las distintas subpoblaciones, medidas al cabo de 1 y 3 días de cultivo .....	64
5. Determinación del índice de marcación con timidina (I) y expresión de diversos marcadores: proteína p21, codificada por el gen ras (II), receptores estrogénicos	

cos (III) y antígeno carcinoembrionario (IV) en las subpoblaciones aisladas .....	66
6. Tinción de lípidos con "oil red O" en las subpoblaciones aisladas .....	73
7. Efecto de diversos factores de crecimiento (trombina, EGF y PDGF) sobre las subpoblaciones aisladas .....	80
8. Efecto de $PgF_2\alpha$ sobre el crecimiento de las subpoblaciones B, C y D .....	82
9. Distribución de las células de la subpoblación C tratadas con $PgF_2\alpha$ y de la subpoblación D tratadas con trombina durante 5 días, en gradientes de densidad de Percoll .....	84
10. Curvas de crecimiento de las células MCF-7 parentales, "MCF-7 reconstituidas" y "MCF-7 (-E)" .....	90
11. Efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones sobre el crecimiento de la subpoblación E .....	92
12. Efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones sobre el crecimiento de la subpoblación F .....	94
13. Efecto del medio condicionado por la subpoblación E sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación F .....	96
14. Curvas de crecimiento de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido .....	101
15. Morfología de las células MCF-7 cultivadas en pre-	

sencia o ausencia de suero .....	103
16. Microscopía electrónica de las células MCF-7 .....	105
17. Citoqueratinas reveladas por la técnica de la inmunoperoxidasa con anticuerpos de conejo dirigidos contra queratinas humanas .....	107
18. Electroforesis en geles bidimensionales de proteínas celulares marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	108
19. Autorradiografía del gel monodimensional de proteínas secretadas al medio de cultivo marcadas con ( <sup>35</sup> S)-metionina .....	111
20. Diferenciación de las células CHEF/18 mediada por el medio condicionado de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero .....	114
21. Crecimiento independiente del anclaje de las células MCF-7 .....	116
22. Expresión de antígeno carcinoembrionario, revelado por la técnica inmunocitoquímica .....	120
23. Determinación de la proteína p21, codificada por el gen ras (A y B) y receptores estrogénicos (C y D) en células MCF-7 .....	121
24. Efecto del 13-cis retinal sobre el crecimiento de las células MCF-7 .....	125
25. Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-metionina al material soluble en presencia de TCA en células MCF-7 controles y crónicamente tratadas con 13-cis retinal .....	129
26. Crecimiento independiente del anclaje de las células MCF-7 crónicamente tratadas con 13-cis retinal	131

27. Efecto del 13-cis retinal sobre las subpoblaciones A, B y E .....	134
28. Efecto del DMSO sobre el crecimiento de las células MCF-7 .....	136
29. Efecto del butirato de sodio sobre el crecimiento de las células MCF-7 .....	140
30. Efecto del butirato de sodio sobre la distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad de Percoll .....	142
31. Efecto del 13-cis retinal y del butirato de sodio (agregados por separado o en combinación) sobre el crecimiento de las células MCF-7 adheridas al sustrato, en presencia o ausencia de suero, y en suspensión .....	143
32. Morfología que presenta la subpoblación B de las células MCF-7 luego del tratamiento con estradiol o DMSO .....	146
33. Curvas de crecimiento de las células MCF-7 en suspensión y en presencia de suero .....	148

## LISTA DE TABLAS

	<u>Página</u>	<u>Nº</u>
I. Crecimiento independiente del anclaje de las subpoblaciones aisladas .....	67	
II. Crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación E: influencia del suero y del aporte hormonal .....	69	
III. Incorporación de ( <sup>3</sup> H)-timidina en las subpoblaciones quiescentes: efecto de distintos factores de crecimiento .....	76	
IV. Fosforilación de las subpoblaciones cultivadas en presencia o ausencia de suero .....	87	
V. Requerimiento de factores de crecimiento de las células MCF-7 cuando se plaquean a baja densidad celular .....	99	
VI. Síntesis de proteínas en las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido durante 3 días .....	110	
VII. Efecto de los medios condicionados de las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero sobre el crecimiento de la línea celular CHEF/18 .....	113	
VIII. Crecimiento independiente del anclaje de las células MCF-7 cultivadas en el medio libre de suero .....	115	
IX. Distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad de Percoll .....	118	
X. Expresión de receptores estrogénicos en células		

MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero	123
XI. Efecto del 13-cis retinal sobre la síntesis y acumu lación de proteínas en células MCF-7 .....	127
XII. Efecto del 13-cis retinal sobre la distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad de Percoll .....	133
XIII. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la diferencia- ción de las células MCF-7 .....	138

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis estuvo dedicado al estudio de la línea celular de tumor de mama humano MCF-7 considerando su heterogeneidad celular, sus características de crecimiento en un medio químicamente definido y su respuesta a diversos factores de crecimiento, hormonas y agentes moduladores de la diferenciación.

### A. Heterogeneidad celular

La línea celular MCF-7 en crecimiento exponencial se separó, utilizando gradientes de densidad de Percoll, en 6 subpoblaciones distintas (A a F). Estas subpoblaciones se subcultivaron y caracterizaron en base a distintas propiedades: capacidad de generar todas las subpoblaciones, velocidad de crecimiento, capacidad de síntesis de ADN, eficiencia clonogénica, y expresión de diversos marcadores: proteína p21, producto del gen ras, receptores estrogénicos, antígeno carcinoembrionario y lípidos teñidos con el colorante "oil red O".

La subpoblación E constituyó el 5% de la población total; fue la única subpoblación capaz de generar todas las subpoblaciones y ninguna otra subpoblación la originó; fue la de mayor capacidad proliferativa, determinada a través de curvas de crecimiento y de síntesis de ADN, y fue la de mayor eficiencia clonogénica ( $6,62 \pm 1,18$ )%. El análisis cariotípico de la subpoblación E reveló la presencia de los mismos marcadores descritos para la línea celular parental MCF-7. Este resultado permitió descartar la posibilidad de que dicha subpoblación correspondiera a un clon obte-



nido en forma aislada, a la vez que sugirió que su mayor velocidad de crecimiento se debe a que está enriquecida en células "stem". Dicha subpoblación resultó imprescindible para mantener el crecimiento de la línea celular dado que en su ausencia, el crecimiento observado a las 48 horas correspondió al 60% del control y fue de apenas el 20% al cabo de 6 días de cultivo. El crecimiento se recuperó al agregar medio condicionado por la subpoblación E diluido con medio fresco (1:1).

La subpoblación F resultó ser la más densa y la de mayor grado de diferenciación dado que fue la de menor capacidad proliferativa, constituyó el estadio terminal o "punto final" de las demás subpoblaciones y presentó el mayor porcentaje de células cuyos lípidos se tiñeron con el colorante "oil red O".

En base a los resultados presentados en este trabajo se pudo deducir la siguiente secuencia de aparición de las subpoblaciones: E → A → B → C → D → F.

Las subpoblaciones también se caracterizaron en base a la expresión de receptores estrogénicos, siendo las subpoblaciones C y F las de mayor contenido.

La subpoblación C resultó ser la de mayor expresión de la proteína p21, producto del gen ras.

La expresión de antígeno carcinoembrionario no varió significativamente en las distintas subpoblaciones cultivadas durante 24 horas.

Se analizó la respuesta de las subpoblaciones aisladas a diversos factores de crecimiento, tales como insulina, PDGF, EGF, trombina y PgF<sub>2</sub>α. El agregado de insulina, PDGF, EGF o trombina

estimuló el crecimiento de las subpoblaciones con mayor grado de diferenciación (D y F). La  $\text{PgF}_2\alpha$  tuvo efecto mitogénico sobre las subpoblaciones C y D e inhibió el crecimiento de la subpoblación B.

El tratamiento de la subpoblación D con trombina permitió además la supervivencia de las células en un medio libre de suero, mientras que los controles cultivados en ausencia de trombina no sobrevivieron en el medio químicamente definido por más de 8-10 días. La supervivencia de la subpoblación C en un medio libre de suero fue posible por tratamiento de las células con  $\text{PgF}_2\alpha$ .

También se estudiaron las interacciones entre las distintas subpoblaciones, para lo cual se ensayó el efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones sobre el crecimiento de las subpoblaciones E y F.

El crecimiento de la subpoblación E resultó inhibido por el agregado de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones, siendo el de la subpoblación F el de mayor efecto inhibitorio.

El crecimiento de la subpoblación F resultó estimulado por el agregado de los medios condicionados de las subpoblaciones A y E mientras que los correspondientes a las subpoblaciones B, C y D no indujeron cambios significativos. El medio condicionado por la subpoblación E fue capaz de inducir el crecimiento en agar blando de la subpoblación F, con una eficiencia clonogénica del 1% y con colonias cuyo tamaño promedio fue de 800 células/colonia. Similares resultados se obtuvieron por tratamiento de las células con EGF, lo que indujo a pensar en la posibilidad de la presencia

de TGF- $\alpha$  en dicho medio condicionado.

#### B. Crecimiento en el medio químicamente definido

Se estudió el comportamiento de la línea celular en un medio de cultivo libre de suero, analizando sus cambios morfológicos, requerimiento de factores de crecimiento, eficiencia clonogénica y expresión de proteínas tales como citoqueratinas, antígeno carcinoembrionario, proteína p21, producto del gen ras y receptores estrogénicos.

En ausencia de suero y a baja densidad celular ( $\leq 2.500$  células/cm<sup>2</sup>), las células requirieron el aporte exógeno de insulina, EGF y trombina. Cuando las células alcanzaron una densidad de 12.000 - 13.000 células/cm<sup>2</sup>, sólo requirieron insulina para su óptimo crecimiento. En este medio de cultivo (medio químicamente definido) se modificó la morfología hacia un fenotipo celular menos diferenciado. Estos cambios morfológicos se acompañaron de cambios en la distribución topológica de varias proteínas, como las queratinas y el antígeno carcinoembrionario.

Observadas al microscopio electrónico, las células cultivadas en el medio químicamente definido presentaron un aparato de Golgi voluminoso y muy desarrollado; se observaron también modificaciones en la membrana plasmática ("coated pits" y vesículas recubiertas), probablemente relacionadas con la actividad secretora de estas células.

Las células cultivadas en presencia de suero, por el contrario, no presentaron un complejo de Golgi desarrollado y las modificaciones en la membrana plasmática fueron poco frecuentes.

En ambas condiciones de cultivo se evidenció la presencia de uniones estrechas, desmosomas y tonofilamentos.

En el medio químicamente definido se verificó una mayor liberación de proteínas al medio de cultivo y se comprobó la aparición de una proteína de 56.000 daltons. Estos cambios cuali y cuantitativos podrían correlacionarse con la mayor eficiencia clonogénica que presentaron las células cultivadas en un medio libre de suero y podrían reflejar también las diferencias observadas luego del tratamiento de las células CHEF/18 con los medios condicionados por las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero. Sólo el medio condicionado por las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero fue capaz de inducir la diferenciación de las células CHEF/18 a adipocitos.

Las células cultivadas en ausencia de suero presentaron un enriquecimiento en las subpoblaciones de mayor capacidad proliferativa a expensas de una disminución en las subpoblaciones con mayor grado de diferenciación.

La expresión de la proteína p21, producto del gen ras, fue más intensa en presencia de suero y más difusa en el medio químicamente definido.

El contenido de receptores estrogénicos sufrió un incremento transiente a los 10 días de cultivo de las células en el medio químicamente definido y dicho incremento se correlacionó con el requerimiento hormonal que manifestaron las células en ese momento.

## C. Efecto de hormonas y agentes moduladores de la diferenciación

### C.1. Estrógenos

El agregado de estradiol a las subpoblaciones quiescentes incrementó la incorporación de timidina tritiada en la subpoblación C pero inhibió dicha incorporación en la subpoblación F.

El agregado de estrógenos a las subpoblaciones aisladas cultivadas en el medio químicamente definido tuvo distintos efectos: sobre las subpoblaciones A, B, C, D y F, el estradiol ejerció un rápido y notable efecto diferenciante. Sobre la subpoblación E, por el contrario, indujo a las células a despegarse de las placas de cultivo y permitió el crecimiento bajo la forma de agregados multicelulares en suspensión. Dicha línea celular lleva más de 2 años de cultivo.

### C.2. Dimetilsulfóxido

A partir de concentraciones de 0,5% de DMSO se inhibió el crecimiento celular. Dicho efecto se manifestó a las 24 horas de tratamiento y estuvo acompañado por cambios morfológicos irreversibles. El efecto inductor de la diferenciación del DMSO se verificó al analizar la distribución de las células en gradientes de densidad de Percoll; se comprobó que el DMSO induce un enriquecimiento en las subpoblaciones con mayor grado de diferenciación (D y F) a expensas de la disminución en las subpoblaciones con mayor capacidad proliferativa pero sin afectar a la subpoblación de células "stem".

### C.3. Butirato de sodio

Al igual que el DMSO, el butirato de sodio ejerció un efecto inhibitorio del crecimiento que estuvo acompañado por cambios morfológicos y alteraciones en el perfil del gradiente de densidad de Percoll. Las células cultivadas en el medio químicamente definido fueron más sensibles al efecto del butirato de sodio mientras que las células en suspensión resultaron ser las más resistentes.

### C.4. 13-cis-retinal

A concentraciones del orden de  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M, este derivado de la Vitamina A estimuló el crecimiento de las células cultivadas en presencia o ausencia de suero.

Además, en este trabajo se describió un efecto novedoso del 13-cis-retinal: la estimulación de la síntesis y acumulación de proteínas nucleares en las células crónicamente tratadas. Las proteínas citoplasmáticas y liberadas al medio de cultivo se modificaron transiente y opuestamente. Las células crónicamente tratadas presentaron mayor eficiencia clonogénica en agar blando.

El 13-cis-retinal actuó como modulador negativo de la diferenciación,

- incrementando la contribución de las subpoblaciones con mayor capacidad proliferativa a expensas de la disminución en el aporte de las subpoblaciones más diferenciadas;
- retardando la obtención de las subpoblaciones más diferenciadas a partir de las subpoblaciones A, B y E;

- protegiendo a las células del efecto inductor de la  
ciación ejercido por el butirato de sodio.

## INTRODUCCION

### 1. Heterogeneidad tumoral

Desde 1977, diversos grupos de investigación han descrito la existencia de distintas subpoblaciones celulares dentro de un mismo tumor (Fidler y Kripke, 1977; Dexter y col., 1978; Mackillop y Buick, 1981; Dexter y Calabresi, 1982; Woodruff, 1983; Heppner, 1984). Estas subpoblaciones se caracterizan por la expresión de distintos marcadores de diferenciación (Podhajcer y col., 1986), distinta velocidad de crecimiento, distinta capacidad de dar metástasis (Puricelli y col., 1984) y distinta sensibilidad a los agentes terapéuticos.

Esta heterogeneidad celular también se ha descrito en líneas celulares tumorales del sistema hemopoyético (Till y McCulloch, 1980) y en la línea celular de tumor de mama humano MCF-7 (Yang y col., 1977; Barkley Buttler y col., 1986).

La heterogeneidad celular puede deberse a:

- la inestabilidad genética de las células tumorales, por la cual se producen mutaciones puntuales en el ADN, rearrreglos cromosomales, pérdida de cromosomas o amplificación genética (Cifone y Fidler, 1981; Isaacs y col., 1982);
- la existencia de subpoblaciones en distinto estadio de diferenciación originadas a partir de una célula "stem" (Bennett y col., 1978; Hager y col., 1981; Rudland y col., 1982).

Los tumores pueden considerarse sistemas de "autorenovación", en los cuales una pequeña proporción de células (células "stem") tienen la capacidad de autogenerarse y de originar células desti-



nadas a la diferenciación. Estas células, denominadas células transicionales, tienen una capacidad proliferativa limitada que disminuye a medida que las células se van diferenciando (Mackillop y col., 1983; Buick y Pollak, 1984).

En la Fig. I.1 se presenta un esquema de la jerarquía celular.

Las distintas subpoblaciones celulares se comportan de manera diferente cuando están aisladas que cuando crecen juntas e interactúan entre sí (Heppner y col., 1984). Las interacciones entre las subpoblaciones afectan la velocidad de crecimiento (Miller y col., 1980), la inmunogenicidad (Miller y Heppner, 1980), la sensibilidad a drogas (Miller y col., 1981) y la capacidad de dar metástasis (Wang y col., 1982). Esta interacción puede estar mediada por factores difusibles o puede requerir el contacto celular (Miller y col., 1983). Aún no se ha descrito un mecanismo general para explicar las interacciones entre las distintas subpoblaciones; dichas interacciones complican el estudio biológico y bioquímico de los tumores dado que las propiedades de un tumor no pueden deducirse de la simple adición de las propiedades de cada una de las subpoblaciones que lo componen.

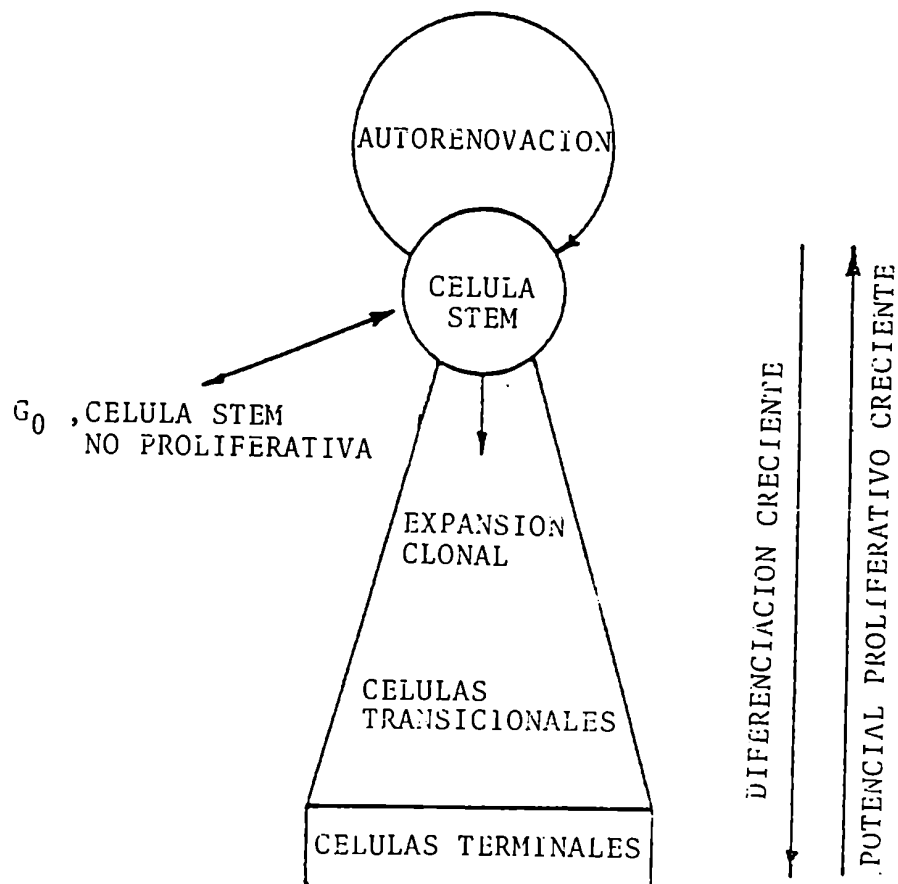
Por lo tanto, para estudiar cómo evolucionan estos sistemas es necesario estudiar la biología celular de cada subpoblación por separado y del conjunto.

## 2. Regulación del crecimiento celular

El estímulo para la regulación del crecimiento en células de mamíferos proviene del medio extracelular, a través de los factores de crecimiento, que son moléculas de naturaleza poli-

Fig. I.1: Esquema de la jerarquía celular, producto de la diferenciación de la célula "stem".

A medida que se desciende en el esquema, disminuye progresivamente la capacidad proliferativa y se adquieren las características propias de células diferenciadas (Buick y Pollak, 1984).



peptídica. La mayoría de estos compuestos actúan estimulando la proliferación celular aunque se conocen otros, como el TGF- $\beta$  o el interferón- $\beta$ , que inhiben el crecimiento.

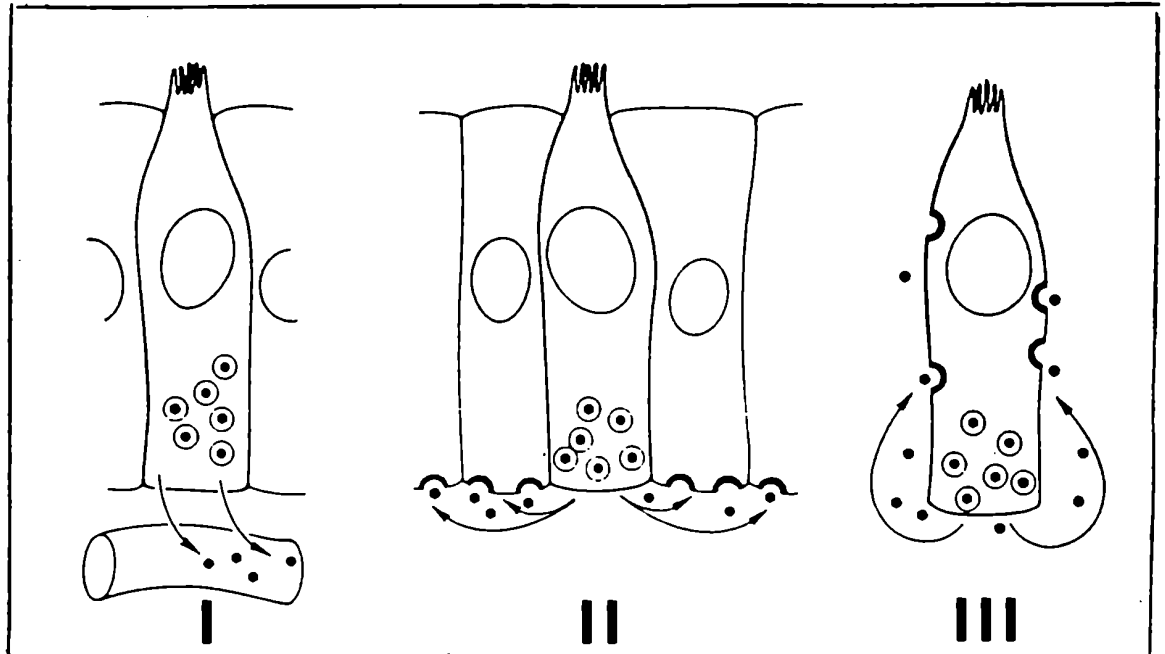
Los factores de crecimiento se diferencian de las hormonas por el mecanismo de secreción involucrado. Mientras que las hormonas actúan a través del sistema endócrino (es decir, son producidas en una célula específica y se transportan a través del torrente sanguíneo hasta su sitio de acción), para los factores de crecimiento se han propuesto mecanismos de secreción paracrino o autócrino. En el primer caso, el factor de crecimiento es producido por una célula y llega por difusión hasta las células vecinas sobre las que actúa (James y Bradshaw, 1984). El mecanismo autócrino, descrito por Sporn y Todaro (1980) implica que el factor de crecimiento es producido en la misma célula en la que ejerce su efecto.

En la Fig. I.2 se presenta un esquema de los tres mecanismos de secreción.

Los factores de crecimiento actúan a través de la unión a receptores específicos de alta afinidad presentes en la membrana celular. Como consecuencia de esta unión, la señal mitogénica generada se transmite desde el dominio extracelular (sitio de unión del factor de crecimiento) al dominio intracitoplasmático (donde reside la actividad de tirosina quinasa del receptor; Hunter y Cooper, 1985). Se activan señales consideradas segundos mensajeros (fosforilación de proteínas, aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, formación de diacilglicerol, inositol trifosfato y  $\text{AMP}_c$ ) las que a su vez, activan genes involucrados en la

Fig. 1.2: Diagrama de los mecanismos de secreción endócrina (I), paracrina (II) y autócrina (III).

Las regiones semicirculares de la membrana celular representan los sitios receptores (Sporn y Todaro, 1980).



producción de mARNs y proteínas necesarias para la replicación del ADN. Estos eventos permiten la transición de la fase  $G_1$  a la fase S del ciclo celular, pudiéndose discriminar entre eventos tempranos y tardíos (Pardee, 1987 a y b). Los eventos tempranos se relacionan con la síntesis de mARNs y proteínas; los eventos tardíos están relacionados con la síntesis de componentes específicos que permiten la replicación del ADN, tales como las enzimas timidina quinasa y timidinasintetasa. Una vez que la célula ha entrado en la fase de síntesis del ADN, los siguientes estadios del ciclo celular dejan de estar regulados por factores externos.

Si las condiciones de cultivo son adversas, las células pueden detener su crecimiento en la fase previa a la síntesis de ADN y entrar en un estado de quiescencia denominado " $G_0$ " (Baserga, 1976) (Fig. I.3).

Aún no está resuelto si las células en  $G_0$  están fuera del ciclo celular en un estado bioquímico distinto al de  $G_1$  (Baserga, 1976) o bien si  $G_0$  corresponde a un estadio en el cual las células ciclan en forma infinitamente lenta (Smith y Martin, 1973).

Las condiciones que reversiblemente inducen el estado de quiescencia son:

- el crecimiento a alta densidad celular (Todaro y col., 1965; Temin, 1971; Bartholomew y col., 1976; Robinson y Smith, 1976);
- la baja concentración de suero en el medio de cultivo (Holley y Kiernan, 1974; Pardee, 1974; Martin y Stein, 1976);
- la baja concentración de aminoácidos y nutrientes esenciales (fosfatos, glucosa, biotina, vitaminas y lípidos).

Las células transformadas tienen una regulación relajada del

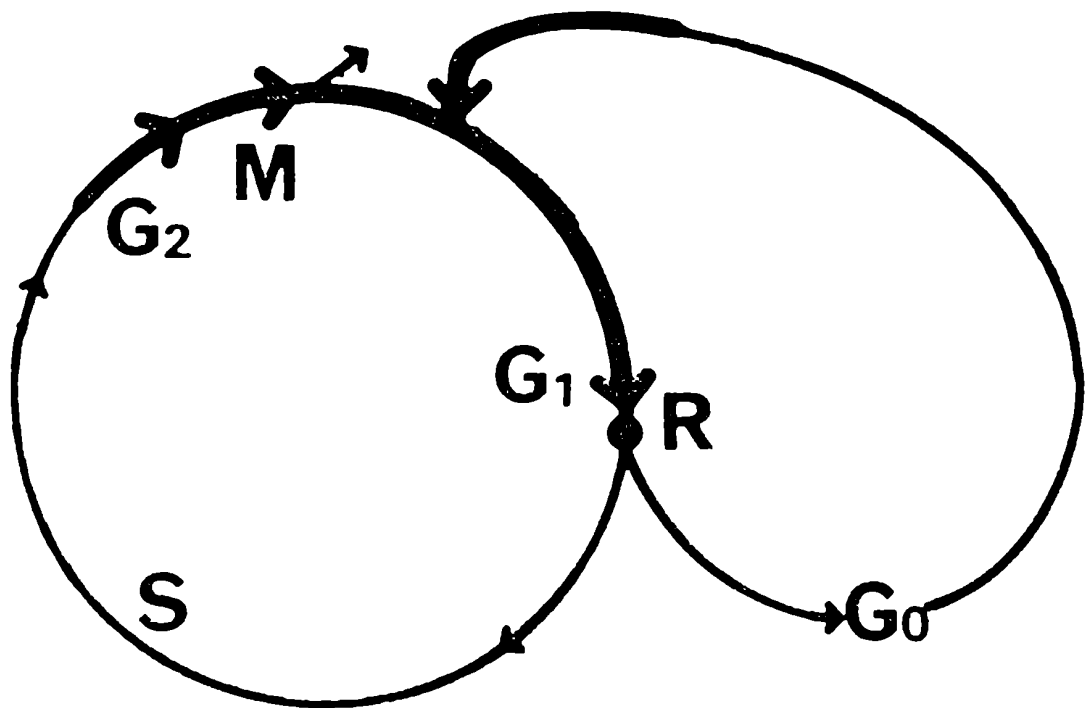
Fig. 1.3: Ciclo celular regulado.

Las líneas gruesas indican las regiones del ciclo celular en las cuales tienen lugar los eventos regulatorios.

S: síntesis de ADN.

M: mitosis

R: punto de restricción



crecimiento debido a mutaciones o rearrreglos cromosomales que afectan la expresión de genes involucrados en el control de la proliferación.

El término "transformación" en relación a células animales en cultivo se asocia con propiedades tales como menor requerimiento de suero, menor dependencia del anclaje a un sustrato para el crecimiento y mayor densidad celular a la cual se verifica la detención del crecimiento (denominada densidad de saturación; Todaro y col., 1965; Dulbecco, 1970).

Las líneas celulares transformadas generalmente conservan la regulación de su crecimiento en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular aún cuando requieren menor concentración de suero para proliferar (Holley y col., 1976; Moses y col., 1978; Cherington y col., 1979; Dubrow y col., 1979).

El menor requerimiento de suero probablemente se deba a la pérdida del requerimiento de algún factor de crecimiento en particular. En 1978, Scher y col. describieron la pérdida del requerimiento de PDGF en células transformadas.

Cherington y col. observaron, en 1979, células transformadas que habían perdido el requerimiento de EGF mientras conservaban el de insulina o somatomedinas.

### 3. Crecimiento autócrino en células transformadas

El menor requerimiento de factores de crecimiento en células transformadas puede deberse a una activación autócrina de la célula. En este caso, la célula sintetiza y libera al medio de cultivo péptidos que mimetizan o son idénticos a hormonas o fac-

tores de crecimiento y que utilizan para su efecto los receptores presentes en la membrana de la célula (Shields, 1978).

De Larco y Todaro (1978, 1980) descubrieron un factor de crecimiento (SGF) que es producido y secretado al medio de cultivo por células transformadas con el virus del sarcoma murino o felino. Este factor tiene la propiedad de competir con el EGF por la unión a los mismos receptores presentes en la membrana celular; mimetiza al EGF en su efecto mitogénico pero lo supera en la estimulación del crecimiento. El SGF (factor de crecimiento de sarcoma) permite el crecimiento en agar blando de fibroblastos normales; es por esta razón que se lo ha denominado TGF- $\alpha$  dado que induce un fenotipo transformado en células normales, caracterizado por la capacidad que adquieren estas células de crecer en forma independiente del anclaje a un sustrato.

Existe otro factor de crecimiento con actividad transformante y se ha denominado TGF- $\beta$ . Este factor es un homodímero de 25.000 daltons de peso molecular que actúa a través de la unión a receptores específicos (Frolik y col., 1984; Tucker y col., 1984; Massagué y Like, 1985). Moses y col. (1985) y Roberts y col. (1985) demostraron que el TGF- $\beta$  actúa como modulador negativo del crecimiento en células epiteliales. Sporn y Roberts (1985) postularon que su efecto se debe a que interviene en la regulación de la proliferación, evitando un crecimiento descontrolado.

En la línea celular de tumor de mama humano MCF-7 se ha descrito la producción de factores de crecimiento semejantes a PDGF, EGF e IGF-I (Bronzert y col., 1987; Mori y col., 1986; Huff y col., 1986 y 1987), lo que explicaría un crecimiento autócrino de



esta línea celular.

Existen otros mecanismos que explican un menor requerimiento de factores de crecimiento por parte de las células transformadas. Ellos son:

- síntesis de un receptor alterado para el factor de crecimiento en cuestión. Es el caso del oncogen viral erb-B (del virus que produce la eritroblastosis de las aves) que codifica para el receptor truncado del EGF. Este receptor carece del dominio extracelular para la unión del ligando y está constitutivamente activado dado que genera la señal mitogénica independientemente de la unión del EGF (Downward y col., 1984);
- activación de los mecanismos intracelulares que tienen lugar luego de la unión del factor de crecimiento a su receptor. Los trabajos de Mulcahy y col. en 1985 demuestran que la proteína p21 codificada por el protooncogen ras está involucrada en la transducción de la señal mitogénica. La proteína p21 está localizada en la cara interna de la membrana plasmática y tiene actividad GTPásica (Willingham y col., 1980; Furth y col., 1982; McGrath y col., 1984).

Varios grupos de investigación postularon que la proteína p21 actuaría acoplando el receptor de membrana con la fosfolipasa C, que es la enzima que hidroliza el fosfatidil inositol-4,5-difosfato (Cockeroft y Gomperts, 1985; Litosch y col., 1985; Fleischman y col., 1986; Preiss y col., 1986; Marshall, 1987; Wolfman y Macara, 1987). Sin embargo, los trabajos del grupo liderado por Stacey (1988) demuestran que no es así; estos autores postulan que el metabolismo de fosfoinosítidos ante-

cede a la acción de la proteína p21 en la cadena de eventos necesarios para la transducción de la señal mitogénica al núcleo.

El gen ras activado presente en muchos tumores tiene una mutación que lo estabiliza en la configuración activa, permitiendo la transducción de la señal mitogénica independientemente de la presencia del factor de crecimiento; es otro ejemplo de una activación constitutiva de la célula (Berridge, 1987). Otros oncogenes de localización nuclear están involucrados en la transducción de señales mitogénicas. Ellos son el fos, myc y myb, cuya transcripción aumenta por tratamiento de las células con PDGF (Kelly y col., 1983; Cochran y col., 1984; Greenberg y Ziff, 1984). La expresión constitutiva del oncogen myc altera la sensibilidad de las células a los factores de crecimiento. En presencia de EGF estas células son capaces de formar colonias en agar blando mientras que eso no ocurre con las células normales (Roberts y col., 1985).

#### 4. Cultivo de líneas celulares tumorales humanas

Al mantener células en cultivo se busca reconstruir el microambiente extracelular que requieren las células en su localización de origen. Para eso, se consideran los requerimientos hormonales, nutricionales y del estroma, éstos últimos relacionados con la matriz extracelular y los fenómenos de adhesión.

Durante mucho tiempo, el medio de elección para el cultivo de células fue el suero, que contiene una mezcla compleja e indefinida de sustancias, cuyas concentraciones pueden variar de lote en lote de suero.

El suero contribuye al crecimiento y supervivencia celular aportando componentes de la membrana basal como fibronectina que promueve la adhesión celular y el estiramiento de las células sobre el sustrato de cultivo (Yamada y Olden, 1978). El suero humano presenta una crioglobulina semejante a la fibronectina plasmática mientras que en el suero fetal bovino, la principal proteína promotora de la adhesión es la vitronectina (Hayman y col., 1985). El suero también aporta nutrientes de bajo peso molecular (aminoácidos, lípidos, vitaminas, trazas minerales), factores de crecimiento, hormonas y proteínas transportadoras de iones y metales (transferrina y albúmina).

La transferrina actúa como proteína detoxificante para la eliminación de trazas de metales tóxicos presentes en el medio. Tiene la capacidad de ligar hierro y transportarlo dentro de la célula. Las células transformadas requieren transferrina durante todo el ciclo celular, por lo tanto no actúa como factor regulatorio del crecimiento sino como nutriente (Cherington y col., 1979; Young y col., 1979).

Otra proteína transportadora es la albúmina, que transporta hormonas esteroideas y vitaminas. El suero fetal bovino contiene fetuina (Ham y McKeehan, 1979) que tiene la capacidad de unir sustancias tóxicas o lábiles y actúa como buffer.

A partir de 1980, Barnes y Sato promueven el reemplazo de suero como suplemento de los medios de cultivo por una mezcla conocida de nutrientes. A partir de entonces, empezaron a aparecer en la literatura numerosos trabajos en los cuales se diseñaban distintos medios libres de suero para el cultivo de diversas líneas celu-

lares. En muchos de ellos se ha utilizado el medio F-12 diseñado por Ham en 1965 como suplemento del medio Dulbecco (Hayashi y Sato, 1976; Bottenstein y col., 1979).

Los trabajos de Barnes y Sato en 1979 y de Jozan y col. en 1982 concuerdan en que la insulina es el componente más importante e indispensable del medio químicamente definido que mantiene el crecimiento de la línea celular de tumor de mama humano MCF-7.

La utilización de medios químicamente definidos permite estudios de regulación del crecimiento, del metabolismo y de la diferenciación celular, a la vez que permite conocer los verdaderos requerimientos de las células en cuanto a hormonas y factores de crecimiento.

##### 5. Factores de crecimiento

Muchos factores de crecimiento están presentes en el suero (liberándose de las plaquetas durante el proceso de coagulación sanguínea) o bien se encuentran en el plasma pobre en plaquetas.

Algunos factores actúan sinérgicamente en la estimulación de la síntesis de ADN, indicando mecanismos de acción distintos pero complementarios.

Otras combinaciones de factores de crecimiento resultan en efectos aditivos, indicando que estimulan los mismos eventos intracelulares que conducen finalmente a la síntesis de ADN.

Los factores de crecimiento actúan en distintas fases del ciclo celular, pudiendo definirse tres tipos de factores:

##### - Factores tipo I: factores de competencia.

Actúan sobre células quiescentes (detenidas en la fase  $G_1/G_0$  del

ciclo celular) induciendo un estado de competencia, en el cual las células son sensibles al efecto de otros factores de crecimiento.

Ejemplo de factor de competencia: PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

- Factores tipo II: factores de progresión.

Actúan sobre células competentes permitiendo la entrada a la fase S del ciclo celular.

Ejemplo de factores de progresión: insulina,  
somatomedina C.

Los factores mencionados están contenidos en el plasma pobre en plaquetas.

- Factores tipo III.

Son factores que actúan sinérgicamente con la insulina en la estimulación de la síntesis del ADN.

El hecho de haber sido agrupados en la misma sección no implica que actúen por el mismo mecanismo, disparando las mismas señales que conducen finalmente a la síntesis de ADN. Por el contrario, el hecho de que puedan actuar sinérgicamente unos con otros sugiere mecanismos cooperativos de acción que transcurren por distintas vías. Se han considerado juntos para su discusión debido a que su mecanismo de acción en relación al crecimiento no se conoce tanto como el del PDGF o el de la insulina.

Estos factores son: EGF (factor de crecimiento epidérmico).

Trombina.

Prostaglandina F<sub>2</sub> α

Otras proteasas: tripsina, pronasa.

Glucocorticoides, como la dexametasona.

Vasopresina.

En este trabajo se analizarán los primeros tres factores mencionados.

### 5.1. Factores tipo I

PDGF: El factor de crecimiento derivado de plaquetas ha sido purificado a homogeneidad por el grupo de investigación de Antoniades, en 1979. Tiene 31.000 daltons de peso molecular y está compuesto por dos cadenas (A y B), unidas entre sí por puentes disulfuro. La cadena B presenta homología de secuencia con la proteína p28, producto del oncogen sis del virus que produce el sarcoma en los simios (Devare y col., 1983; Doolittle y col, 1983; Waterfield y col., 1983).

Las células quiescentes expuestas a PDGF adquieren un estado de "competencia" en el cual son sensibles a otros factores de crecimiento que estimulan la síntesis de ADN (por ejemplo, la insulina).

Varios investigadores han estudiado el efecto mitogénico de PDGF sobre fibroblastos (Pledger y col., 1977; Antoniades y col., 1979; O'Keefe y Pledger, 1983). La unión del PDGF a su receptor provoca una disminución de la densidad del receptor en la membrana celular debido a una internalización del complejo receptor-PDGF por endocitosis (James y Bradshaw, 1984). Se activa la tirosina-quinasa del receptor que provoca la fosforilación del mismo y de otras proteínas (Ek y Heldin, 1982; Nishimura y col., 1982;

Frackelton y col., 1984).

El PDGF activa la fosfolipasa C provocando la hidrólisis del fosfatidil inositol-4,5-difosfato, con formación de 1,2-diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato (Habenicht y col., 1981). El inositol trifosfato induce movilización de calcio de los depósitos del retículo endoplásmico provocando un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Streb y col., 1983; Berridge e Irvine, 1984; Moolenaar y col., 1984a). El diacilglicerol en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la proteínaquinasa C (Nishizuka, 1984; Rodríguez-Peña y Rozengurt, 1985). Esta induce fosforilación de la proteína que interviene en el transporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , determinando un eflujo de  $\text{H}^+$  y un influjo de  $\text{Na}^+$ . Se produce así una alcalinización del citoplasma (Cassel, 1983; L'Allemain y col., 1984) que cumple un rol permisivo de la mitogénesis dado que las células no se dividen si el pH del citoplasma es ácido (Poyssegur y col., 1984).

Por otro lado, el diacilglicerol en presencia de la fosfolipasa  $A_2$  se hidroliza dando ácido araquidónico, que es el precursor de las prostaglandinas (Habenicht y col., 1981). Se produce principalmente prostaglandina E que es un potente mitógeno y que induce a la adenil ciclasa con acumulación de  $\text{AMP}_c$  (Rozengurt y col., 1983).

Asimismo, el PDGF induce reorganización del citoesqueleto provocando alteraciones en la distribución de vinculina y actina (Herman y Pledger, 1985).

El tratamiento de fibroblastos con PDGF provoca a los 45 minutos un incremento en los niveles de  $\text{ARN}_m$  del gen c-fos (Greenberg y Ziff, 1983; Cochran y col., 1984; Kruijer y col.,

1984; Müller y col., 1984); a las 2 horas, se induce el gen c-myc (Kelly y col., 1983) y mucho más tarde, se inducen los ARN<sub>m</sub> de  $\beta$ -interferón y de 2', 5'-oligoadenilatociclasa que actúan como mecanismo de control de la proliferación, evitando un crecimiento excesivo.

Los fibroblastos estimulados con PDGF presentan un aumento transiente en los niveles de ARN<sub>m</sub> correspondientes a la cadena A del PDGF, con síntesis del homodímero de cadena A. Esto quiere decir que el mismo factor de crecimiento induce la transcripción de genes involucrados en su síntesis, desencadenando un mecanismo de retroalimentación positiva en la mitogénesis (Paulsson y col., 1987).

En 1987, Bronzert y col., demuestran que las células de tumor de mama humano MCF-7 secretan un factor de crecimiento biológica e inmunológicamente semejante al PDGF. El medio condicionado por estas células es capaz de inducir un estado de competencia en las células Swiss 3T3 quiescentes, que se manifiesta por un incremento en la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina. La secreción de este factor estaría hormonalmente regulada dado que el tratamiento de las células MCF-7 con 17 $\beta$ -estradiol aumenta la secreción del factor.

Peres y col. (1987) demuestran también que las células MCF-7 producen y secretan un factor de crecimiento semejante al PDGF, siendo esta línea celular la más alta productora en relación a otras líneas celulares de tumor de mama humano estudiadas. Estos autores observan que estas células presentan altas cantidades de ARN<sub>m</sub> correspondientes a las cadenas A y B del PDGF, con alta producción del homodímero de cadena A que se secreta al medio de



cultivo. Dado que no se verifica una unión específica de ( $^{125}\text{I}$ )-PDGF a las células MCF-7, estos autores deducen que estas células no presentarían receptores para este factor de crecimiento, por lo cual descartan que el factor secretado al medio de cultivo intervenga en el crecimiento autócrino de estas células.

## 5.2. Factores tipo II

Son los factores que actuando sobre células competentes permiten la progresión de la fase  $G_1$  a la fase S del ciclo celular.

Dentro de estos factores tenemos la familia de las somatomedinas, presentes en el suero y en la fracción del plasma pobre en plaquetas. Son la somatomedina C (IGF-I) y la somatomedina A (IGF-II) (Rinderknecht y Humbel, 1978 a y b). Estos péptidos son factores de crecimiento semejantes a insulina y presentan considerable homología de secuencia entre sí y con la proinsulina.

"In vivo", las somatomedinas coordinan el crecimiento y desarrollo de los tejidos; "in vitro", tienen efecto mitogénico sobre células en cultivo, siendo más potente la somatomedina C (Schoenle y col., 1982).

Para ejercer sus efectos deben unirse a receptores específicos de membrana. Se han identificado dos receptores fisicoquímicamente distintos:

- el receptor tipo I es un heterotetrámero compuesto por dos grupos de subunidades distintas unidas entre sí por puentes disulfuro. Su peso molecular es de 330 kilodaltons (Kasuga y col., 1981; Massague y Czech, 1982; Stuart y col., 1984). Es estructuralmente semejante al receptor de insulina y podrían

estar evolutivamente relacionados (Roth y col., 1983). Este receptor presenta mayor afinidad por IGF-I que por IGF-II. La insulina se une a él sólo a altas concentraciones.

- El receptor tipo II es una cadena polipeptídica de 220 kilodaltons de peso molecular. Presenta mayor afinidad por IGF-II que por IGF-I pero no liga insulina ni aún a altas concentraciones.

Las células MCF-7 de tumor de mama humano presentan receptores tipo I para somatomedinas (Furlanetto y Di Carlo, 1984). La somatomedina C tiene efecto mitogénico sobre estas células; se requieren concentraciones de 10 a 100 veces mayores de insulina para lograr el mismo efecto debido a que la potencia con que la insulina se une al receptor tipo I es 1/10 a 1/100 que la que presenta la somatomedina C. Esta observación ya había sido descrita por otros investigadores que estudiaron el efecto de insulina y somatomedina C sobre fibroblastos (Stiles y col., 1979; Cherington y Pardee, 1980). Esta teoría se opone a la de Osborne (1976) que dice que la insulina interactúa con receptores específicos de alta afinidad y no con los receptores de somatomedinas.

Las células MCF-7 responden a la insulina con un incremento en la síntesis de ARN y proteínas. Estas respuestas tempranas se acompañan de cambios en el flujo de iones, aumento en los niveles de fosforilación y estimulación del transporte de aminoácidos. La progresión de la fase G<sub>1</sub> a la fase S del ciclo celular requiere síntesis de nuevos ARNm (tal como fue descrito por Shipley y col. en 1984) y culmina en la división y crecimiento celular. A diferencia de lo que ocurre en fibroblastos, la insulina induce

síntesis de ADN en líneas celulares de tumor de mama humano sin que se requieran otros componentes séricos. Su mecanismo de acción involucra el metabolismo de fosfolípidos; aumenta la síntesis "de novo" de fosfoinosítidos con un incremento en los niveles de 1,2-diacilglicerol, fosfatidil inositol-4,5-difosfato y ácido fosfatídico (Farese y col., 1986). Asimismo estimula la actividad de la proteínaquinasa C (pK C) provocando una translocación de la enzima del citosol a la fracción particulada. Este efecto se manifiesta sólo en células quiescentes y es mayor para las células MCF-7 que para la otra línea celular estudiada, T-47 D (Gómez y col., 1988).

D'Ercole y col. postularon en 1984 que la estimulación del crecimiento en estas células ocurre por un mecanismo autócrino o paracrino. Sus resultados concuerdan con los trabajos de Clemmons y col. (1981) y Adams y col. (1983) que describen la síntesis de IGF-I en células humanas y en fibroblastos de rata en cultivo.

Más recientemente, los trabajos de Huff y col. en 1986 y 1987 demuestran que las líneas celulares de tumor de mama humano son capaces de secretar IGF-I al medio de cultivo. Dicha producción está estimulada por el tratamiento de las células con  $17\beta$ -estradiol.

### 5.3. Factores tipo III

Son los factores que actúan sinérgicamente con la insulina, aumentando aún más la síntesis de ADN en las células sobre las que ejercen su efecto.

5.3.1. EGF: El factor de crecimiento epidérmico es un péptido de 6045 daltons de peso molecular, aislado de glándula submaxilar de ratón (Cohen, 1962) y de orina humana, de la cual se obtiene como urogastrona (Cohen y Carpenter, 1975).

Actúa estimulando la síntesis de ADN en células Balb/c 3T3 sobre las que ha actuado previamente el PDGF para inducir el estado de competencia (Leof y col., 1983).

Se ha estudiado su efecto sinérgico con insulina en la estimulación del crecimiento, observándose que el EGF se requiere durante la fase temprana de la progresión (las primeras 8 horas) mientras que la insulina se requiere durante toda la progresión (Rose y col., 1975; Leof y col., 1983; Shipley y col., 1984).

El EGF tiene efecto mitogénico sobre células derivadas de ectodermo, mesodermo y endodermo (Osborne y col., 1980). Se ha postulado una estimulación del crecimiento inducida por EGF en células epiteliales de mama tanto normales como malignas, de ratón o humano.

El EGF a dosis de 10 ng/ml estimula el crecimiento de las células MCF-7 cultivadas en un medio libre de suero, provocando un aumento en la incorporación de timidina, uridina y leucina a macromoléculas y aumentando el contenido de ADN y el crecimiento celular (Fitzpatrick y col., 1984). Induce la transcripción de los genes de  $\beta$  y  $\gamma$ -actina (Elder y col., 1984) y del gen c-fos (Marshall, 1987).

Su mecanismo de acción no involucra el metabolismo de fosfoinosítidos; provoca un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como

consecuencia de un efecto directo sobre los canales de calcio de la membrana celular (Moolenaar y col., 1986).

El tratamiento de las células con EGF induce autofosforilación de los residuos tirosina del receptor a la vez que se fosforilan los residuos serina y treonina (Hunter y Cooper, 1981; Cochet y col., 1984; Davis y Czech, 1984; Iwashita y Fox, 1984). Esta reacción está catalizada por la proteína quinasa C siendo la treonina 654 el principal sitio de fosforilación (Hunter y col., 1984; Davis y Czech, 1985a; King y Cooper, 1986). La fosforilación del receptor mediada por la proteína quinasa C tiene por lo menos tres efectos:

- inhibe la actividad de tirosina quinasa (Cochet y col., 1984; Friedman y col., 1984; Iwashita y Fox, 1984; Downward y col., 1985; Chinkers y Garbers, 1986);
- disminuye la afinidad de unión del receptor por EGF (Lee y Weinstein, 1979; Shoyab y col., 1979; Davis y Czech, 1986);
- provoca internalización del receptor (Beguinot y col., 1985; Fearn y King, 1985; Chinkers y Garbers, 1986).

Factores como el PDGF que activan a la proteína quinasa C, actúan regulando la expresión del receptor de EGF (Brown y col., 1984; Davis y Czech, 1985b; Rozengurt, 1986). Fabbro y col. en 1986 postulan que de esta manera se regula el crecimiento de células de tumor de mama humano.

Mori y col. demostraron en 1986 que las células MCF-7 sintetizan y secretan al medio de cultivo un polipéptido inmunológicamente relacionado con EGF humano.

Dickson y col. (1986) demostraron que la producción de este

polipéptido se induce por tratamiento de las células MCF-7 con  $17\beta$ -estradiol; este factor estaría involucrado en el crecimiento autócrino de estas células.

5.3.2. Trombina. Es una proteasa serínica altamente específica que juega un rol importante en la cascada de la coagulación sanguínea.

Varios grupos de investigación han estudiado su efecto sobre cultivos primarios y líneas celulares de origen mesodérmico, observando que estimula la síntesis de ADN y la proliferación celular tanto en presencia de suero como en medios químicamente definidos (Chen y Buchanan, 1975; Zetter y col., 1977; Carney y Cunningham, 1978; Cherington y Pardee, 1980).

Trombina tiene efecto mitogénico por sí misma sobre fibroblastos de embrión de pollo quiescentes pero además potencia el efecto de otros mitógenos, como la prostaglandina  $F_2\alpha$ , insulina y EGF (Zetter y col., 1977; Carney y Cunningham, 1978; Gospodarowicz y col., 1978).

El agregado de trombina junto con  $PgF_2\alpha$  y EGF aumenta la densidad celular final que alcanzan los cultivos. Holley y Kiernan han sugerido que la densidad celular final alcanzada por un cultivo se relaciona con la capacidad de las células para acumular nutrientes aportados por el medio de cultivo. En consecuencia, este efecto de trombina podría relacionarse con un incremento del transporte de nutrientes a través de la membrana celular o bien, trombina podría actuar indirectamente, superando la barrera de difusión de nutrientes (Stoker, 1973). Los trabajos de Carney y Cunningham (1978) y de Baker y col. (1979) postulan que trombina

ejerce sus efectos a través de la unión a receptores específicos de membrana. Ni EGF ni insulina ni protrombina pueden competir con trombina por la unión al receptor. Sin embargo, Low y col. demostraron en 1985 que la unión al receptor no es necesaria para el efecto estimulador de trombina sobre la división celular, mientras que es imprescindible para dicho efecto la actividad proteolítica de trombina, tal como habían observado Glenn y col. en 1980.

Para explicar el mecanismo por el cual trombina potencia el efecto de otros mitógenos se han postulado alteraciones en la membrana celular con modificaciones en las proteínas de superficie (Blumberg y Robbins, 1975; Baker y col., 1979) que se traducen en una sensibilización de las células a los demás factores de crecimiento, por una mayor exposición de los correspondientes receptores de membrana.

Goldstein y col. en 1979 postularon para el caso de EGF e insulina que trombina aumentaría la vida media del complejo factor de crecimiento-receptor, disminuyendo la degradación por endocitosis.

Cherington y Pardee observaron en 1980 que trombina puede reemplazar al EGF en su actividad. Describieron células transformadas que habían perdido simultáneamente los requerimientos de ambos factores de crecimiento y postularon que los mecanismos involucrados en la estimulación del crecimiento celular por parte de EGF y trombina estarían relacionados. Sin embargo, trabajos más recientes demuestran que el efecto mitogénico de trombina se relaciona con una activación del metabolismo de fosfolípidos. Carney y

col. (1985) y L'Allemain y col. (1986) observaron que trombina ejerce un efecto dosis dependiente en la activación de la fosfolipasa C en fibroblastos de hamster.

Ruggiero y Lapetina demostraron en 1985 que trombina activa la proteína quinasa C en plaquetas.

Se requiere una proteína con actividad GTPásica para la transducción de la señal mitogénica generada por trombina, dado que cuando se bloquea la proteína G con la toxina de pertussis, se bloquea también el efecto mitogénico de trombina (Paris y Pouysségur, 1986).

A pesar del considerable progreso alcanzado en el estudio del mecanismo de acción de trombina en células de origen mesodérmico, poco es lo que se conoce sobre su efecto en células epiteliales. En 1987, Medrano y col. describen por primera vez su efecto mitogénico sobre una línea celular de tumor de mama humano, T-47D, de origen epitelial. Observan que trombina estimula la síntesis de ADN en células quiescentes por ayuno de suero, ejerciendo un efecto mitogénico por sí misma pero potenciando también los efectos de EGF. Comprueban que trombina puede compensar en parte los requerimientos de EGF pero no los de insulina. Además, trombina provoca una activación de la proteína quinasa C con translocación de la enzima del citosol a la membrana (Gómez y col., 1988).



### 5.3.3. Prostaglandina F<sub>2</sub>α

Las prostaglandinas constituyen un grupo de moléculas lipídicas sintetizadas a partir del ácido araquidónico. Pueden modificar la velocidad de proliferación y diferenciación de una gran variedad de células en cultivo. En particular, la Pg F<sub>2</sub>α tiene efecto mitogénico sobre fibroblastos (Jiménez de Asúa y col., 1975), cultivos de células "stem" hemopoyéticas (Feher y Giraldi, 1974) y sobre explantos de glándula mamaria de ratón (Rillema, 1975).

La Pg F<sub>2</sub>α a dosis bajas (300 ng/ml) estimula una serie de eventos que preceden a la síntesis de ADN y a la división celular en cultivos confluentes de células Swiss 3T3 detenidas en la fase G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> del ciclo celular (Jiménez de Asúa y col., 1975 y 1979; O'Farrell y col., 1979). Entre los cambios bioquímicos observados se verifica una estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos con un incremento del contenido celular de 1,2-diacilglicerol (Macphee y col., 1984) y movilización de calcio de los depósitos con un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, como consecuencia de la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (Moolenaar y col., 1984a; Hesketh y col., 1985). El diacilglicerol formado interviene en la activación de la proteína quinasa C y en la producción de prostaglandinas a través de la formación de ácido araquidónico.

## 6. Efectores o moduladores del crecimiento celular

Son moléculas de bajo peso molecular (menor de 500 daltons) que controlan la proliferación y diferenciación celular.

Dentro de estos compuestos se incluyen: el dimetilsulfóxido (DMSO),  
el butirato de sodio,  
los derivados de la vitamina A.

### 6.1. Dimetilsulfóxido

En 1971, Friend y col. demostraron que el dimetilsulfóxido estimulaba la diferenciación eritroide en células de leucemia de mono infectadas con virus. A partir de entonces, se utilizó el DMSO como inductor de la diferenciación en células leucémicas y principalmente en dos líneas celulares: la eritroleucemia murina de Friend y la leucemia promielocítica HL-60 (Collins y col., 1978).

El tratamiento de las células de la eritroleucemia murina de Friend con DMSO induce la aparición de marcadores de diferenciación: síntesis de hemo, hemoglobina y espectrina y aparición de antígenos de membrana (Ross y col., 1972).

En la línea celular HL-60, el DMSO induce diferenciación terminal con aparición de granulocitos maduros con poder fagocítico.

Distintas teorías se han formulado para explicar su mecanismo de acción. Debido a su utilización en la criopreservación de las

células, se ha propuesto que su mecanismo de acción involucra alteraciones en la membrana (Lyman y col., 1976). Otra teoría indica que el DMSO actuaría en el núcleo, alterando la conformación del complejo ADN-cromatina, permitiendo la iniciación de la transcripción de los genes involucrados en la diferenciación (Tanaka y col., 1975).

El hecho de que el DMSO induzca diferenciación en células humanas y murinas hace pensar que pueda actuar a través de mecanismos comunes en una gran variedad de células animales.

#### 6.2. Butirato de sodio

Es un agente inductor de la diferenciación, más potente que el DMSO (Leder y Leder, 1975).

Tsao demostró en 1982 que el butirato de sodio inhibe el crecimiento de células epiteliales de mamífero y aumenta el contenido de antígeno carcinoembrionario (CEA) en adenocarcinomas de colon humano.

Se estudió su efecto también sobre las células HL-60 y sobre la eritroleucemia murina de Friend.

Abe y Kufe (1984a) comprueban que el butirato de sodio inhibe la proliferación de las células MCF-7 de tumor de mama humano y aumenta la expresión del CEA. Este efecto es dosis dependiente y se manifiesta a partir de una concentración de 1 mM; el máximo efecto se logra con una concentración de 4 mM. Observan también alteraciones morfológicas con un agrandamiento del citoplasma. Estos autores buscaron la aparición de otros marcadores de diferenciación en células MCF-7 que fueran más específicos que el

CEA para obtener una mejor correlación entre el tratamiento con butirato de sodio y la aparición de un fenotipo diferenciado. Desarrollaron un anticuerpo monoclonal en ratón (DF<sub>3</sub>) que reacciona con un antígeno presente en los bordes apicales de las células de epitelio de mama más diferenciadas y con capacidad secretoria; este antígeno también está presente en la leche humana, por lo tanto lo usan como marcador bioquímico específico de la diferenciación. Luego del tratamiento de las células MCF-7 con butirato de sodio, estos autores observaron un aumento en la producción de este antígeno, pudiendo correlacionar el efecto del butirato de sodio con la inducción de un fenotipo diferenciado en estas células (Abe y Kufe, 1984b).

Los trabajos de Bryant en 1986 demuestran que el butirato de sodio reduce la expresión de receptores para laminina presentes en las células MCF-7. La laminina es una glicoproteína localizada en la membrana basal e involucrada en el crecimiento celular, diferenciación, morfogénesis, migración, adhesión celular y metástasis. El butirato de sodio, en consecuencia, interferiría con estos fenómenos.

En 1984, Stevens había descrito que el tratamiento de las células de tumor de mama humano con butirato de sodio resultaba en una menor expresión de receptores estrogénicos y de progesterona por parte de estas células.

Se ha postulado que el butirato de sodio afecta proteínas nucleares y que induce hipermetilación del ADN (de Haan y col., 1986).

Más recientemente, Giancotti y col. (1988) demuestran que el

butirato de sodio provoca inhibición de las deacetilasas con la consiguiente aparición de histonas hiperacetiladas y cambios en la conformación del ADN. Como resultado de la hiperacetilación, el ADN se vuelve más sensible a la acción de la DNAsa I.

### 6.3. Compuestos retinoideos: derivados de la vitamina A

Involucran a una familia de moléculas de origen natural o sintético, análogas a la vitamina A.

Durante de más de 60 años, estas moléculas demostraron ser potentes agentes de control de la diferenciación y proliferación celular.

En 1925, Wolbach y Howe describieron efectos diferentes en la diferenciación y proliferación celular de epitelio de ratas deficientes en vitamina A. Observaron una excesiva proliferación celular en el epitelio acompañada de una altísima acumulación de queratina (producto de la diferenciación de los queratinocitos). No pudieron dilucidar los mecanismos moleculares involucrados y aún hoy no se ha logrado una explicación satisfactoria.

Se ha propuesto su uso como agentes en la prevención del cáncer a partir de que inhiben o retardan el crecimiento de tumores murinos y humanos. Sin embargo, los resultados obtenidos en el tratamiento de pacientes con tumor de mama no han sido auspiciosos, para lo cual se esgrimen razones de tipo farmacológico (Gold y col., 1981; Goodman y col., 1982; Kerr y col., 1982; Clamon y col., 1985).

El empleo de líneas celulares sigue arrojando resultados contradictorios, en los cuales influyen la susceptibilidad de las

células, el medio de cultivo empleado para su crecimiento y la dosis administrada. En 1979, Lotan describe la distinta susceptibilidad que presentan diferentes líneas de tumor de mama y de melanoma humanos al tratamiento con compuestos derivados de la vitamina A.

En 1983, Hiragun y col. observan estimulación de la proliferación celular por efecto de ácido retinoico en células Balb/c 3T3 transformadas por los virus que producen el sarcoma de Moloney y de Kirsten. Esta estimulación se manifiesta sólo cuando las células se cultivan en un medio libre de suero y es dosis dependiente; el pico de máxima estimulación se observa con dosis de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  M. Concentraciones por encima de  $10^{-6}$  M resultan tóxicas para las células, provocando una disminución de la viabilidad celular. En 1980, Lotan ya había mencionado la influencia de la dosis administrada sobre explantos cutáneos humanos y cultivos primarios de epidermis de rata, ratón o humano. En este caso, la administración de bajas dosis de vitamina A (tanto "in vivo" como aportada al medio de cultivo) provocaba un aumento del índice mitótico, de la división celular y de la velocidad de síntesis del ADN. Estos efectos desaparecían al administrar altas dosis de vitamina A.

Jetten y col. observaron en 1985 que el ácido retinoico inhibía el crecimiento independiente del anclaje en células de hamster que expresaban el oncogen v-src mientras que se evidenciaba un efecto estimulatorio cuando la misma línea celular expresaba el oncogen v-Ha-ras.

Los derivados de la vitamina A a altas dosis ( $10^{-6}$  M) han

sido utilizados como agentes inductores de la diferenciación en células de teratocarcinoma murino F<sub>9</sub> (Strickland y Mahdavi, 1978) y en la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 (Breitman y col., 1981).

## OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El concepto de heterogeneidad tumoral, según fue introducido por Heppner en 1984, implica la presencia de distintas subpoblaciones dentro de un mismo tumor. Buick y Pollak (1984) postularon la existencia de la jerarquía celular, con la célula "stem" capaz de autogenerarse y de originar células con distinto grado de diferenciación.

El presente trabajo de tesis considera de crucial importancia investigar la naturaleza de la célula "stem", su crecimiento autócrino y su regulación por hormonas y factores de crecimiento exógenos.

El objetivo de esta tesis comprende:

- obtener en forma purificada las diferentes subpoblaciones que componen la línea celular de tumor de mama humano MCF-7. Dicha purificación implica la puesta a punto de la técnica de separación de subpoblaciones celulares mediante centrifugación en gradientes de densidad de Percoll;
- estudiar el efecto de factores de crecimiento tales como insulina, trombina, PDGF, EGF y  $PgF_2\alpha$  sobre las subpoblaciones aisladas. Analizar los posibles mecanismos bioquímicos implicados en la regulación del crecimiento celular.
- estudiar el efecto de agentes moduladores de la diferenciación celular, tales como el 13-cis retinal, el DMSO y el butirato de sodio.
- analizar la posibilidad de secreción de factores proteicos autócrinos que modulan el crecimiento celular.



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Células

Se utilizó la línea celular de tumor de mama humano MCF-7 obtenida en la Michigan Cancer Foundation, Detroit, MI., USA, a partir de una efusión pleural de una paciente con tumor diseminado (Soule y col., 1973). La línea utilizada en el laboratorio no ha sido clonada.

### 2. Medios de cultivo

2.1. Dulbecco/F-12: mezcla de Dulbecco/F-12 (1:1) suplementada con 4 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomycin y 10 ug/ml de insulina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA).

2.2. Dulbecco/F-12/FBS: mezcla de Dulbecco/F-12 suplementada también con 10% de suero fetal bovino (Laboratorios Gibco).

2.3. Dulbecco/F-12/BSA: mezcla suplementada de Dulbecco/F-12 en la cual el agregado de suero fetal bovino se reemplaza por 1 mg/ml de seroalbúmina bovina fracción V (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA).

### 3. Medios de cultivo libres de metionina

3.1. Dulbecco sin Met: Dulbecco libre de metionina suplementado con 4 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomycin y 10 ug/ml de insulina.

3.2. Dulbecco sin Met/FBS: medio Dulbecco sin metionina suple-

mentado además con 0,5% de suero fetal bovino.

3.3. Dulbecco sin Met/BSA: medio Dulbecco sin metionina suplementado además con 35 ug/ml de seroalbúmina bovina fracción V.

#### 4. Factores de crecimiento

4.1. Insulina: provista por Collaborative Research, Watham, MA., USA. Se ensayaron distintas concentraciones a partir de una solución madre de 10 ug/ml, conservada a -20°C.

4.2. EGF: provisto por Collaborative Research, Watham, MA., USA. Se ensayaron distintas concentraciones a partir de una solución madre de 10 ug/ml, conservada a -20°C.

4.3. Trombina: mínimo 3.000 unidades NIH/mg (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO., USA). Se prepararon distintas diluciones a partir de una solución madre de 250 U/ml, conservada a -20°C.

4.4. PDGF: obtenido por gentileza del Dr. Charles Stiles, del Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA., USA. Se ensayó a una concentración de 1 ug/ml preparada a partir de una solución madre de 200 ug/ml, conservada a -20°C.

4.5. Pg E<sub>2</sub>α: prostaglandina provista por Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA. Se prepararon distintas diluciones a partir de una solución madre de 20 ug/ml, conservada a -20°C.

## 5. Moduladores de la diferenciación celular

- 5.1. 13-cis-retinal: derivado 2-cis de la Vitamina A, tipo XV (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA). Se prepararon distintas diluciones en dimetilsulfóxido a partir de una solución madre  $10^{-2}$  M, conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Todas las manipulaciones se efectuaron en la oscuridad.
- 5.2. Estradiol: (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA). Se ensayaron distintas diluciones preparadas a partir de una solución madre  $10^{-5}$  M, conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 5.3. Butirato de sodio: (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA). Se ensayaron distintas diluciones preparadas a partir de una solución madre 100 mM.
- 5.4. Dimetil sulfóxido: (Merck, Alemania Occidental).

## 6. Cultivo celular

Las células MCF-7 (no clonadas) se cultivaron en medio Dulbecco/F-12/FBS a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera humidificada conteniendo 5% de  $\text{CO}_2$ . El medio de cultivo se cambió cada 3 días.

## 7. Curvas de crecimiento celular

Las células MCF-7 se sembraron en placas de plástico de 35 mm con medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino. Cuatro horas después, las células se pasaron a los distintos medios de cultivo, según lo indicado. El número de células se determinó por duplicado luego de tripsinizar las células con tripsina-EDTA (2,5 g/l; 0,2 g/l; Laboratorios Gibco) a  $37^{\circ}\text{C}$ . El

recuento celular se efectuó en hemocitómetro; la viabilidad de las células se determinó por el ensayo de exclusión del colorante azul tripán.

#### 8. Marcación de proteínas con (<sup>35</sup>S)-metionina

Las células se marcaron durante 3 horas con 100 uCi de (<sup>35</sup>S)-metionina (1.000 Ci/nmol, New England Nuclear, Boston, MA., USA) por cada placa de plástico de 35 mm, en medio libre de metionina.

8.1. Determinación de las proteínas marcadas con (<sup>35</sup>S)-metionina secretadas al medio de cultivo. Al cabo de la incubación con el material radiactivo, el medio de cultivo de las células fue aspirado con pipeta Pasteur. Se centrifugó para remover las células flotantes y se precipitó con 10% de TCA en hielo. Las proteínas precipitadas se lavaron 2 veces con acetona fría (Merck) para remover el TCA y se resuspendieron en 50 ul de buffer muestra (2% de SDS, 20% de glicerol, 0,125 M de Tris HCl pH 6,8; 2,5% de β-mercapto etanol y 0,1% de azul de bromofenol). Se contó una alícuota usando Tolueno Omnifluor como solución de centelleo. Las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de correrlas en una electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida (según Laemmli, 1970), usando 10% de acrilamida. Las muestras se hirvieron durante 2 minutos antes de ser sembradas. Los geles se revelaron usando la técnica descrita por Bonner y Laskey, 1974;

Laskey y Mills, 1977.

8.2.1. Determinación de las proteínas intracelulares marcadas con ( $^{35}\text{S}$ )-metionina. Luego de la incubación con el material radiactivo, se removi6 el medio de cultivo y las c6lulas se lavaron 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  fr6o. Se agregaron 40 ul de SDS 0,3% hirviendo y luego, 10 ul de DNAsa/RNAsa en hielo. Los extractos obtenidos se precipitaron con 10% de TCA en hielo. Se cont6 una al6cuota utilizando Tolueno Omnifluor como soluci6n de centelleo. Las muestras se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de correrlas en una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. La primera dimensi6n fue un isoelectroenfoque, efectuado seg6n O'Farrell (1975), para lo cual se utiliz6 una soluci6n de anfolitos al 2%, de pH 3,5 a 10. La segunda dimensi6n se corri6 seg6n Laemmli (1970), usando 10% de acrilamida.

8.2.2. Determinaci6n de las prote6nas intracelulares (nucleares y citoplasm6ticas) marcadas con ( $^{35}\text{S}$ )-metionina. Luego de la incubaci6n con el material radiactivo, se removi6 el medio de cultivo y las c6lulas se lavaron 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  fr6o. Luego se cosecharon rasp6ndolas con escobilla de goma y se centrifugaron durante 2 minutos en una centr6fuga Eppendorf. Las c6lulas se resuspendieron en 50 ul de buffer TNN (50 mM de Tris pH 8; 250 mM de NaCl; 0,5% de NP-40; 1 mM de PMSF) y se agitaron en un aparato Vortex varias veces durante los 4 minutos

de tratamiento con el buffer. Las muestras se pasaron 10 veces por un homogeneizador Dounce y se centrifugaron durante 2 minutos en centrífuga Eppendorf para separar la fracción nuclear de la citoplasmática. Las proteínas citoplasmáticas y nucleares se precipitaron con 10% de TCA en hielo y se solubilizaron con 0,1 N de NaOH. Se contó una alícuota usando Bray como solución de centelleo.

#### 9. Determinación de proteínas

Se efectuó sobre células MCF-7 plaqueadas en placas de plástico de 35 mm. Se determinó el contenido total de proteínas y se discriminó entre la fracción nuclear y la citoplasmática.

Se utilizó el método descrito por Lowry y col. en 1951.

#### 10. Medición de transporte

Las células MCF-7 cultivadas en placas de plástico de 35 mm se marcaron con 100 uCi de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina (1.000 Ci/nmol; New England Nuclear, Boston, MA., USA) a distintos tiempos, según lo indicado, para hacer una cinética de la reacción.

Al cabo de cada incubación, las células se lavaron 3 veces rápidamente con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  frío; las proteínas se precipitaron con 10% de TCA en hielo durante 20 minutos y se recogió la fracción soluble en TCA. Las proteínas precipitadas se disolvieron con 0,5 ml de SDS 0,3% durante 30 minutos a 37°C. Se contó una alícuota de cada fracción (soluble y precipitable en TCA) usando Bray como solución de centelleo.

## 11. Determinación de queratinas

### 11.1. Se efectuó por análisis de Western blot

Luego de marcar las proteínas celulares con ( $^{35}\text{S}$ )-metionina, se obtuvieron los extractos celulares (tal como fue descrito en la sección 8.2.1.) y se corrieron en una electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, usando 12,5% de acrilamida. Posteriormente, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a nitrocelulosa (Schleicher y Schull, BA 85, tamaño del poro: 0,45  $\mu$ ). Las citoqueratinas se revelaron por la técnica de la inmunoperoxidasa, utilizando anticuerpos obtenidos en conejo y dirigidos contra queratinas humanas (Neal Burnette, 1981). Se procedió de la siguiente manera: luego de bloquear la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de reacción, se incubó con el anticuerpo antiqueratinas humanas diluido 1/100 durante 2 horas 30' a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo (IgG de cabra anti IgG de conejo) diluido 1/450 durante 60' a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, se incubó con el complejo PAP (peroxidasa complejada con IgG de cabra anti IgG de conejo) durante 30' a temperatura ambiente. El revelado se efectuó por el método de la diaminobencidina/agua oxigenada durante 7 minutos en la oscuridad.

### 11.2. Se efectuó por la técnica inmunocitoquímica

Las células cultivadas en placas de plástico de 35 mm se fijaron en etanol absoluto durante 10 minutos. Se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En el momento de ser usadas, se rehidrataron con PBS y se procedió tal como se describió en la sección 11.1. Luego del revelado con diaminobencidina/agua oxigenada, los núcleos de las células se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 20 segundos. El colorante viró con agua caliente. Las células se lavaron y se montaron con glicerol para su observación microscópica.

### 12. Marcación de proteínas con $(^{32}\text{P})$ -ortofosfato

Las células se marcaron durante 3 horas con 150 uCi de  $(^{32}\text{P})$ -ortofosfato por cada placa de plástico de 35 mm, en medio libre de fosfato. Para las células cultivadas en presencia de suero fetal bovino, se utilizó suero dializado durante la marcación.

12.1. Determinación de las proteínas marcadas con  $(^{32}\text{P})$ -ortofosfato secretadas al medio de cultivo. Se procedió tal como fue descrito en la sección 8.1. para las proteínas marcadas con  $(^{35}\text{S})$ -metionina.

12.2. Determinación de las proteínas celulares marcadas con  $(^{32}\text{P})$ -ortofosfato. Se procedió siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 8.2.1. para las proteínas marcadas con  $(^{35}\text{S})$ -metionina.



### 13. Separación de las células MCF-7 en subpoblaciones

Las células MCF-7 se separaron en subpoblaciones usando gradientes de densidad de un polímero de coloide de sílica (Percoll, AB Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Se prepararon 7 soluciones de densidades 1,035; 1,040; 1,050; 1,060; 1,065; 1,070 y 1,080 g/l en 2,5 M de sacarosa y se sembraron 2 ml de cada solución. Las células en crecimiento exponencial se tripsinizaron y se sembraron encima del gradiente ( $3 \cdot 10^6$  células en 1 ml de PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ). El gradiente se centrifugó a 800 g durante 45 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga de ángulo móvil.

Se colectaron fracciones cada 0,5 ml comenzando desde el extremo superior del gradiente y se lavaron 2 veces con 5 volúmenes de PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . Se efectuó el recuento del número de células en cada fracción, determinando la viabilidad celular por el ensayo de exclusión del azul tripán. Se obtuvieron 6 subpoblaciones (A a F) que corresponden a las siguientes fracciones: A (fracción 1 a fracción 15); B (fracción 16 a fracción 19); C (fracciones 20 y 21); D (fracción 22); E (fracción 23) y F (fracción 24 a fracción 30 = precipitado).

Estas subpoblaciones aisladas fueron plaqueadas separadamente y utilizadas para su estudio.

#### 14. Ensayos clonogénicos en agar blando

Se preparó un agar base (0,5% de concentración final en 1 ml por placa de plástico de 35 mm; BioRad, Richmond, CA., USA) con medio Dulbecco/F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino o 1 mg/ml de seroalbúmina bovina fracción V (de Cohn). Encima se sembraron  $10^4$  células por placa en 1 ml de medio de cultivo conteniendo los factores en ensayo y agar (0,4% de concentración final). Al cabo de 10 días, se agregaron 0,5 ml de una solución estéril de cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (0,5 mg/ml en agua) y las placas se incubaron en la oscuridad durante 24 horas. Se efectuó el recuento de colonias viables (teñidas con el colorante) bajo el microscopio. Las colonias se fotografiaron usando película Polaroid.

#### 15. Determinación del efecto de factores de crecimiento sobre células quiescentes

Las células se plaquearon en presencia de 10% de suero fetal bovino. Cuatro horas después, se lavaron exhaustivamente con PBS- $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  y se pasaron a medio Dulbecco/F-12/BSA pero sin el aporte de insulina para inducir la entrada de las células al estado de quiescencia. Luego de 48 horas, se agregaron los factores de crecimiento en estudio por 24 horas, al cabo de las cuales se efectuó una marcación con metil-( $^3\text{H}$ )-timidina, 1 uCi/ml (actividad específica = 1 uCi/ul) durante 2 horas a 37°C. Al cabo de la incubación se aspiró el medio de cultivo. Las células se

lavarón con PBS-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> frío; se precipitarón las proteínas con 10% de TCA en hielo y se disolvieron con 0,3% de SDS durante 30 minutos a 37°C. Se contó una alícuota usando Bray como solución de centelleo.

16. Determinación del "TLI": porcentaje de núcleos mitóticos marcados con metil-(<sup>3</sup>H)-timidina

Las células se marcarón con 10 uCi/ml de metil-(<sup>3</sup>H)-timidina (actividad específica=1uCi/uI) durante 2 horas a 37°C. Las células se lavarón 2 veces con PBS-Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> frío y se fijaron con metanol:ácido acético (2:1) durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se lavarón 2 veces con metanol y se cubrierón con emulsión NTB-2 Kodak Nuclear Track Emulsion. Se expusieron durante 7 días a -70°C en la oscuridad dentro de un desecador y se revelaron con revelador D19 de Kodak. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina y se determinó el porcentaje de núcleos marcados en un número de células superior a 500.

17. Determinación de receptores estrogénicos (RE) por inmunocitoquímica

Se utilizó el kit del Laboratorio Abbott ER-ICA que contiene el anticuerpo monoclonal obtenido en rata y dirigido contra el receptor estrogénico humano.

Las células cultivadas en placas de plástico de 35 mm se fijaron durante 12 minutos en paraformaldehído al 3,7% en PBS a temperatura ambiente; 4 minutos en metanol enfriado a -20°C y 2 minutos en una mezcla de metanol:acetona (1:1) a -20°C. Las placas

se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser usadas, en presencia de una solución conservadora (4,3 g/l de sacarosa y 0,33 g/l de cloruro de magnesio anhidro en una mezcla de PBS:glicerol (1:1)).

En el momento de ser usadas, las células se rehidrataron por sucesivos pasajes por PBS. Se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol y 0,6% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 volúmenes, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se bloquearon los sitios inespecíficos de reacción incubando las células con suero de cabra al 10% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se incubó con el anticuerpo monoclonal obtenido en rata y dirigido contra el receptor estrogénico humano, durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo (Ig G de cabra antiIgG de rata) durante 30 minutos. Luego de lavar las células, se incubó con el complejo PAP (peroxidasa complejada con Ig G de cabra anti Ig G de rata) durante 30 minutos. El revelado se efectuó por el método de la diaminobencidina/agua oxigenada utilizando los reactivos provistos por el Laboratorio Abbott, durante 6 minutos en la oscuridad. Los núcleos de las células se tiñeron con hematoxilina de Harris al 10% durante 5 segundos. El colorante viró con agua caliente; las células se lavaron y se montó con glicerol para la observación microscópica. Se determinó el porcentaje de células con núcleos teñidos con la diaminobencidina. Dado que se observaron distintas intensidades de tinción nuclear, se determinaron 2 grados de positividad: tinción intensa y tinción débil.

### 18. Determinación de antígeno carcinoembrionario (CEA) por inmunocitoquímica

Se utilizó el anticuerpo dirigido contra CEA provisto por Dakopats, Copenhague, y la técnica del complejo avidina-biotina (Vectastin ABC, Laboratorios Vector, Burlingame, CA., USA).

Las células cultivadas en placas de plástico de 35 mm se fijaron con etanol absoluto durante 10 minutos. Se conservaron hasta su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el momento de ser usadas, las células se rehidrataron con PBS; se bloquearon la peroxidasa endógena y los sitios inespecíficos de reacción según fue descrito para la determinación de receptores estrogénicos.

Se incubó con el anticuerpo antiCEA diluido 1/500 durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de lavar con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo biotinilado durante 30 minutos. En este momento se preparó la dilución del tercer anticuerpo (reactivo ABC) para que se estabilizara durante 30 minutos. Finalmente, se incubó con el reactivo ABC durante 60 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

El revelado se efectuó por el método de la diaminobencidina/agua oxigenada 30 volúmenes, tal como fue descrito para la determinación de receptores estrogénicos. Luego de teñir los núcleos celulares con hematoxilina de Harris, las células se montaron con glicerol para su observación microscópica.

19. Determinación de la proteína p21 codificada por el oncogen ras utilizando la técnica inmunocitoquímica

Se utilizó el anticuerpo monoclonal Y13-259, gentilmente cedido por el Dr. Furth (Furth y col., 1982).

Las células plaqueadas en placas de plástico de 35 mm se fijaron tal como fue descrito para la determinación de receptores estrogénicos. Luego de rehidratar las células con PBS y de bloquear la peroxidasa endógena, se bloquearon los sitios inespecíficos de reacción incubando las células con suero de conejo al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS y se incubó con el anticuerpo monoclonal Y13-259 (a una concentración final de 5 ug/ml) durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego de lavar con PBS, se incubó con el complejo PAP (peroxidasa conjugada a Ig G de conejo anti Ig G de rata), (Dako Immunoglobulin, Copenhague) diluido 1/50, durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.

El revelado se efectuó tal como fue descrito para la determinación de receptores estrogénicos. Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina, luego de lo cual se montaron las células con glicerol para la observación microscópica.

20. Tinción de lípidos con "Oil red O"

Las células cultivadas en placas de plástico de 35 mm se tiñeron durante 10 minutos con una solución de oil red O 0,5% P/V en isopropanol. Se lavaron las células y se tiñeron los núcleos durante 15 segundos con hematoxilina de Harris. Las gotas de

lípidos se observaron como manchas de color rojo brillante, en contraste con los núcleos de tinción azulada.

### 21. Obtención de los medios condicionados

Los medios condicionados por las células MCF-7 se centrifugaron para eliminar restos celulares y se filtraron por membrana de 0,22 u (Millex, Millipore Corp., Bedford, MA., USA). Se conservaron congelados a -20°C en presencia de 0,2% V/V de aprotinina (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO., USA) hasta el momento de ser usados.

### 22. Microscopía electrónica

La preparación de las muestras para la microscopía electrónica fue efectuada por Silvana Ragone, perteneciente a la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Las células MCF-7 se fijaron "in situ" con 2,5% de glutaraldehído en 0,1 M de buffer cacodilato pH 7,4 a temperatura ambiente durante 10 minutos y 2,5% de glutaraldehído: 2% de tetróxido de osmio (1:2) en buffer cacodilato a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo. Luego de deshidratar con concentraciones crecientes de etanol, se agregó óxido de propileno para despegar la monocapa de células, la cual fue concentrada en pequeños precipitados y embebida en Maraglas. Secciones ultrafinas se contrastaron con una solución de acetato de uranilo y se fotografiaron en un microscopio electrónico Phillips 300.

### 23. Análisis citogenético

Este estudio fue efectuado por las Dras. Irene Larripa e Irma Slavutsky pertenecientes a la Academia Nacional de Medicina.

Las células MCF-7 en crecimiento exponencial y la subpoblación E (en este caso, menos de 24 horas luego de haber sido obtenida) se expusieron durante 1 hora a 0,1 ug/ml de colcemid. El medio de cultivo se removió y las células se despegaron por tratamiento con 0,25% de tripsina-0,2% EDTA. Luego se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en una solución hipotónica 0,075 M de ClK durante 15 minutos. Las células se fijaron con metanol:acético glacial (3:1) y se prepararon los extendidos. Los cromosomas se tiñeron con Giemsa y se bandearon con tripsina-Giemsa, según Seabright (1971). Los cromosomas se identificaron según el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN, 1978).



## RESULTADOS

### ESTUDIO DE LA LINEA CELULAR MCF-7

#### A. Análisis de la heterogeneidad celular

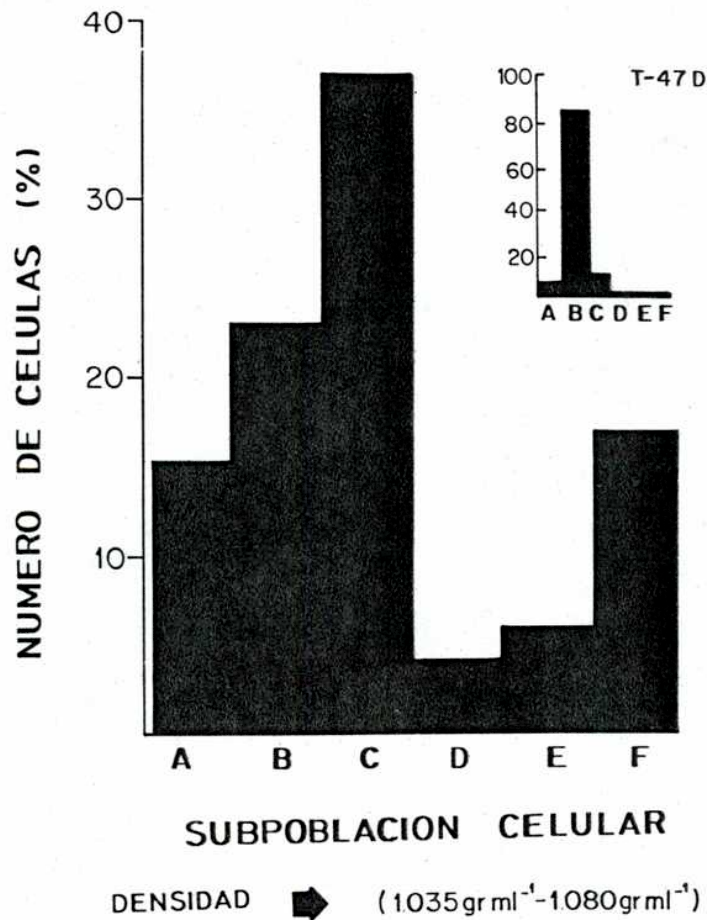
##### A.1. Distribución de las células en gradientes de densidad

Luego de someter las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero fetal bovino a una centrifugación en gradientes de densidad en coloide de sílica (Percoll), se obtuvieron 6 subpoblaciones. La Fig. 1 muestra la distribución de las células a partir de un cultivo en crecimiento exponencial. La subpoblación C resultó ser la más abundante mientras que la D y la E fueron las minoritarias. El porcentaje de la subpoblación E se mantuvo constante en todas las determinaciones efectuadas y fue del  $(5,8 \pm 0,2)\%$ . La contribución de las demás subpoblaciones sufrió variaciones dentro de un rango más amplio; así por ejemplo, la subpoblación A contribuyó con el 14-20% y la subpoblación C, con el 28-35% según los cálculos correspondientes a más de 60 experimentos distintos. En la Fig. 1, la densidad aumenta desde la subpoblación A ( $\rho$ : 1,035-1,050) hasta la subpoblación F ( $\rho$ : 1,070-1,080).

Para demostrar que la heterogeneidad observada en las células MCF-7 no era un artefacto de la técnica utilizada, se sometieron las células de tumor de mama humano T-47D clon 11 (receptor estrogénico-positivas) a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. En este caso, se obtuvo un solo pico, como se observa en el inserto de la Fig. 1, tal como habían obtenido

Fig. 1: Distribución de las células MCF-7 y T-47D (inserto) en gradientes de densidad de Percoll.

Se sometieron  $3 \cdot 10^6$  células en crecimiento exponencial a una centrifugación en gradientes de densidad, tal como se describe en la sección materiales y métodos. Los resultados obtenidos para las células MCF-7 corresponden al promedio de 60 experimentos distintos; los valores correspondientes a las células T-47D provienen de 3 experimentos distintos.



Podhajcer y col. en 1986 utilizando gradientes de seroalbúmina bovina.

## A.2. Análisis de las distintas subpoblaciones

Las 6 subpoblaciones aisladas fueron sometidas a diversos ensayos tendientes a su caracterización.

### A.2.1. Capacidad de generar otras subpoblaciones

Una de las propiedades de la célula "stem" es la capacidad de generar todos los componentes de la jerarquía celular dado que es la única célula del sistema que puede originarse a sí misma y generar células destinadas a la diferenciación. Por lo tanto, si las 6 subpoblaciones aisladas correspondieran a distintos estadios de la jerarquía celular, sólo las células "stem" serían capaces de generar todas las otras subpoblaciones.

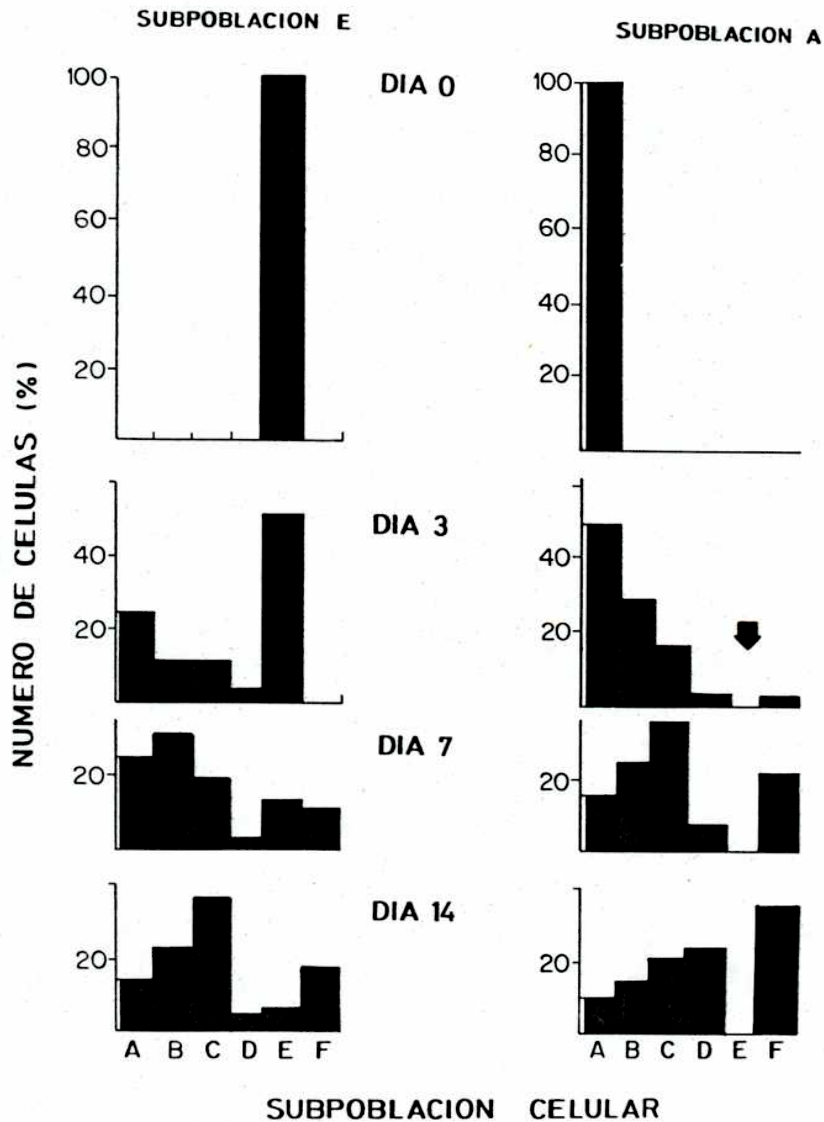
Para determinar cuál era la subpoblación que contenía las células "stem", las distintas subpoblaciones aisladas fueron subcultivadas en presencia de suero y sometidas a distintos tiempos a una centrifugación en gradientes de densidad. Un ejemplo típico de los resultados obtenidos se observa en la Fig. 2.

Las células de la subpoblación E fueron las únicas capaces de generar todas las demás subpoblaciones. A partir del día 14, la contribución de cada subpoblación a la población total fue la misma que en la línea celular.

La subpoblación A fue capaz de originar las subpoblaciones B, C, D y F pero no la E; la B generó C, D y F; la C originó D y F; la D dio F y la F quedó como tal, habiéndose subcultivado durante 30 días (estos resultados no se muestran).

Fig. 2: Distinta capacidad de las subpoblaciones E y A para dar origen a todas las subpoblaciones que componen la línea parental.

Las subpoblaciones E y A se aislaron a partir de la población total de células MCF-7 y se subcultivaron durante distintos tiempos, al cabo de los cuales fueron sometidas nuevamente a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. Los gráficos presentados corresponden a experimentos efectuados por triplicado.



La Fig. 2 permite deducir la siguiente secuencia de aparición de las subpoblaciones:  $E \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F$ . Asimismo, puede suponerse que la subpoblación E está enriquecida en células "stem" dado que fue la única capaz de generar todas las subpoblaciones, ninguna de ellas la originó y además contribuye con una pequeña pero constante proporción a la población total.

#### A.2.2. Capacidad proliferativa

Las distintas subpoblaciones fueron subcultivadas en presencia de suero durante 8 días, obteniéndose las curvas de crecimiento que se presentan en la Fig. 3.

La subpoblación E resultó ser la de mayor velocidad de crecimiento; al día 8 de cultivo, el número de células aumentó 16 veces con respecto al número inicial. La subpoblación F fue la de menor capacidad proliferativa; no llegó a duplicarse en 8 días de cultivo.

El análisis de las velocidades de crecimiento se complementó con un detallado estudio de la capacidad de síntesis de ADN de las distintas subpoblaciones durante los primeros 3 días de cultivo. Se eligió este intervalo porque a tiempos más prolongados las subpoblaciones comienzan a ser heterogéneas.

A las 24 horas de cultivo, el "TLI" (índice de marcación con timidina) en las 6 subpoblaciones fue del 30%, como se observa en la Fig. 4. En todas las subpoblaciones, a excepción de la E, el "TLI" decayó a medida que transcurrieron los días de cultivo. Al tercer día de cultivo, la relación entre el "TLI" de la subpoblación E (la de mayor capacidad proliferativa) y el de la sub-

Fig. 3: Curvas de crecimiento de las distintas subpoblaciones.

Las subpoblaciones se aislaron a partir de la línea celular MCF-7. Se sembraron  $8 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm y se subcultivaron durante varios días. A los tiempos indicados se efectuó el recuento celular. Los números colocados entre paréntesis indican el incremento observado en el número de células al cabo de 8 días de cultivo con respecto al número inicial. Los valores obtenidos corresponden al promedio de 18 experimentos distintos.

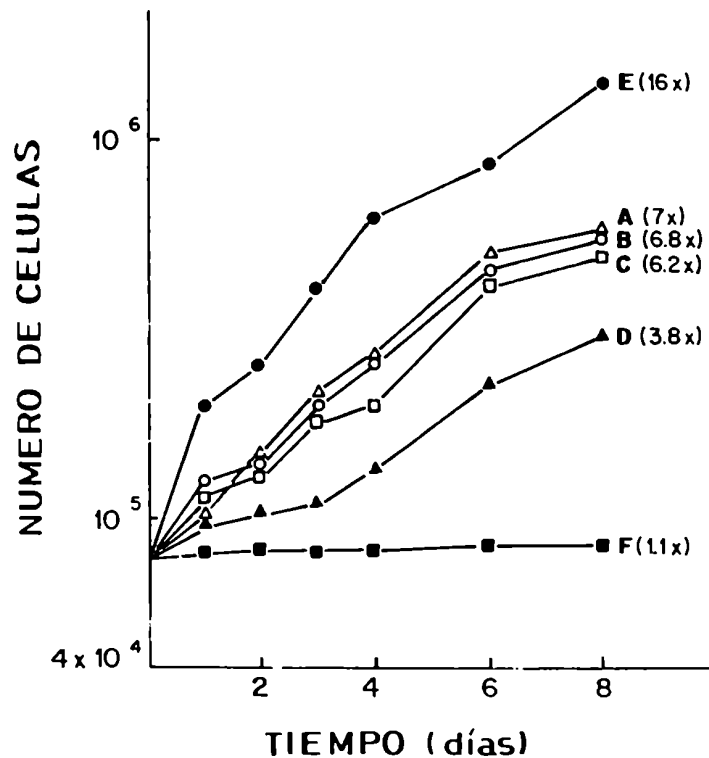
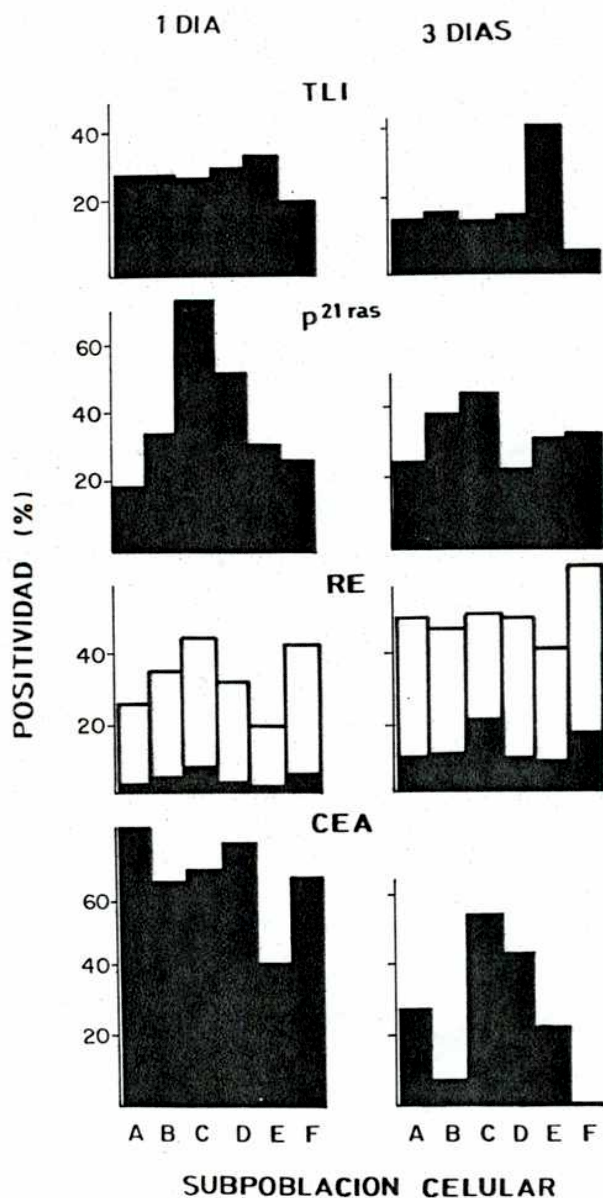


Fig. 4: Índice de marcación con timidina (TLI) y expresión de diversos marcadores: proteína p21, producto del gen ras (p21<sup>ras</sup>), receptores estrogénicos (RE) y antígeno carcinoembrionario (CEA) en las distintas subpoblaciones, medidos al cabo de 1 y 3 días de cultivo.

Las subpoblaciones se aislaron a partir de las células MCF-7 por centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. Al cabo de 1 y 3 días de cultivo, se analizaron varios parámetros en las subpoblaciones aisladas, tal como se describe en la sección materiales y métodos. En el histograma correspondiente a la determinación de RE, las barras blancas simbolizan el porcentaje total de células RE-positivas mientras que las barras negras representan el porcentaje de células RE-positivas que dan una tinción intensa. Los resultados corresponden a experimentos efectuados en triplicado.



población F (la de menor velocidad de crecimiento) fue de 8. Debo aclarar que en la elaboración de esta figura no se ha considerado que en la autoradiografía de la subpoblación F había menos granos de plata depositados por núcleo marcado.

Estos resultados fueron confirmados marcando las células con ( $^3\text{H}$ )-timidina durante 2 horas y determinando la radioactividad luego de precipitar el ADN. A las 24 horas de cultivo, la incorporación de precursor radiactivo normalizada por el número de células en la subpoblación E fue 1,8 veces mayor que el valor correspondiente a la subpoblación F. Para las subpoblaciones A, B, C, D y F, la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina medida fue prácticamente la misma (9.000 - 10.000 cpm/ $10^5$  células).

Al cabo de 3 días de cultivo, la relación entre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina en la subpoblación E con respecto a la F ascendió a 12 veces. En orden decreciente siguieron las subpoblaciones A, B, C, D y F.

En la Fig. 5.I se muestra la autoradiografía correspondiente a la subpoblación D marcada con ( $^3\text{H}$ )-timidina, luego de 24 horas de cultivo.

### A.2.3. Crecimiento independiente del anclaje

Las subpoblaciones obtenidas luego de someter la línea celular a una centrifugación en gradientes de densidad fueron cultivadas en un medio semisólido (agar blando) en presencia de suero durante 10 días. En ese momento se determinó el índice clonogénico de cada subpoblación, tal como se presenta en la Tabla I.

Las subpoblaciones no sólo difirieron en su capacidad de



Fig. 5: Determinación del índice de marcación con timidina (I) y expresión de diversos marcadores: proteína p21, codificada por el gen ras (II), receptores estrogénicos (III) y antígeno carcinoembrionario (IV) en las subpoblaciones aisladas.

- (I) Subpoblación D, día de cultivo.  
 (II) Subpoblación C, día 1 de cultivo.  
 (III) Subpoblación C, día 1 de cultivo.  
 Las flechas indican células intensamente (S) y débilmente (W) teñidas.  
 (IV) Subpoblación A, día 1 de cultivo (x 360).

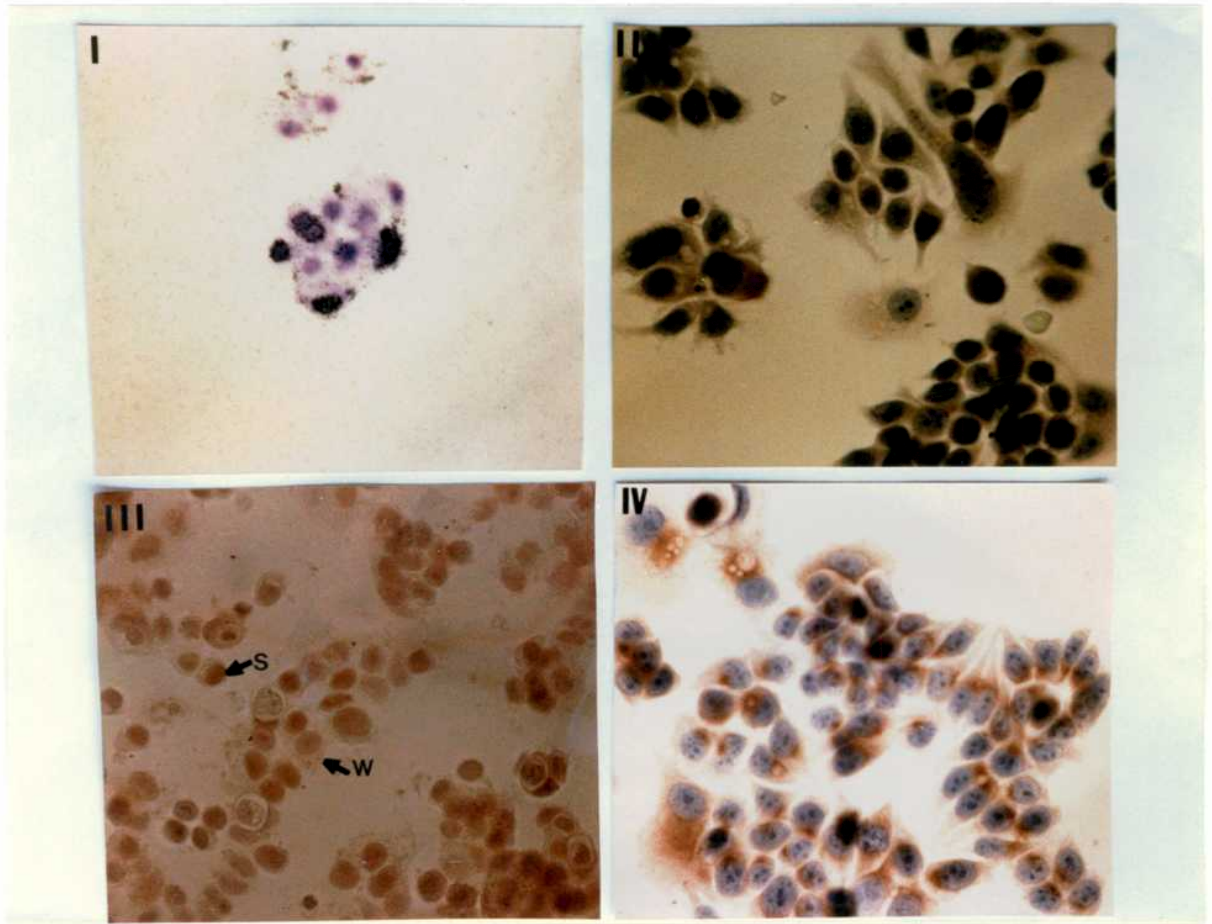
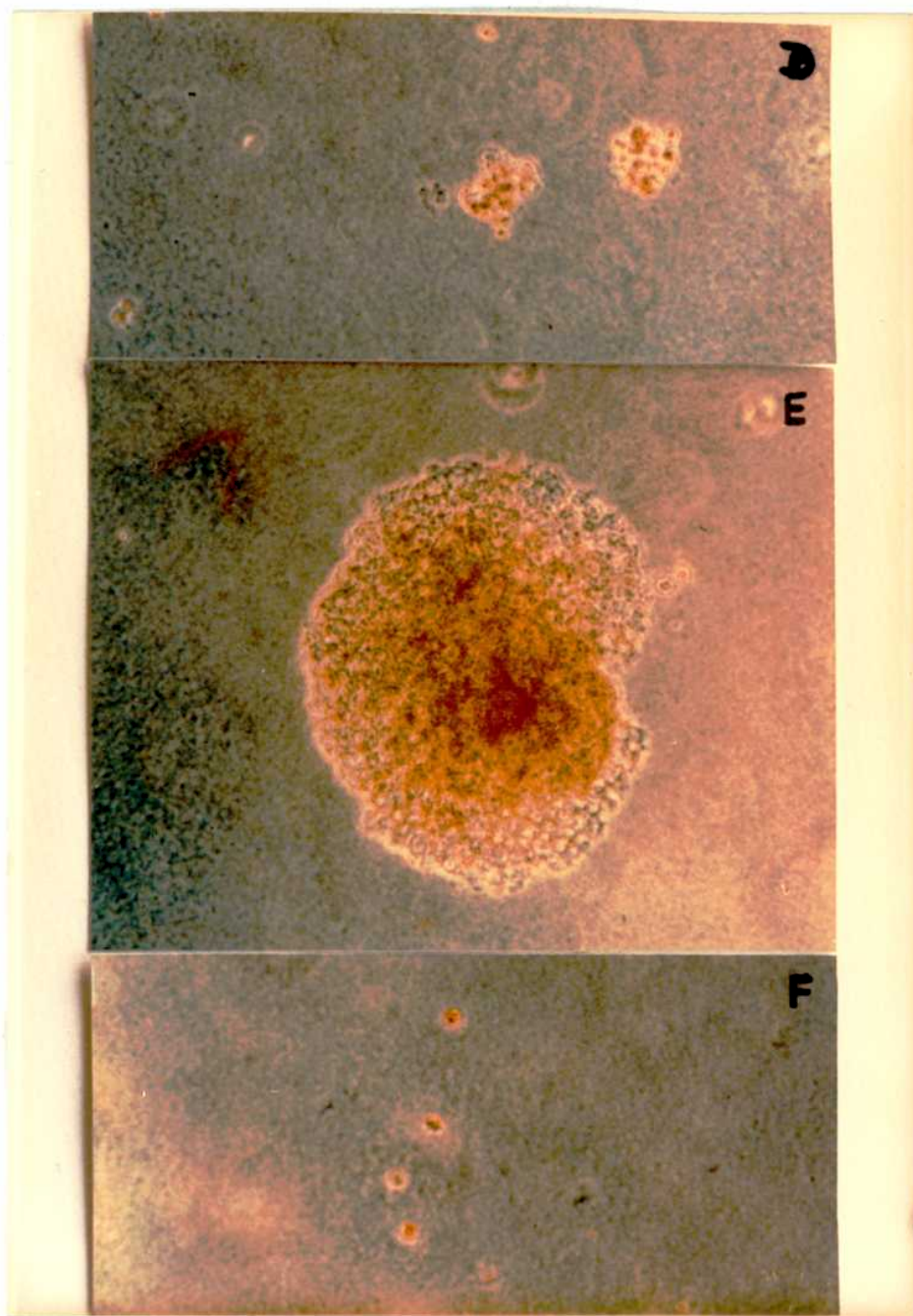


Tabla I. Crecimiento independiente del anclaje de las subpoblaciones aisladas

Sub-población	Indice clonogénico
A	1,67 <sub>±</sub> 1,25
B	0,39 <sub>±</sub> 0,17
C	0
D	0,054 <sub>±</sub> 0,034
E	6,62 <sub>±</sub> 1,18
F	0



Las subpoblaciones aisladas se cultivaron durante 10 días en un medio semisólido (agar blando), tal como se describió en materiales y métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de formación de colonias (valor medio<sub>±</sub>D.S.) y corresponden al promedio de 3 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado. Las diferencias son estadísticamente significativas; la relación E a A da  $p < 0,005$ ; la relación E a B da  $p < 0,005$ .

generar colonias sino también en el tamaño de las mismas. Así, por ejemplo, para las subpoblaciones A, B y E se obtuvieron colonias grandes de más de 3.000 células/colonia al décimo día de cultivo mientras que la subpoblación D originó en ese mismo tiempo colonias pequeñas conteniendo aproximadamente 30 células.

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos al variar las condiciones de cultivo de la subpoblación E. La eficiencia clonogénica se mantuvo en aproximadamente un 7% en presencia de suero completo tratado o no con carbón activado para depletarlo de estrógenos pero ascendió al 9% al cultivar las células en un medio libre de suero. El tamaño de las colonias no varió significativamente en las tres condiciones de cultivo.

#### A.2.4. Expresión de distintos marcadores celulares

##### A.2.4.1. Expresión de la proteína p21 codificada por el oncogen ras

Se analizó la expresión de la proteína de 21.000 daltons de peso molecular codificada por el oncogen ras debido a que los trabajos de De Bortoli y col. en 1985 y Ohuchi y col. en 1986 describieron alteraciones en la expresión de la proteína p21 en tumores de mama humano. Por otro lado, Graham y col. demostraron en 1985 una amplificación del gen N-ras en las células MCF-7.

La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos luego de determinar la expresión de la proteína p21 por la técnica inmunocitoquímica en las distintas subpoblaciones a las 24 y 72 horas de cultivo en presencia de suero.

Si bien todas las subpoblaciones expresaron la proteína

Tabla II. Crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación E: influencia del suero y del aporte hormonal

Condiciones de cultivo	Número de colonias		
	Pequeñas ( $\leq 30$ células)	Grandes ( $> 30$ células)	Totales (pequeñas+grandes)
En presencia de suero completo (Dulbecco/F-12/FBS)	653	116	769
En presencia de suero depletado de estrógenos (Dulbecco/F-12/FBS <u>char</u> colizado)	610	165	775
En ausencia de suero y estrógenos (Dulbecco/F-12/BSA)	761	174	935

La subpoblación E se cultivó durante 10 días en agar blando, tal como se describió en materiales y métodos. Se evaluó el efecto del suero y del aporte estrogénico sobre la eficiencia clonogénica de dicha subpoblación. Los resultados que se presentan en esta tabla corresponden a dos experimentos efectuados por triplicado.

p21, el mayor porcentaje de células positivas y con la mayor intensidad de tinción se verificó en la subpoblación C.

En la Fig. 5 II se muestra la autoradiografía correspondiente a la subpoblación C a las 24 horas de cultivo. Puede apreciarse que la proteína p21 se localiza preferentemente en el citoplasma.

#### A.2.4.2. Determinación del contenido de receptor estrogénico (RE)

La determinación se efectuó por el método inmunocitoquímico en lugar de emplear el método bioquímico para poder detectar variaciones entre las células, aún de la misma subpoblación y porque según el trabajo de Thorpe en 1987, este método es el más sensible.

Se determinó el contenido de RE en cada una de las subpoblaciones al primer y tercer día de cultivo en presencia de suero.

El número total de células positivas no varió significativamente en las distintas subpoblaciones; se observó la tendencia a aumentar el contenido de RE a medida que transcurrían los días de cultivo.

Se distinguieron 2 niveles de positividad: intenso (s) y débil (w), como puede apreciarse en la Fig. 5 III para la subpoblación C.

En la Fig. 4 se muestra el porcentaje de células positivas totales (intensas y débiles) indicado con barras blancas mientras que el porcentaje de células que dan tinción intensa se indica con barras negras.

A las 24 horas de cultivo, las subpoblaciones C y F fueron las que presentaron mayor contenido de receptor estrogénico (evaluado a través del porcentaje de células positivas totales), siendo las células de la subpoblación C las de tinción más intensa.

A los 3 días de cultivo, el mayor porcentaje de células positivas correspondió a la subpoblación F. El porcentaje de células intensamente teñidas no varió significativamente entre las subpoblaciones C y F.

#### A.2.4.3. Expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA)

Los trabajos de Walker en 1980 y de Bravo y col. en 1985 demostraron que la producción de CEA varía según el grado de diferenciación en tumores colorectales y de mama humanos.

Se decidió, entonces, analizar la expresión de CEA en las subpoblaciones aisladas para lo cual se utilizó el método inmunocitoquímico.

En la Fig. 4 se observa que el contenido de CEA en las subpoblaciones fue mayor a las 24 horas que a los 3 días de cultivo. En ese momento, la subpoblación F había perdido prácticamente todo su contenido de CEA.

En la Fig. 5 IV se observa la autoradiografía obtenida para la subpoblación A al primer día de cultivo.

#### A.2.4.4. Contenido de lípidos

Para evaluar el contenido de lípidos se sometieron las subpoblaciones aisladas a una tinción con el colorante oil red O.

A las 24 horas de cultivo en presencia de suero, la subpoblación F resultó ser la que presentaba mayor contenido de lípidos, como se aprecia en la Fig. 6a. La subpoblación B tuvo un bajo contenido lipídico y no se tiñeron las células de la subpoblación E. En esta subpoblación se detectó aproximadamente un 8% de núcleos mitóticos por campo observado (Fig. 6b). La tinción se repitió al sexto día de cultivo de las subpoblaciones; la coloración fue intensa en la subpoblación B debido a que esta subpoblación había generado células con mayor grado de diferenciación. La subpoblación E se positivizó al cabo de 6 días de cultivo y la coloración fue más intensa luego de 14 días de cultivo (Fig. 6c), cuando ya se habían generado todas las demás subpoblaciones, tal como se aprecia en la Fig. 2.

#### A.2.5. Respuesta a distintos factores de crecimiento

La técnica de separación de las células MCF-7 en 6 subpoblaciones permitió estudiar los requerimientos de diversos factores de crecimiento en cada subpoblación.

##### A.2.5.1. Efecto de diversos factores de crecimiento sobre las subpoblaciones quiescentes

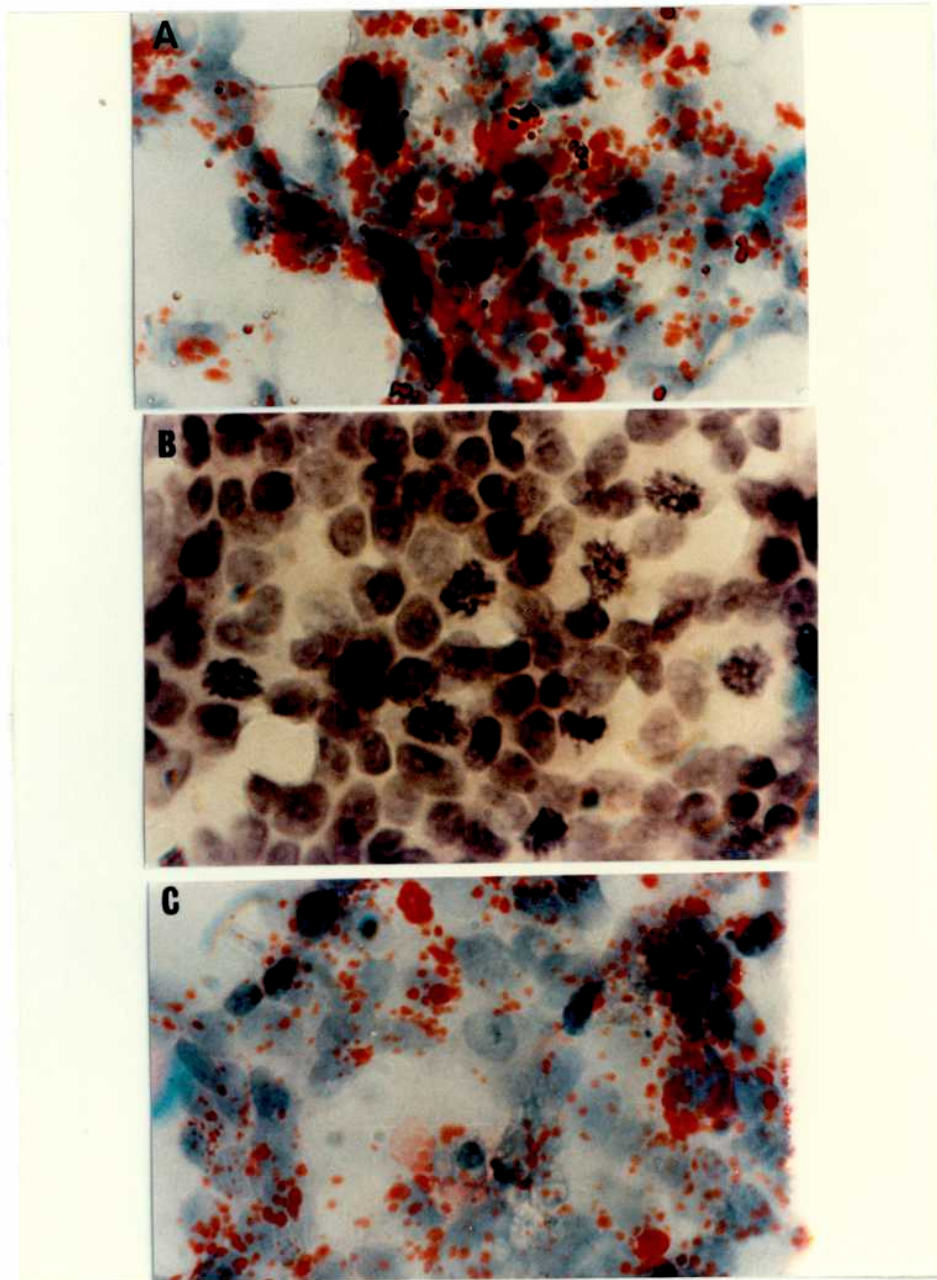
Las subpoblaciones aisladas fueron plaqueadas a baja densidad celular (20.000 células/hoyo en una placa de 24 hoyos) en



Fig. 6: Tinción de lípidos con "oil red O" en las subpoblaciones aisladas.

Se procedió tal como se describe en la sección materiales y métodos.

- (A) Subpoblación F, día 1 de cultivo.
- (B) Subpoblación E, día 1 de cultivo.
- (C) Subpoblación E, día 14 de cultivo.





presencia de suero. Al cabo de 4 horas, se lavaron 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  y se agregó medio Dulbecco/F-12 (1:1) con 1 mg/ml de seroalbúmina bovina fracción V sin el aporte de factores de crecimiento. Luego de 2-3 días se agregaron los distintos factores de crecimiento en estudio, ensayándose varias concentraciones de cada uno de ellos. Al cabo de 24 horas, se efectuó una marcación con ( $^3\text{H}$ )-timidina durante 2 horas.

Se evaluó: (I) si todas las subpoblaciones detenían su síntesis de ADN en ausencia de factores de crecimiento, entrando en un estado de quiescencia.

(II) cuáles de los factores de crecimiento ensayados eran capaces de inducir la síntesis de ADN en las células quiescentes.

En el caso (I), la medición de la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina en las células control de cada subpoblación, cultivadas durante 3-4 días en ausencia de factores de crecimiento, demostró que las subpoblaciones son heterogéneas en cuanto a sus requerimientos para la síntesis de ADN.

Las subpoblaciones D y F detuvieron la síntesis de ADN en ausencia de factores de crecimiento y entraron en un estado de quiescencia. La incorporación de precursor radiactivo fue de 860 y 450 cpm/ $10^5$  células, respectivamente. En las subpoblaciones A, B y E no se logró detener la síntesis de ADN en ausencia de factores de crecimiento; la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-timidina fue de 6.000 a 10.000 cpm/ $10^5$  células. Para la subpoblación C, la incorporación de precursor radiactivo medida fue de 3.300 cpm/ $10^5$  células.

En el caso (II), para evaluar si los factores de crecimiento eran capaces de inducir la síntesis de ADN en las células quiescentes, se comparó la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina en las células tratadas con los factores con respecto a la incorporación medida en las células control.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III y se analizan a continuación:

#### A.2.5.1.1. Efecto de insulina

El agregado de insulina indujo un notable incremento en la síntesis de ADN en las subpoblaciones D y F pero no afectó a las subpoblaciones A, B y E. Esto podría deberse a que estas tres subpoblaciones no detuvieron su crecimiento en ausencia de insulina. Una probable explicación sería que estas células produzcan y secreten al medio un factor de crecimiento semejante a insulina, como ya fue descrito por Huff y col. (1986, 1987) para esta línea celular.

La subpoblación C triplicó la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina en presencia de insulina. Este requerimiento se manifestó sólo cuando las células se plaquearon a baja densidad y desapareció al aumentar el número de células a 50.000 células/hoyo.

#### A.2.5.1.2. Efecto de trombina

La proteasa serínica trombina estimuló la síntesis de ADN en las subpoblaciones D y F. En la subpoblación D aumentó 10 veces la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina con la menor concentración

Tabla III. Incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina (cpm/10<sup>5</sup> células tratadas con los factores/cpm/10<sup>5</sup> células del control + S.D.)

Subpoblaciones	Insulina						Pg F <sub>2</sub> α			Estradiol	
	0,5 ug/ml	1 ug/ml	2 ug/ml	5 ug/ml	10 ug/ml	100 ng/ml	300 ng/ml	600 ng/ml	10-10 M	10 <sup>-9</sup> M	
	A	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,3 <sub>+0,0,1</sub>	1,2 <sub>+0,2</sub>	1,1 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,3</sub>
B	1,5 <sub>+0,1</sub>	1,7 <sub>+0,4</sub>	1,6 <sub>+0,1</sub>	1,4 <sub>+0,2</sub>	1,4 <sub>+0,3</sub>	1,1 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	1,8 <sub>+0,1</sub>	1,2 <sub>+0,1</sub>	1,2 <sub>+0,1</sub>	
C	1,2 <sub>+0,1</sub>	1,8 <sub>+0,1</sub>	2,2 <sub>+0,1</sub>	2,2 <sub>+0,3</sub>	3,5 <sub>+0,2</sub>	2,6 <sub>+0,1</sub>	2,3 <sub>+0,2</sub>	4,2 <sub>+0,8</sub>	1,4 <sub>+0,6</sub>	1,6 <sub>+0,2</sub>	
D	1,6 <sub>+0,5</sub>	2,2 <sub>+0,2</sub>	28,0 <sub>+4,0</sub>	30,0 <sub>+3,7</sub>	42,0 <sub>+2,0</sub>	2,0 <sub>+0,2</sub>	2,0 <sub>+0,1</sub>	7,8 <sub>+2,2</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,8 <sub>+0,2</sub>	
E	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	0,3 <sub>+0,1</sub>	1,3 <sub>+0,3</sub>	0,8 <sub>+0,1</sub>	0,8 <sub>+0,1</sub>	
F	1,4 <sub>+0,1</sub>	3,5 <sub>+0,5</sub>	8,0 <sub>+0,2</sub>	10,0 <sub>+0,6</sub>	22,0 <sub>+3,0</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,8 <sub>+0,1</sub>	0,5 <sub>+0,1</sub>	0,6 <sub>+0,2</sub>	

76

EGF

Tramblina

Subpoblaciones	Tramblina						EGF			PDGF:EGF (1 ngr/ml:50 ngr/ml)	
	0,25 U/ml	0,5 U/ml	1 U/ml	1,5 U/ml	2 U/ml	25 ngr/ml	50 ngr/ml	100 ngr/ml	0,7 <sub>+0,1</sub>	2,4 <sub>+0,1</sub>	
	A	0,8 <sub>+0,2</sub>	0,8 <sub>+0,4</sub>	0,8 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,8 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>
B	0,9 <sub>+0,1</sub>	0,9 <sub>+0,1</sub>	1,2 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	1,1 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	2,3 <sub>+0,2</sub>	2,4 <sub>+0,1</sub>	2,4 <sub>+0,1</sub>	
C	0,9 <sub>+0,1</sub>	0,9 <sub>+0,1</sub>	1,5 <sub>+0,1</sub>	1,6 <sub>+0,1</sub>	1,7 <sub>+0,2</sub>	1,2 <sub>+0,1</sub>	1,6 <sub>+0,1</sub>	1,7 <sub>+0,1</sub>	3,5 <sub>+0,1</sub>	3,5 <sub>+0,1</sub>	
D	10,0 <sub>+1,1</sub>	14,0 <sub>+3,0</sub>	13,0 <sub>+3,2</sub>	13,0 <sub>+1,4</sub>	17,0 <sub>+2,3</sub>	1,4 <sub>+0,1</sub>	0,76 <sub>+0,1</sub>	1,1 <sub>+0,1</sub>	2,9 <sub>+0,1</sub>	2,9 <sub>+0,1</sub>	
E	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,9 <sub>+0,1</sub>	2,2 <sub>+0,2</sub>	2,0 <sub>+0,1</sub>	3,0 <sub>+0,2</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,85 <sub>+0,05</sub>	1,0 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	0,7 <sub>+0,1</sub>	
F	1,0 <sub>+0,1</sub>	1,0 <sub>+0,2</sub>	39,0 <sub>+2,1</sub>	28,0 <sub>+3,0</sub>	20,0 <sub>+2,3</sub>	1,6 <sub>+0,1</sub>	0,6 <sub>+0,2</sub>	2,1 <sub>+0,1</sub>	4,3 <sub>+0,2</sub>	4,3 <sub>+0,2</sub>	

de trombina ensayada (0,25 U/ml). Para la subpoblación F se requirió una dosis de 1 U/ml para lograr el efecto máximo.

#### A.2.5.1.3. Efecto de Pg F<sub>2</sub>α

Este factor estimuló la síntesis de ADN en las subpoblaciones C y D.

#### A.2.5.1.4. Efecto de estradiol

La respuesta a esta hormona demostró una vez más la heterogeneidad de las células MCF-7.

El estradiol indujo una estimulación en la síntesis de ADN en la subpoblación C. No afectó a las subpoblaciones A, B, D y E mientras que inhibió en un 50% la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina en la subpoblación F. Por lo tanto, las subpoblaciones C y F a pesar de responder de distinta manera, fueron las únicas sensibles al efecto de estradiol cuando se encontraron en un estado de quiescencia. Curiosamente, fueron éstas las subpoblaciones que presentaron mayor contenido de receptor estrogénico, tal como se demostró en la Fig. 4.

#### A.2.5.1.5. Efecto de PDGF, EGF y una combinación de ambos

Como ya se explicó en la introducción, el PDGF actúa sobre las células quiescentes induciendo un estado de competencia en el cual las células son sensibles al efecto de otros factores, conocidos como factores de progresión (EGF, por ejemplo) que permiten que la serie de eventos desencadenados culmine en la síntesis de ADN.

Se ensayó el efecto de PDGF, EGF y una combinación de ambos sobre las distintas subpoblaciones.

Las subpoblaciones A y E no se estimularon en presencia de PDGF, EGF o la combinación de ambos.

La subpoblación B respondió al EGF y la combinación de PDGF con EGF potenció el efecto.

La subpoblación C no respondió a una dosis de 50 ngr/ml de EGF pero sin embargo, la combinación con PDGF indujo un incremento de más de 3 veces en la síntesis de ADN.

La combinación de PDGF con EGF potenció la estimulación de la síntesis de ADN inducida por EGF en las subpoblaciones D y F.

#### A.2.5.2. Efecto de diversos factores de crecimiento sobre las subpoblaciones en activa proliferación

Las subpoblaciones aisladas se plaquearon a baja densidad celular en presencia de suero. Al cabo de 4 horas, se lavaron 2 veces con PBS- $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  y se agregó el medio de cultivo químicamente definido conteniendo los distintos factores de crecimiento en estudio. Se evaluó durante 5 días el efecto de los factores de crecimiento a través de curvas de crecimiento celular.

##### A.2.5.2.1. Efecto de trombina

Esta proteasa no modificó las velocidades de crecimiento de las subpoblaciones A, B, C y E.

Al cabo de 5 días, el agregado de 2 U/ml de trombina duplicó el número de células en la subpoblación D y cuadruplicó el

de la subpoblación F, en relación a los respectivos controles, cultivados en presencia de insulina como único factor de crecimiento regulatorio. Este efecto fue mayor cuando las células se cultivaron en un medio libre de insulina; en estas condiciones, trombina indujo un incremento de 4 veces para la subpoblación D y de 6 veces para la subpoblación F, tal como se observa en la Fig. 7 (a y b). Estos resultados se obtuvieron habiendo agregado trombina después de 4 horas de haber plaqueado las células y también al segundo día de cultivo. Sin embargo, cuando se agregó trombina cada 24 horas, se verificó un incremento del 30% en cada uno de los casos anteriormente descritos. Este resultado induce a pensar que las subpoblaciones estarían liberando proteasas al medio que inactivarían a la trombina.

#### A.2.5.2.2. Efecto de PgF<sub>2</sub>α

Se ensayó el efecto de una dosis de 300 ngr/ml de Pg F<sub>2</sub>α sobre las subpoblaciones cultivadas en presencia de insulina.

El agregado de Pg F<sub>2</sub>α no modificó las velocidades de crecimiento de las subpoblaciones A, E y F.

El crecimiento de la subpoblación B resultó inhibido en presencia de la Pg F<sub>2</sub>α; al cabo de 5 días de tratamiento, el número de células correspondió al 11% del control.

La Pg F<sub>2</sub>α estimuló el crecimiento de las subpoblaciones C y D, siendo mayor su efecto sobre la subpoblación C. Luego de 5 días de cultivo, el incremento fue del 60% para la subpoblación C y del 42% para la D.

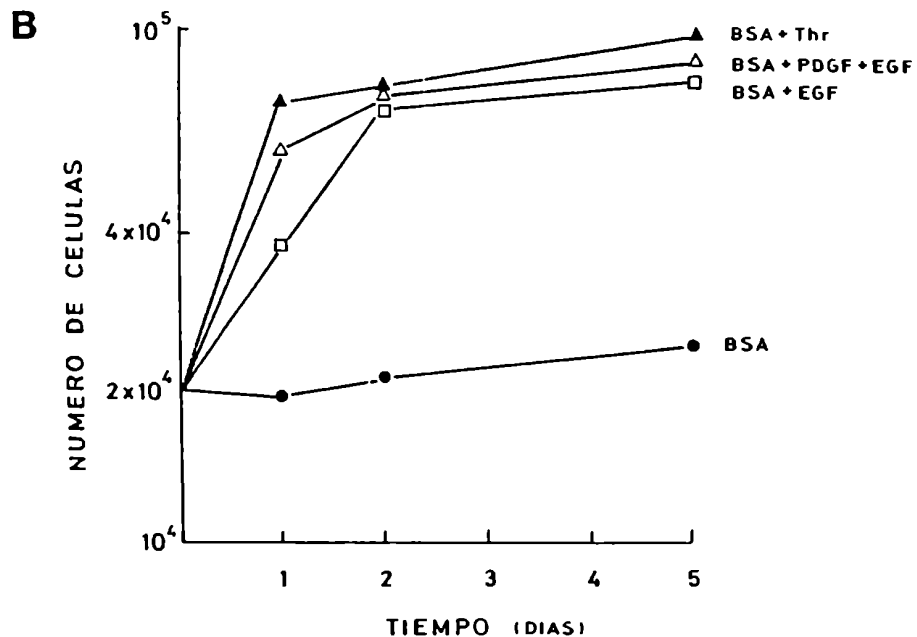
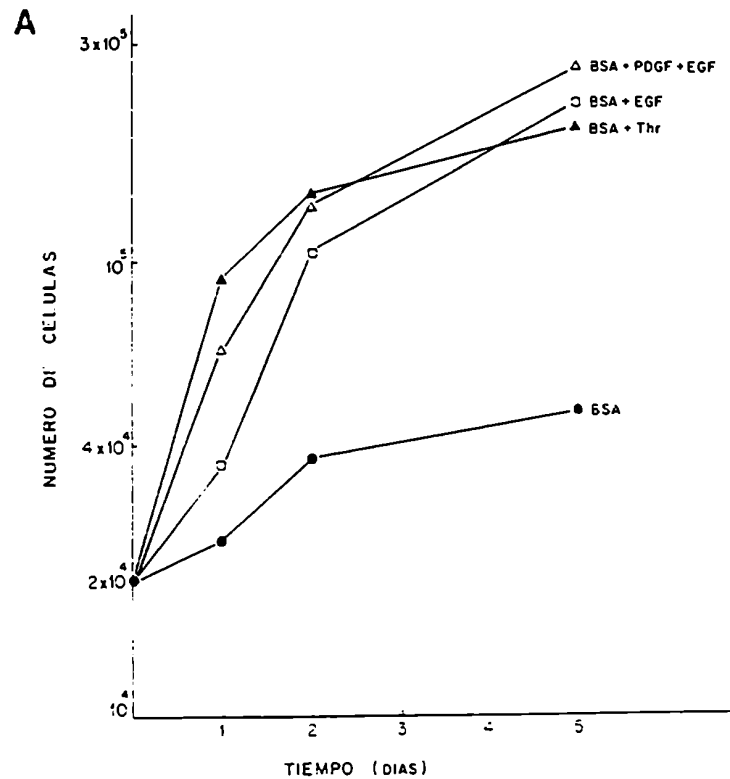
Las correspondientes curvas de crecimiento celular se

Fig. 7: Efecto de diversos factores de crecimiento (trombina, EGF y PDGF) sobre las subpoblaciones aisladas.

Las subpoblaciones se obtuvieron en forma aislada a partir de la línea celular MCF-7. Se subcultivaron durante varios días en presencia de factores de crecimiento, tal como se describe en materiales y métodos.

(A) Curvas de crecimiento para la subpoblación D.

(B) Curvas de crecimiento para la subpoblación F.



presentan en la Fig. 8.

#### A.2.5.2.3. Efecto de EGF

El agregado de 100 ngr/ml de EGF no afectó las velocidades de crecimiento de las subpoblaciones A, B, C y E.

Al cabo de 5 días de cultivo en presencia de insulina, el agregado de EGF logró duplicar el número de células de la subpoblación D con respecto al control no tratado. El incremento fue de casi 5 veces cuando las células se cultivaron en ausencia de insulina (Fig. 7a).

Cuando la subpoblación F se cultivó durante 5 días en presencia de insulina y EGF la estimulación del crecimiento fue superior a 3 veces el del control; el efecto fue más acentuado cuando el EGF se agregó en ausencia de insulina. (Fig. 7b).

#### A.2.5.2.4. Efecto de la combinación PDGF/EGF

La combinación de PDGF con EGF (1 ngr/ml: 50 ngr/ml) no alteró el crecimiento de las subpoblaciones A, B y E.

La subpoblación C incrementó en un 50% su velocidad de crecimiento a las 24 horas pero dicho efecto desapareció al segundo día de cultivo.

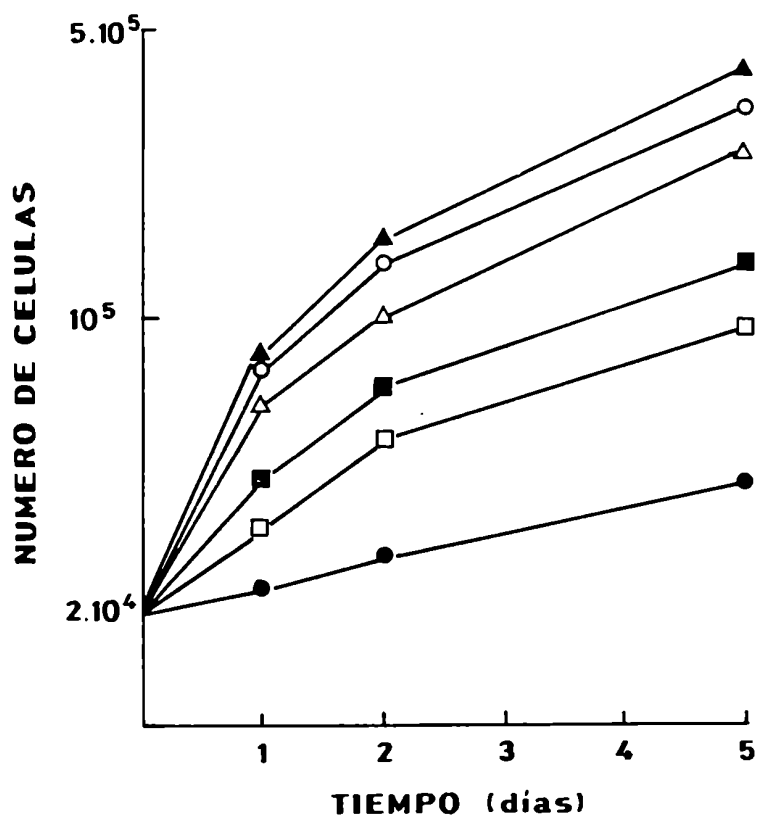
La combinación de PDGF con EGF estimuló el crecimiento de la subpoblación D aún más que por agregado de EGF solamente. La potenciación del efecto se manifestó hasta las 48 horas de cultivo de las células en ausencia de insulina pero al cabo de 5 días se alcanzó la misma densidad de saturación (Fig. 7a). Para la subpoblación F, la potenciación del efecto estimulador lograda por



Fig. 8: Efecto de  $\text{PgF}_2\alpha$  sobre el crecimiento de las subpoblaciones B, C y D.

Las subpoblaciones aisladas se sembraron a razón de  $2 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Se cultivaron en un medio libre de suero y se ensayó el efecto de  $\text{PgF}_2\alpha$  (300 ngr/ml) sobre el crecimiento celular durante 5 días.

o: subpoblación B;  $\Delta$ : subpoblación C;  $\square$ : subpoblación D. Los símbolos cerrados corresponden a las subpoblaciones tratadas con  $\text{PgF}_2\alpha$ ; los símbolos abiertos corresponden a los controles.



la combinación de PDGF con EGF se manifestó a las 24 horas de cultivo en presencia o ausencia de insulina. Al quinto día, se alcanzó la misma densidad de saturación con EGF sólo o combinado con PDGF (Fig. 7b).

#### A.2.5.3. Efecto de factores de crecimiento sobre la supervivencia de las subpoblaciones cultivadas en un medio libre de suero

Si bien la población total de células MCF-7 tiene un crecimiento óptimo en presencia de insulina como único factor regulador (como se verá en el capítulo B), las subpoblaciones aisladas cultivadas en un medio libre de suero sólo son capaces de crecer por 10 días. A partir de entonces, su crecimiento se detiene y sobreviene la muerte celular.

En base a los resultados obtenidos y anteriormente descritos, se decidió agregar distintos factores de crecimiento para ver si alguno de ellos era capaz de evitar dicha muerte celular.

##### A.2.5.3.1. Rescate con trombina

El agregado de 2 U/ml de trombina logró estimular el crecimiento de las subpoblaciones D y F. El efecto sobre la subpoblación F fue limitado dado que al cabo de 2 duplicaciones, las células detuvieron su crecimiento y dejaron de ser sensibles al efecto de trombina.

Al cabo de 5 días de tratamiento, las células de la subpoblación D se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. En la Fig. 9 se observan los perfiles

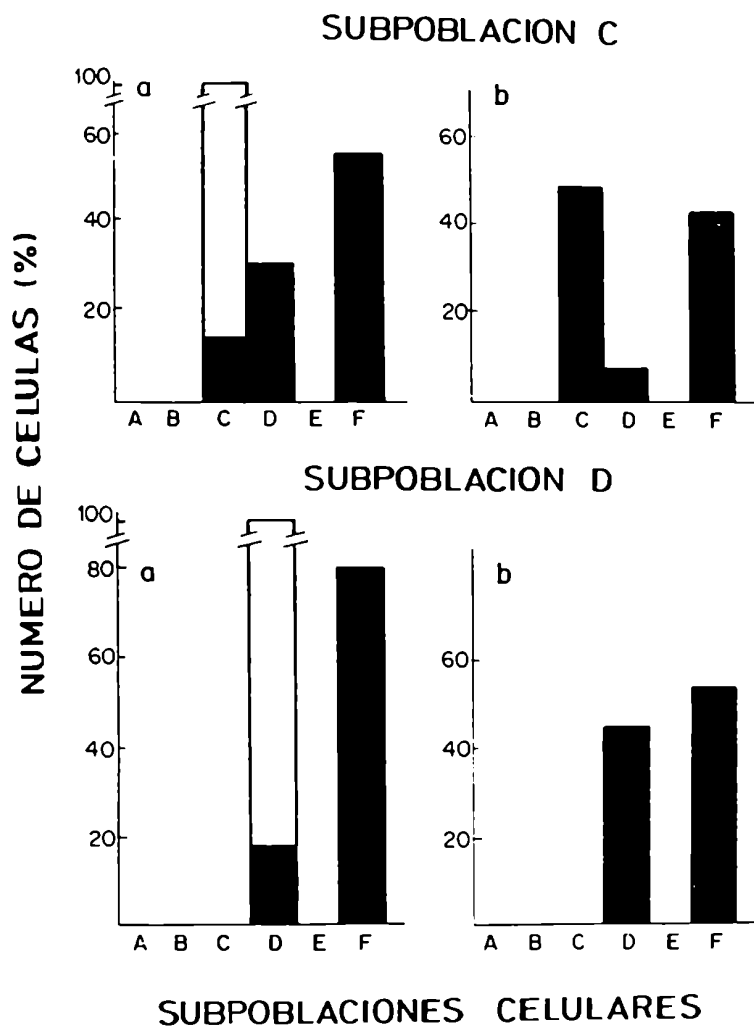
Fig. 9: Distribución de las células de la subpoblación C tratadas con  $\text{PgF}_2\alpha$  y de la subpoblación D tratadas con trombina durante 5 días, en gradientes de densidad de Percoll.

Las subpoblaciones C y D se obtuvieron en forma aislada luego de someter las células MCF-7 a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll (barras blancas). Las subpoblaciones se subcultivaron en el medio químicamente definido con o sin el aporte de 300 ngr/ml de  $\text{PgF}_2\alpha$  (para la subpoblación C) o 2 U/ml de trombina (para la subpoblación D). Las células se subcultivaron en estas condiciones durante 5 días, al cabo de los cuales se sometieron nuevamente a una centrifugación en gradientes de densidad.

(a) Células no tratadas con los factores de crecimiento.

(b) Células tratadas con los factores de crecimiento.

Los resultados obtenidos corresponden al promedio de experimentos efectuados por duplicado.



obtenidos a partir de las células tratadas y del control. Se puede apreciar que en presencia de trombina fue menor la progresión de la subpoblación D a la F. El agregado de trombina no sólo estimuló el crecimiento de la subpoblación D, disminuyendo la generación de la subpoblación F, sino que permitió la supervivencia de las células en el medio libre de suero. Esta subpoblación lleva más de 2 meses de crecimiento en estas condiciones.

#### A.2.5.3.2. Rescate con Pg F<sub>2</sub>α

Se ensayó el efecto de una dosis de 300 ngr/ml de Pg F<sub>2</sub>α sólo sobre la subpoblación C cultivada en un medio libre de suero.

Al cabo de 5 días de tratamiento, las células fueron sometidas a una centrifugación en gradientes de densidad, obteniéndose el perfil que se muestra en la Fig. 9.

El agregado de Pg F<sub>2</sub>α disminuyó la generación de subpoblaciones con mayor grado de diferenciación a partir de la subpoblación C y permitió además, la supervivencia de la subpoblación C en el medio libre de suero, en el cual ya ha superado los 2 meses de cultivo.

#### A.2.5.3.3. Rescate con estradiol

El agregado de  $10^{-10}$  M de estradiol indujo una rápida diferenciación y posterior muerte de las subpoblaciones A, B, C, D y F cultivadas durante 10 días en ausencia de suero y permitió que la subpoblación E fuera capaz de sobrevivir en dicho medio de cultivo bajo la forma de agregados multicelulares en suspensión.

Este fenómeno se explica detalladamente en el capítulo dedicado a las células MCF-7 en suspensión; aquí se comentó como un ejemplo más de factores de crecimiento u hormonas capaces de inducir la supervivencia celular.

#### A.2.6. Fosforilación de las proteínas presentes en las subpoblaciones cultivadas en presencia o ausencia de suero

Teniendo en cuenta los trabajos de Heldin y Westermark (1984) acerca de la correlación entre fosforilación de proteínas específicas y la morfología y proliferación celular, se iniciaron experimentos para determinar la capacidad de incorporación de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato a proteínas en las subpoblaciones aisladas.

Las subpoblaciones aisladas se plaquearon a baja densidad celular en presencia de suero. Se efectuaron dos ensayos de fosforilación por duplicado y cultivando las células en presencia o ausencia de suero. En este último caso, luego de que las células se adhirieron al sustrato de las placas de cultivo, se lavaron 2 veces con  $\text{PBS-Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y se agregó el medio libre de suero. Al cabo de 3 días de cultivo, se efectuó la marcación con ( $^{32}\text{P}$ )-ortofosfato, tal como se describió en materiales y métodos.

En la Tabla IV se presentan los resultados obtenidos.

Como puede observarse, la incorporación de precursor radiactivo fue siempre mayor cuando las subpoblaciones se cultivaron en ausencia de suero.

La incorporación de ( $^{32}\text{P}$ )-ortofosfato medida en la subpoblación E fue 4 veces mayor que la correspondiente a la subpoblación F cuando las células se cultivaron en presencia de

Tabla IV. Fosforilación de las subpoblaciones cultivadas en presencia o ausencia de suero

Subpoblaciones	Incorporación de ( $^{32}\text{P}$ )-ortofosfato a proteínas celulares ( $10^5$ cpm/ $10^5$ células)	
	En ausencia de suero	En presencia de suero
A	1,55 $\pm$ 0,11	5,20 $\pm$ 0,15
B	1,43 $\pm$ 0,06	3,98 $\pm$ 0,14
C	1,25 $\pm$ 0,13	3,30 $\pm$ 0,23
D	0,91 $\pm$ 0,18	1,50 $\pm$ 0,18
E	1,86 $\pm$ 0,12	5,75 $\pm$ 0,10
F	0,42 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,18

Las subpoblaciones aisladas se cultivaron durante 3 días en presencia o ausencia de suero. La fosforilación se efectuó tal como se describió en materiales y métodos. En la tabla se presentan las incorporaciones de precursor radiactivo medidas en los extractos celulares obtenidos en dos experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado.

siero. Dicha diferencia aumentó a casi 7 veces cuando los cultivos se efectuaron en ausencia de suero.

El orden decreciente de incorporación de ( $^{32}\text{P}$ )-ortofosfato se mantuvo en presencia o ausencia de suero y fue  $\text{E} > \text{A} > \text{B} > \text{C} > \text{D} > \text{F}$ .

Numerosos inconvenientes surgidos luego de correr los extractos celulares en geles de poliacrilamida impidieron efectuar un análisis de las proteínas específicamente fosforiladas en cada una de las subpoblaciones.

### A.3. Análisis citogenético de la subpoblación E y de la línea parental

Para demostrar que la subpoblación E difería del resto de las subpoblaciones en su estadio de diferenciación pero no en su origen clonal, se decidió efectuar un análisis citogenético de la subpoblación E y de la línea celular MCF-7 completa. Dicho estudio fue realizado por las Dras. Irma Slavutsky e Irene Larripa, pertenecientes a la Academia Nacional de Medicina, y arrojó los siguientes resultados:

- en ambas poblaciones celulares se obtuvo el mismo número de cromosomas con un rango de 79 a 81;
- en ambas muestras se observaron los mismos marcadores:  $5\text{p}^+$ ,  $7\text{p}^+$ ,  $10\text{p}^+$ ,  $14\text{q}^+$ ,  $15\text{p}^+$ ,  $16\text{q}^+$ ,  $17\text{q}^+$ ,  $18\text{q}^+$ ,  $20\text{p}^+$ ,  $22\text{p}^+$ ,  $\text{Xq}^+$ , M1 y M2, la mayoría de los cuales ya habían sido descriptos en estas células por Whang-Peng y col. en 1983;
- en ambas muestras se observó la translocación 14; 20;
- en ambas poblaciones se observaron monosomías de los cromosomas 19 y 20.

Estos resultados demuestran que la subpoblación E tiene la misma composición genética que la línea celular parental, descartándose así la posibilidad de que dicha subpoblación correspondiera a un clon de mayor capacidad proliferativa obtenido en forma aislada.

#### A.4. Interacciones entre las subpoblaciones

##### A.4.1. Contribución de la subpoblación E al crecimiento de la línea celular MCF-7

A partir de las subpoblaciones aisladas y considerando la contribución de cada una de ellas a la línea parental, se reconstituyó la población total de células MCF-7, a las cuales se denominó MCF-7 "reconstituidas". Por otro lado, se reconstituyó la población de células MCF-7 omitiendo el aporte de la subpoblación E. Esta población celular se denominó "MCF-7(-E)". Se plaquearon  $8.10^4$  células MCF-7 parentales, "MCF-7 reconstituidas" y "MCF-7(-E)" en placas de plástico de cultivo de 35 mm y se comparó su crecimiento durante 6 días en presencia de suero.

Las curvas de crecimiento celular obtenidas para cada una de las poblaciones se presentan en la Fig. 10.

Tal como se esperaba, el crecimiento fue igual para la población parental y para las células "MCF-7 reconstituidas".

A las 48 horas, el crecimiento de las células "MCF-7(-E)" correspondió al 60% del control y al cabo de 6 días de cultivo fue de apenas el 20%. El crecimiento de estas células se recuperó al agregar al tercer día de cultivo medio condicionado de la subpoblación E con medio fresco (1:1).



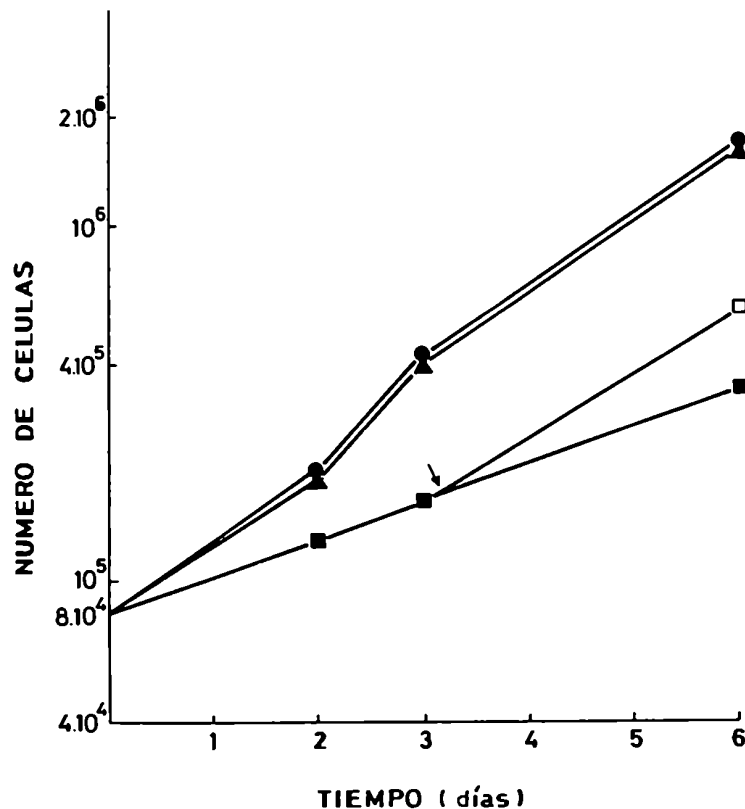
Fig. 10: Curvas de crecimiento de las células MCF-7 parentales, "MCF-7 reconstituidas" y "MCF-7 (-E)".

Las células "MCF-7 reconstituidas" se obtuvieron por recomposición de la población celular total a partir de las subpoblaciones aisladas. La contribución de cada subpoblación fue la misma que la correspondiente a la población parental.

Las células "MCF-7 (-E)" se obtuvieron al reconstituir la población total a partir de las subpoblaciones aisladas pero omitiendo el aporte de la subpoblación E.

Se sembraron  $8 \cdot 10^4$  células MCF-7 parentales, "MCF-7 reconstituidas" y "MCF-7 (-E)" y se cultivaron durante 6 días en presencia de suero. A los tiempos indicados, se efectuó el recuento celular por triplicado. La flecha indica el momento a partir del cual se agregó el medio condicionado por la subpoblación E.

●: MCF-7 parentales; ▲: "MCF-7 reconstituidas"; ■: "MCF-7 (-E)"; □: "MCF-7 (-E)" + medio condicionado de (E).



Al día 16 de cultivo, las células "MCF-7(-E)" se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll y pudo comprobarse que más del 85% de las células correspondía a las subpoblaciones D y F.

El cultivo de la población "MCF-7(-E)" mantuvo su viabilidad durante 28 días.

#### A.4.2. Efecto de los medios condicionados

##### A.4.2.1. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación celular

###### A.4.2.1.1. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación de la subpoblación E

Se colectaron los medios condicionados por las distintas subpoblaciones cultivadas en presencia de suero y se ensayó su efecto sobre el crecimiento de la subpoblación E.

La subpoblación E se plaqueó a baja densidad celular en presencia de suero. Se ensayaron los distintos medios condicionados diluidos al 50% con medio de cultivo fresco. Las curvas de crecimiento obtenidas en cada caso se presentan en la Fig. 11.

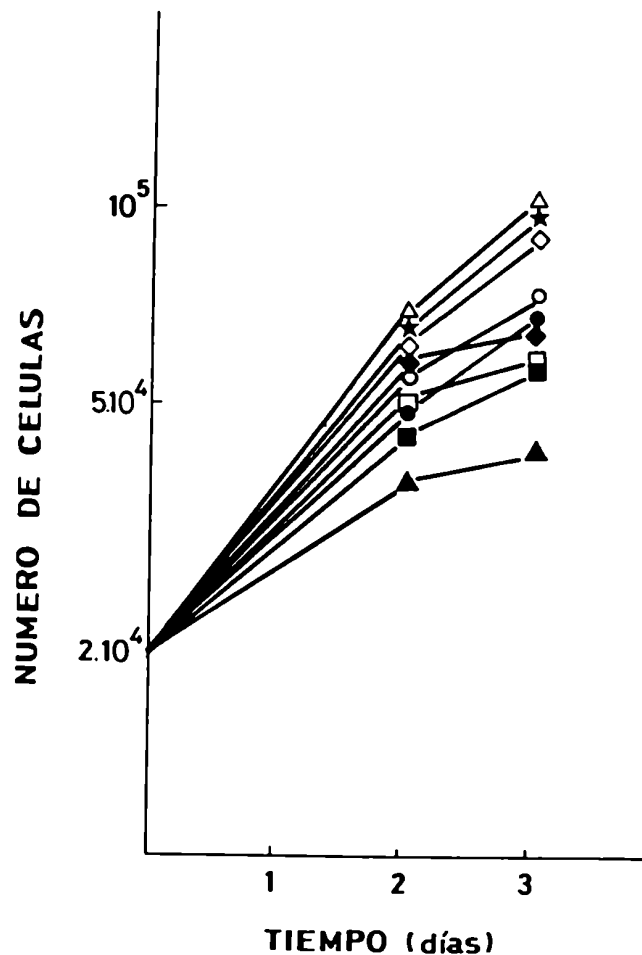
El crecimiento de la subpoblación E resultó inhibido en presencia de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones, siendo el medio condicionado por la subpoblación F el de mayor efecto inhibitorio.

Cuando se agregó el medio condicionado por la población "MCF-7(-E)", el número de células al cabo de 3 días de cultivo correspondió al 65% del control. El medio condicionado por la población total de células MCF-7 no modificó el crecimiento de la

Fig. 11: Efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones sobre el crecimiento de la subpoblación E.

La subpoblación E se sembró a razón de  $2 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Los medios condicionados por las subpoblaciones aisladas se ensayaron a una concentración del 50%, dado que se diluyeron 1:1 con medio de cultivo fresco. Los resultados obtenidos corresponden a 2 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado.

○: (E) + medio condicionado de (A); ●: (E) + MC (B); □: (E) + MC (C); ■: (E) + MC (D); △: (E) + MC (E); ▲: (E) + MC (F); ★: (E) + D/F12/FBS; ◆: (E) + MC (MCF-7 totales); ◆: (E) + MC (MCF-7 (-E)).



subpoblación E.

#### A.4.2.1.2. Efecto de los medios condicionados sobre la proliferación de la subpoblación F

Se ensayó el efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones cultivadas en presencia de suero sobre el crecimiento de la subpoblación F. Se procedió tal como se describió anteriormente para la subpoblación E. Las correspondientes curvas de crecimiento se presentan en la Fig. 12.

El medio condicionado por la subpoblación A incrementó en un 26% el crecimiento de la subpoblación F. El efecto estimulador fue mayor (más del 60% a las 48 horas) en presencia del medio condicionado por la población total. Cuando se agregó el medio condicionado por la subpoblación E, las células de la subpoblación F casi triplicaron su crecimiento.

Los medios condicionados por las subpoblaciones B, C y D no modificaron significativamente el crecimiento de la subpoblación F.

#### A.4.2.2. Efecto de los medios condicionados sobre el crecimiento independiente del anclaje

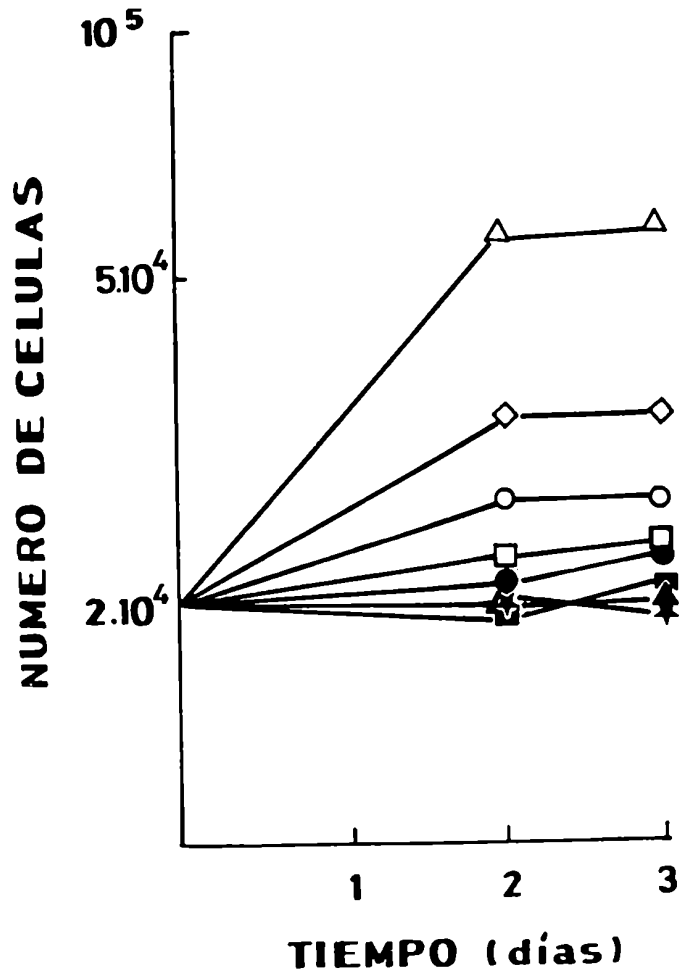
##### A.4.2.2.1. Efecto del medio condicionado por la subpoblación F sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación E

La subpoblación E se cultivó en un medio semisólido (agar blando) en presencia o ausencia del medio condicionado por la subpoblación F, cuya concentración final fue del 25%. Al cabo

Fig. 12: Efecto de los medios condicionados por las distintas subpoblaciones aisladas sobre el crecimiento de la subpoblación F.

La subpoblación F se sembró a razón de  $2 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Los medios condicionados se ensayaron diluidos al 50% con medio de cultivo fresco. A los tiempos indicados, se procedió a efectuar el recuento celular. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de 2 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado.

○: (F) + medio condicionado de (A); ●: (F) + MC (B); □: (F) + MC (C); ■: (F) + MC (D); △: (F) + MC (E); ▲: (F) + MC (F); ◇: (F) + MC (MCF-7 totales); ★: (F) + D/F-12/FBS.



de 10 días de cultivo se efectuó el recuento del número y tamaño de las colonias. La eficiencia clonogénica de la subpoblación E fue de aproximadamente el 7% aún en presencia del medio condicionado por la subpoblación F. No se modificó el tamaño de las colonias, con más de 3.000 células/colonia. Las colonias presentaron la misma morfología en presencia o ausencia de dicho medio condicionado (foto que acompaña a la Tabla I).

A.4.2.2.2. Efecto del medio condicionado por la subpoblación E sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación F

Se procedió tal como se describió anteriormente para la subpoblación E; estos ensayos se efectuaron por triplicado.

El medio condicionado por la subpoblación E, en una concentración final del 25%, logró que las células de la subpoblación F generaran colonias en agar blando con una eficiencia clonogénica del 1% determinada al cabo de 14 días de cultivo. El tamaño promedio fue de 800 células/colonia, tal como se aprecia en la Fig. 13 II.

No obstante, el crecimiento de las colonias fue limitado ya que se detuvo al día 19.

Las células de la subpoblación F cultivadas en presencia de suero pero sin el aporte del medio condicionado por la subpoblación E crecieron hasta formar muy escasas colonias de 8-10 células que perdieron rápidamente su viabilidad (Fig. 13 I).

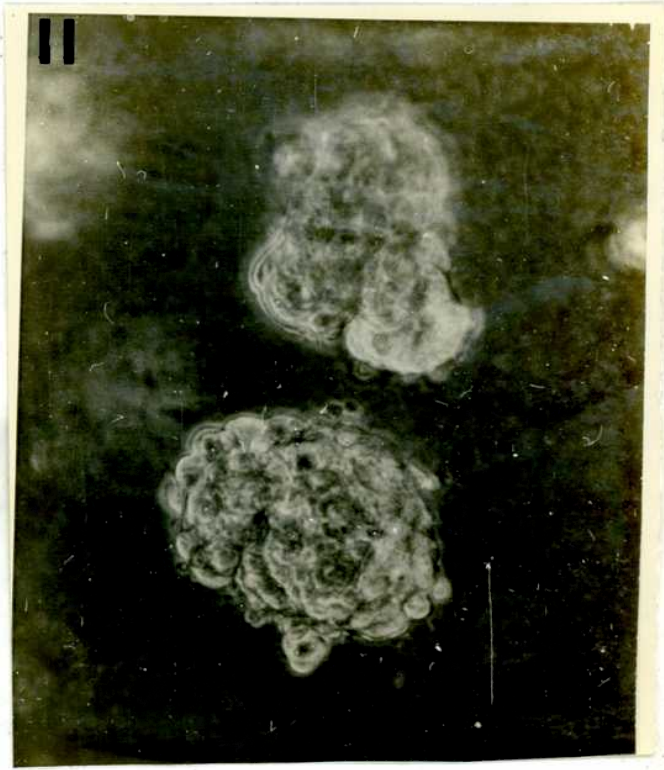
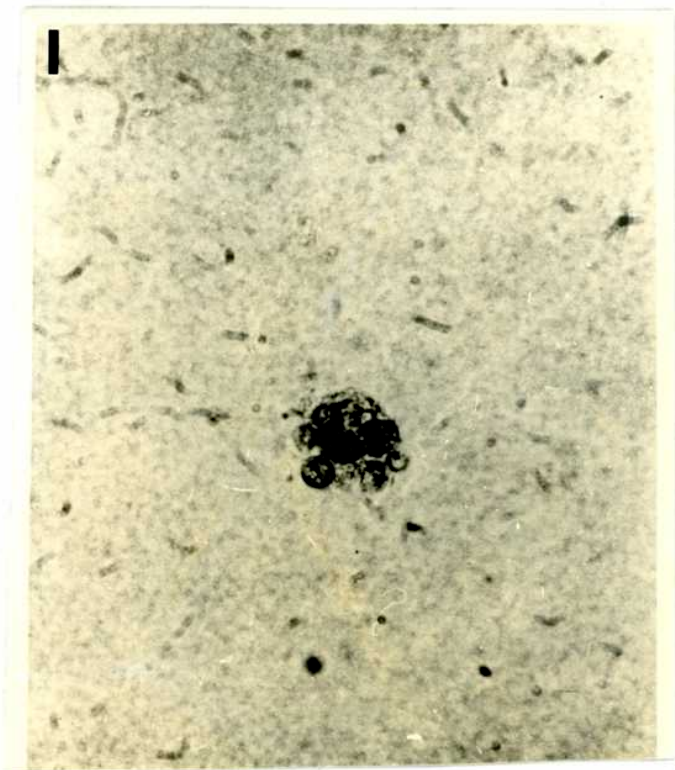
Dado que el agregado de EGF también logró estimular el crecimiento en agar blando de la subpoblación F (estos datos no se

Fig. 13: Efecto del medio condicionado por la subpoblación E sobre el crecimiento independiente del anclaje de la subpoblación F.

La subpoblación F se sembró a razón de  $10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm en medio de cultivo conteniendo 0,4% de agar, tal como se describe en la sección materiales y métodos. Los ensayos se efectuaron por triplicado.

(I): Subpoblación F (control).

(II): Subpoblación F en presencia del medio condicionado por la subpoblación E (concentración final: 25%).



muestran), podría considerarse la posibilidad de que el factor responsable de la estimulación del crecimiento presente en el medio condicionado por la subpoblación E fuera el TGF- $\alpha$ .



## B. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS MCF-7 EN EL MEDIO LIBRE DE SUERO

### B.1. Requerimiento de factores de crecimiento

Las células de mama humana y de ratón requieren EGF e insulina para su óptimo crecimiento, tal como fue descrito por Osborne y col. en 1981, Imagawa y col. en 1982 e Imai y col. en 1982. Sin embargo, cuando se ensayó el efecto de diversos factores de crecimiento sobre las células MCF-7 cultivadas en un medio libre de suero, se observó que el requerimiento de dichos factores dependía de la densidad celular.

#### B.1.1. Requerimiento de factores de crecimiento manifestado al plaquear las células a baja densidad

Se ensayó el efecto de diversos factores de crecimiento (insulina, EGF, trombina y transferrina) sobre las células MCF-7 plaqueadas a baja densidad celular ( $6 \cdot 10^4$  células por placa de cultivo de 35 mm).

Las células se plaquearon durante 4 horas en presencia de suero, se lavaron 2 veces con PBS y se cultivaron durante 3 días en el medio químicamente definido (con el aporte de insulina como único factor regulatorio y necesario para la supervivencia de las células, como se verá más adelante) antes del agregado de los factores de crecimiento.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla V.

Puede observarse que el crecimiento de las células durante los primeros 3 días fue mayor en el medio químicamente definido que en presencia de suero. Dicha estimulación desapareció al quinto día de cultivo.

Tabla V. Requerimiento de factores de crecimiento de las células MCF-7 cuando se plaquean a baja densidad celular

Factores de crecimiento agregados al medio químicamente definido (MQD)	Tiempo transcurrido luego del agregado de los factores de crecimiento			
	3 días		5 días	
	N° de células x10 <sup>5</sup>	%	N° de célulasx10 <sup>5</sup>	%
MQD (Dulbecco/F-12 (1:1) + 1 mg/ml BSA + 10 ug/ml insulina)	1,35±0,18	100,0	4,46±0,12	100,0
MQD + trombina (2 U/ml)	2,38±0,27	176,3	4,45±0,11	99,7
MQD + EGF (100 ngr/ml)	1,99±0,13	147,4	4,46±0,35	100,0
MQD + EGF+ trom bina (100 ugr/ml + 2 U/ml)	2,65±0,22	196,3	4,70±0,17	105,4
MQD + transfe- rrina (5 ugr/ml)	1,20±0,15	88,8	4,50±0,11	100,1
Dulbecco/F-12 (1:1) + 10% FBS + 10 ug/ml insu lina	0,98±0,11	72,6	4,39±0,11	98,4

Las células MCF-7 se plaquearon a razón de  $6 \times 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Los resultados corresponden a 3 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado. Resultados similares se obtuvieron en otros experimentos, en los cuales las células se plaquearon a razón de  $2-2,5 \times 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm.

Por otro lado, el agregado de trombina logró estimular el crecimiento de las células cultivadas en el medio químicamente definido pero dicho efecto desapareció al quinto día de cultivo, al alcanzar las células una alta densidad.

El agregado de EGF estimuló en un 50% el crecimiento celular y su efecto se potenció con el agregado de trombina.

Las células no manifestaron el requerimiento de transferrina ni aún a baja densidad celular; probablemente se deba a que las células produzcan y secreten al medio algún factor con actividad de sideroforo que pueda reemplazar a la transferrina.

#### B.1.2. Requerimiento de factores de crecimiento manifestado al plaquear las células a alta densidad celular

En la Fig. 14 se presentan los resultados obtenidos al ensayar el efecto de diversos factores de crecimiento (insulina, EGF y trombina) sobre las células MCF-7 plaqueadas a alta densidad celular ( $10^5$  células/placa de cultivo de 35 mm).

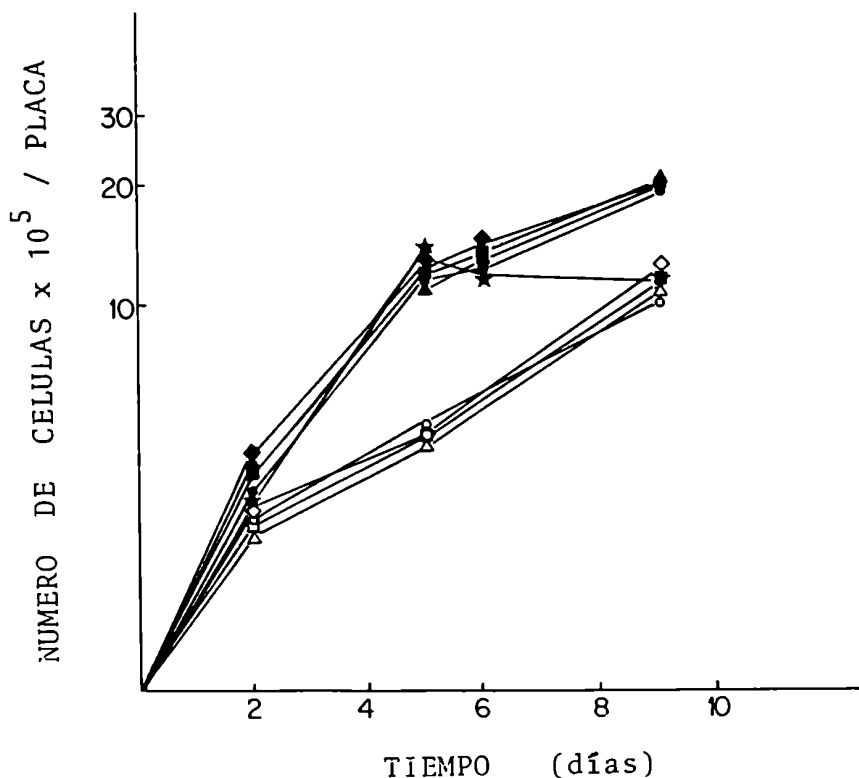
Los símbolos cerrados corresponden a las células que se plaquearon durante 4 horas en presencia de suero para permitir la adherencia al sustrato de las placas de cultivo; se lavaron 2 veces con PBS y se agregó el medio de cultivo libre de suero suplementado con los distintos factores de crecimiento. En este caso, las células crecieron rápidamente en presencia de insulina como único factor de crecimiento regulatorio; no se manifestó el requerimiento de EGF o trombina.

Por otro lado se repitió el experimento plaqueando las células directamente sobre las placas de cultivo previamente recu-

Fig. 14: Curvas de crecimiento de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido.

Símbolos cerrados: Las células se sembraron a razón de  $10^5$  células/placa de cultivo de 35 mm en presencia de 10% de suero fetal bovino y 10 ug/ml de insulina. Al cabo de 4 horas, las células se lavaron 3 veces con PBS  $-Ca^{2+}/Mg^{2+}$  y se agregaron distintos factores de crecimiento para suplementar el medio Dulbecco/F-12 (1:1): ★: 10% FBS + 10 ug/ml insulina; ●: 10 ug/ml insulina; ▲: 10 ug/ml insulina + 50 ngr/ml EGF; ■: 10 ug/ml insulina + 2 U/ml trombina; ◆: 10 ug/ml insulina + 50 ngr/ml EGF + 2 U/ml trombina.

Símbolos abiertos: Luego de despegar las células del plástico de la botella de cultivo, la acción de la tripsina se detuvo con inhibidor de tripsina de soja. Las células se lavaron cuidadosamente con PBS, se resuspendieron en los distintos medios de cultivo suplementados con los factores de crecimiento y se sembraron a razón de  $10^5$  células/placa de cultivo de 35 mm, previamente recubierta con colágeno. Los símbolos corresponden a las mismas condiciones de cultivo explicitadas en el párrafo anterior. Los recuentos celulares corresponden a 3 experimentos distintos, efectuados cada uno de ellos por triplicado. El medio de cultivo se renovó cada 3 días.



biertas con colágeno. En este caso, las células no estuvieron en contacto con el suero dado que el efecto de la tripsina se detuvo con inhibidor de tripsina de soja. En estas condiciones, las células crecieron más lentamente pero mantuvieron el requerimiento de insulina sin ser estimuladas por el agregado de EGF o trombina, tal como puede apreciarse en la Fig. 14 (símbolos abiertos).

Shibata y Taylor-Papadimitriou describieron en 1981 que las células cultivadas en presencia de suero se adhieren con menor cohesión a las placas de cultivo. En nuestro caso, cuando las células MCF-7 alcanzaron una alta densidad celular en presencia de suero comenzaron a despegarse de la placa de cultivo a partir del quinto día, tal como se observa en la Fig. 14. Es por esta razón que las células cultivadas en presencia de suero deben tripsinizarse y replaquearse frecuentemente.

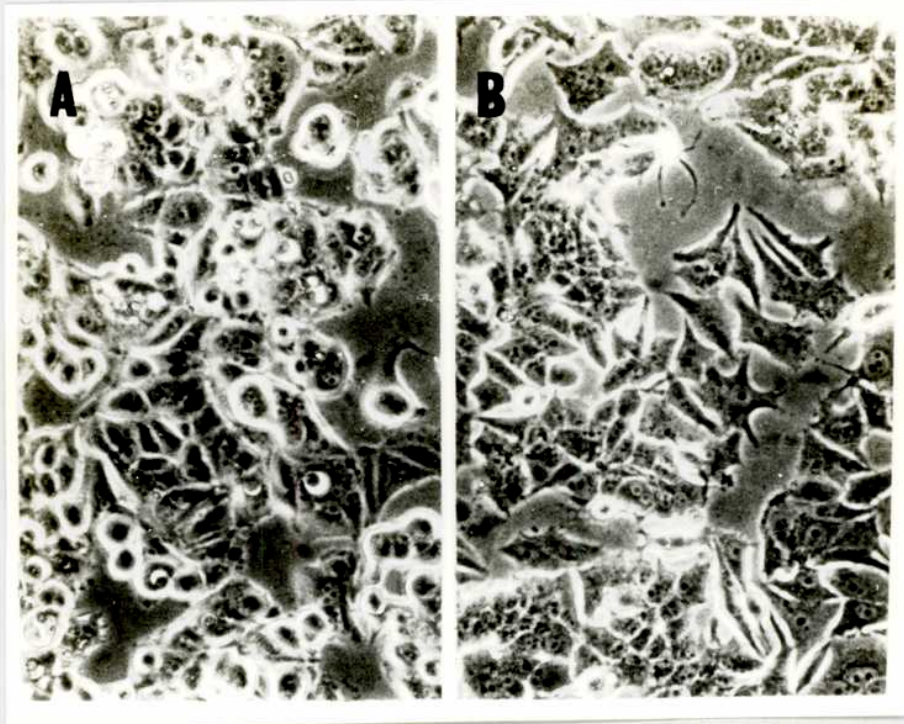
Las células cultivadas en el medio químicamente definido siguieron creciendo aún a alta densidad. Su adhesión a las placas de cultivo fue mucho más firme y en el caso de las células plaqueadas en presencia de colágeno se requirió una mezcla de tripsina y colagenasa (1:1) para poder despegarlas.

#### B.2. Ultraestructura de las células MCF-7 cultivadas en el medio químicamente definido

Al cabo de 16-20 horas de cultivo en el medio químicamente definido, las células cambiaron su morfología epitelióide adquiriendo un aspecto "ahusado" de célula menos diferenciada, tal como puede apreciarse en la Fig. 15b. Este cambio morfológico se revirtió rápidamente en presencia de suero (Fig. 15a).

Fig. 15: Morfología de las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero.

A: en presencia de 10% de suero fetal bovino; B: en el medio químicamente definido, con el aporte de insulina como único factor de crecimiento regulatorio.



Se analizó el origen epitelial de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero y en el medio químicamente definido.

#### B.2.1. Microscopía electrónica de las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero

Este análisis fue efectuado gracias a la valiosa colaboración de Silvana Ragone y de la Dra. Beatriz Molinari pertenecientes a la Comisión Nacional de Energía Atómica.

El análisis de la ultraestructura de las células cultivadas en presencia o ausencia de suero reveló la existencia de uniones estrechas, desmosomas y tonofilamentos. Sin embargo, las células cultivadas en el medio químicamente definido se caracterizaron por la existencia de un complejo de Golgi muy desarrollado con la presencia de sáculos distendidos distribuidos en los polos y alrededor del núcleo celular (Fig. 16A). Por el contrario, las células cultivadas en presencia de suero no presentaron complejo de Golgi desarrollado; se detectaron escasos tonofilamentos y numerosas microvellosidades (Fig. 16B).

En ciertas regiones de las células cultivadas en el medio químicamente definido se detectaron "coated pits" y "vesículas recubiertas", indicando un probable rol en la función secretoria de estas células (Fig. 16C).

#### B.2.2. Determinación de queratinas

En base a los cambios morfológicos experimentados por las células en el medio químicamente definido, se decidió analizar la expresión de citoqueratinas.

Luego de separar las proteínas celulares en un gel al 12,5%

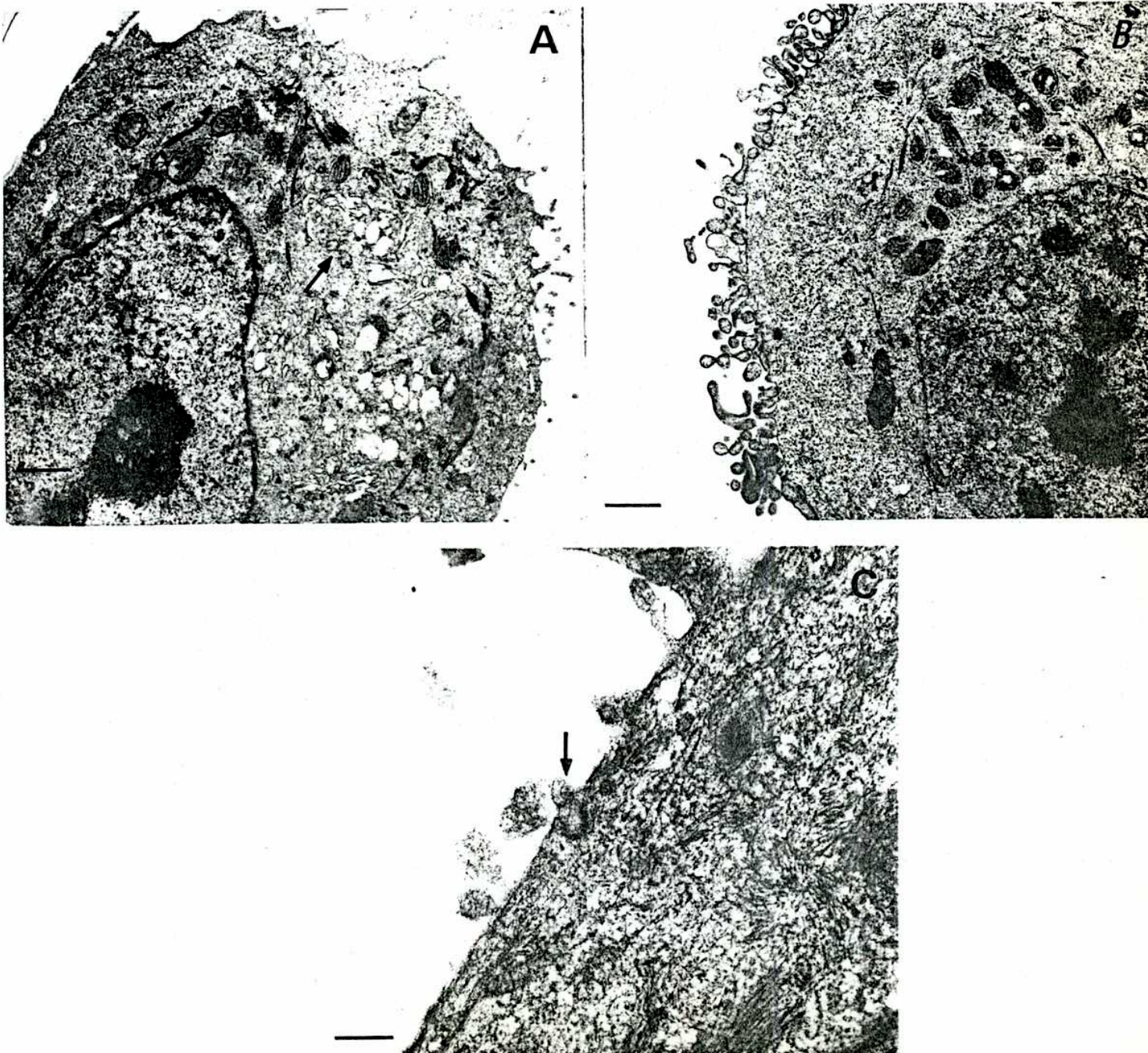


Fig. 16: Microscopía electrónica de las células MCF-7.

(A) Células cultivadas en el medio químicamente definido. Estas células están caracterizadas por la presencia de un complejo de Golgi altamente desarrollado que ocupa una zona polar (el complejo de Golgi se indica con una flecha). Es notable la presencia de dictiosomas distendidos y vesículas que conforman la región del Golgi.

(B) Células cultivadas en presencia de suero. En esta condición de cultivo es evidente la ausencia de complejo de Golgi, escasos tonofilamentos y abundantes microvellosidades. Barra: 1 u.

(C) Células cultivadas en el medio químicamente definido. La membrana plasmática presenta microfilamentos y "coated pits", indicados con la flecha. Barra: 0,25 u.





de acrilamida en presencia de SDS, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Las queratinas se identificaron por la técnica de la inmunoperoxidasa, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo antiqueratinas humanas. El revelado del Western blot no permitió detectar diferencias en las queratinas de las células cultivadas en presencia o ausencia de suero (Fig. 17.I).

Cuando la técnica inmunocitoquímica se empleó sobre las células fijadas, si bien se obtuvo una reacción intensa tanto para las células cultivadas en presencia de suero como en el medio químicamente definido, la distribución topológica de las citoqueratinas fue distinta. En la Fig. 17.II se puede apreciar que las células cultivadas en el medio químicamente definido presentaron un anillo perinuclear mientras que la distribución en las células cultivadas en presencia de suero asemeja a una red fibrillar.

### B.3. Análisis de las proteínas marcadas con (<sup>35</sup>S)-metionina

#### B.3.1. Análisis de las proteínas celulares

El análisis de las proteínas celulares marcadas con (<sup>35</sup>S)-metionina corridas en una electroforesis de geles bidimensionales permitió observar las siguientes diferencias: a) cuando se compararon las proteínas celulares de las células cultivadas en presencia o ausencia de suero, se detectaron cambios en las intensidades de las manchas inducidas en la placa fotográfica debidos a variaciones en la radioactividad incorporada a proteínas. Estas diferencias se indican en la Fig. 18A y B, con los símbolos abiertos; b) aparición de manchas que se manifestaron en una de

Fig. 17: Citoqueratinas reveladas por la técnica de la inmunoperoxidasa con anticuerpos de conejo dirigidos contra queratinas humanas.

Los detalles experimentales se describen en la sección materiales y métodos.

I. Revelado del Western blot.

II. Revelado de la técnica inmunocitoquímica.

(A) Células cultivadas en presencia de suero.

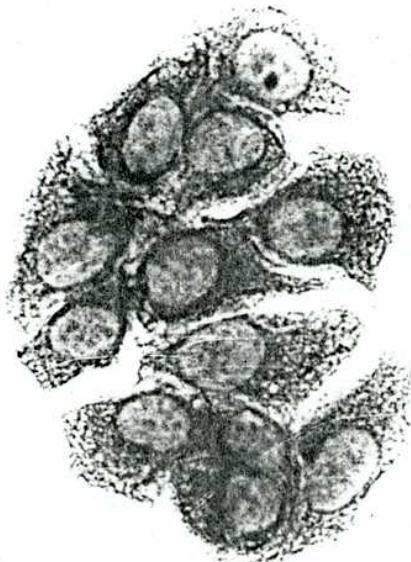
(B) Células cultivadas en el medio químicamente definido.

(I)



(II)

A



B

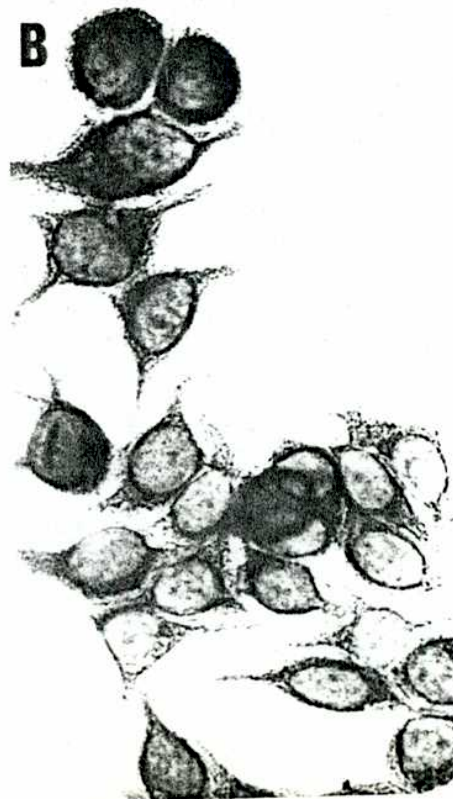
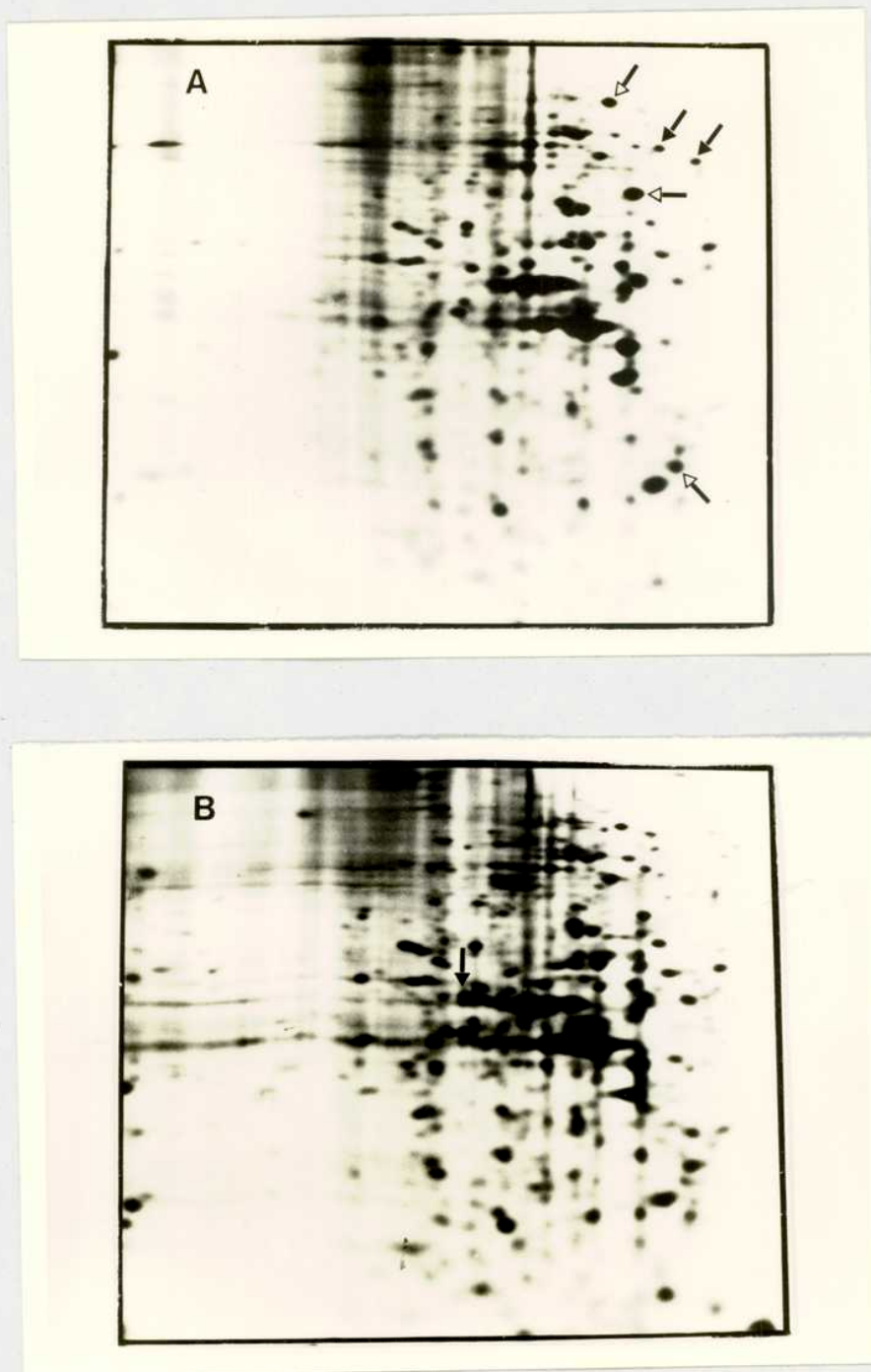


Fig. 18: Electroforesis en geles bidimensionales de proteínas celulares marcadas con ( $^{35}\text{S}$ )-metionina.

Los detalles experimentales se explicitan en la sección materiales y métodos.

- (A) Células cultivadas en presencia de suero.  
(B) Células cultivadas en el medio químicamente definido.



las dos condiciones de cultivo; se indican con símbolos cerrados en la Fig. 18A y B.

#### B.3.2. Análisis de las proteínas liberadas al medio de cultivo

Las células cultivadas durante 3 días en el medio químicamente definido incrementaron en un 50-60% la incorporación de (<sup>35</sup>S)-metionina a las proteínas liberadas al medio de cultivo, tal como se observa en la Tabla VI.

Las proteínas secretadas al medio de cultivo se corrieron en un gel de acrilamida al 10% en presencia de SDS. El análisis de la autoradiografía reveló la existencia de una proteína de 56.000 daltons presente sólo en el medio químicamente definido (Fig. 19).

#### B.4. Análisis de los medios condicionados obtenidos a partir de las células cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido

Se ensayó el efecto de dichos medios condicionados sobre la línea celular CHEF/18 de fibroblastos diploides de embrión de hamster que presentan la característica de poder ser diferenciados "in vitro" a preadipocitos, adipocitos, mioblastos y condrocitos, tal como fue descrito por Sager y Kovak en 1982. Las diferencias cuali y cuantitativas observadas en las proteínas liberadas al medio por las células cultivadas en presencia o ausencia de suero se reflejaron al agregar los medios condicionados a cultivos de células CHEF/18 en crecimiento exponencial.

El medio condicionado de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero estimuló el crecimiento de las células CHEF/18

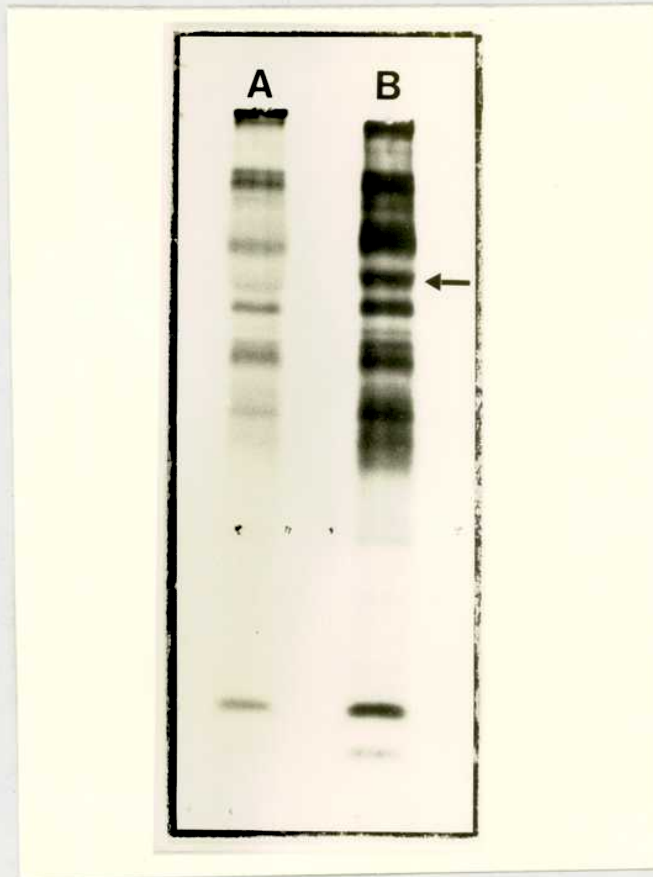
Tabla VI. Síntesis de proteínas en las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido durante 3 días

Condiciones de cultivo	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-metionina a proteínas intracelulares (A)	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-metionina a las proteínas liberadas al medio de cultivo (B)	
	cpm x 10 <sup>-3</sup> / 10 <sup>5</sup> células	cpm x 10 <sup>-3</sup> / 10 <sup>5</sup> células	%B/A
En presencia de suero (Dulbecco/F-12/FBS)	1,86	1,74	0,94
Medio químicamente definido (Dulbecco/F-12/BSA)	1,68	2,29	1,36

Las células se marcaron con (<sup>35</sup>S)-metionina (100 uCi/ml) durante 3 horas. La incorporación de material radiactivo medida se normalizó por el número de células presentes en cada placa de cultivo. Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado.

Fig. 19: Autorradiografía del gel monodimensional de proteínas secretadas al medio de cultivo marcadas con ( $^{35}$ S)-metionina.

Se sembró igual cantidad de proteínas radiactivas en las 2 condiciones analizadas. El gel se expuso durante 5 días. La flecha indica la posición de la proteína de 56.000 daltons, presente sólo cuando se cultivan las células en el medio químicamente definido.



durante las primeras 48 horas (Tabla VII) pero luego indujo la aparición de lípidos que se tiñeron con el colorante oil red O; el crecimiento se detuvo antes de que las células alcanzaran confluencia. Al cabo de 20 días de cultivo en presencia de dicho medio condicionado, las células se diferenciaron a adipocitos, tal como se observa en la Fig. 20B.

El medio condicionado de las células MCF-7 cultivadas en el medio químicamente definido inhibió, al cabo de 4 días de cultivo, un 50% el crecimiento de las células CHEF/18 (Tabla VII) pero no indujo la aparición de lípidos (Fig. 20C). Esta observación coincide con la descrita por Sager y Kovak quienes demostraron en 1982 que el agregado de insulina como único factor no es capaz de inducir la diferenciación terminal de las células CHEF/18.

#### B.5. Crecimiento independiente del anclaje

Las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido se sometieron a un ensayo clonogénico en agar blando.

En la Tabla VIII se presentan los resultados obtenidos.

Las células cultivadas durante 20 días en el medio químicamente definido presentaron una eficiencia clonogénica del 16 al 20%. Estas células originaron colonias conteniendo aproximadamente 8.000 células al cabo de 10 días de cultivo (Fig. 21A y B).

Las células cultivadas en presencia de suero detuvieron su crecimiento luego de 2-3 divisiones y dieron colonias de menos de 10 células que al décimo día de cultivo perdieron su viabilidad (Fig. 21, inserto C). En cuanto a las células cultivadas durante

Tabla VII. Efecto de los medios condicionados de las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero sobre el crecimiento de la línea celular CHEF/18

Condiciones	Tiempo transcurrido luego del agregado de los medios condicionados (horas)	
	48	96
5% FBS	$(2,87 \pm 0,13) \times 10^4$	$(2,35 \pm 0,17) \times 10^5$
2,5% FBS	$(2,50 \pm 0,21) \times 10^4$	$(1,80 \pm 0,31) \times 10^5$
5% FBS + MQD (1:1)	$(2,67 \pm 0,14) \times 10^4$	$(2,29 \pm 0,07) \times 10^5$
5% FBS + MC (FBS)	$(3,70 \pm 0,32) \times 10^4$	$(7,87 \pm 0,35) \times 10^4$
5% FBS + MC (MQD)	$(2,34 \pm 0,26) \times 10^4$	$(1,22 \pm 0,09) \times 10^5$

Las células CHEF/18 se plaquearon a razón de  $10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. El medio condicionado se ensayó a una concentración del 50% (Dulbecco + 10% FBS + MC (1:1)). Los resultados presentados corresponden a dos experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado.



Fig. 20: Diferenciación de las células CHEF/18 mediada por el medio condicionado de las células MCF-7 cultivadas en presencia de suero.

(A) Células CHEF/18 con morfología de preadipocitos, luego de 3 días de cultivo en presencia del medio condicionado por las células MCF-7 en presencia de suero.

(B) Células CHEF/18 con morfología de adipocitos, luego de 20 días de cultivo en presencia del medio condicionado por las células MCF-7 en presencia de suero.

(C) Células CHEF/18 tratadas durante 15 días con el medio condicionado por las células MCF-7 en ausencia de suero. Las células presentan distinta morfología que las células no tratadas (controles, no presentados aquí) a pesar de que no se detectan características de diferenciación.

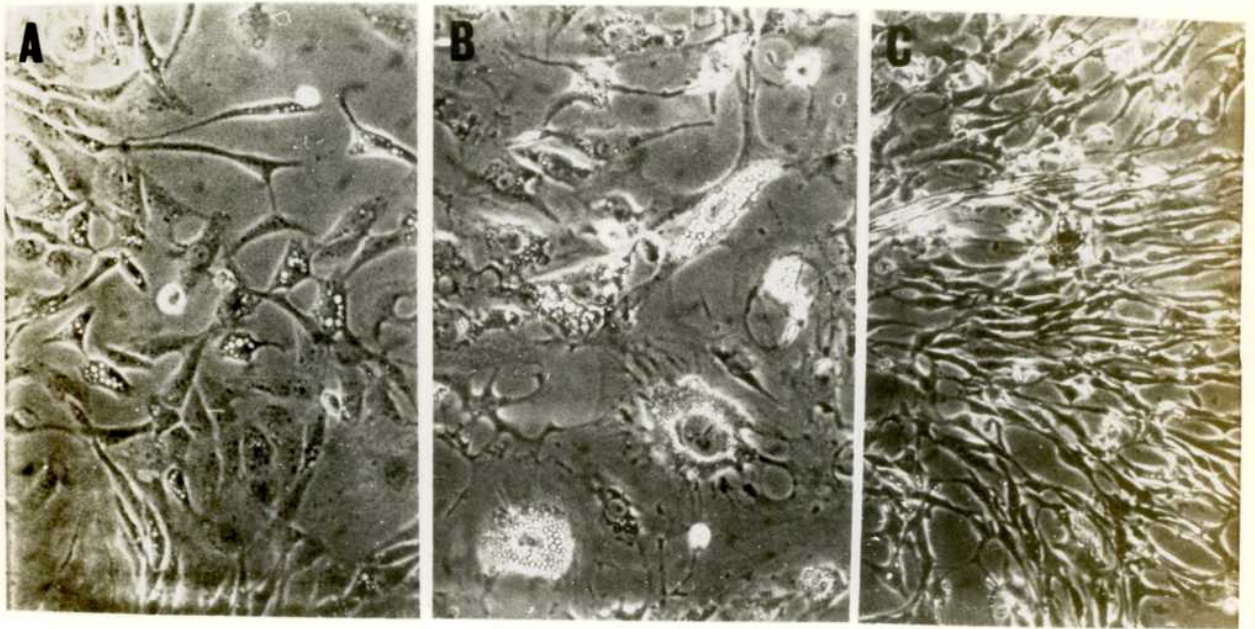


Tabla VIII. Crecimiento independiente del anclaje de las células MCF-7 cultivadas en el medio libre de suero

Condiciones de cultivo	Número de colonias/placa de cultivo de 35 mm		
	10 células	30 células	300 células
En presencia de suero	2	-	
MQD (10 días)	-	250	
MQD (>20 días)	-	825	786

Se sembraron  $10^4$  células en medio de cultivo conteniendo agar, a una concentración final de 0,4%. Las colonias se contaron al cabo de 10 días de cultivo, procediéndose tal como se describió en materiales y métodos. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado. En el caso del medio químicamente definido (MQD), 10 y >20 días corresponden a los días de cultivo de las células en el medio libre de suero antes de someterlas al ensayo clonogénico.

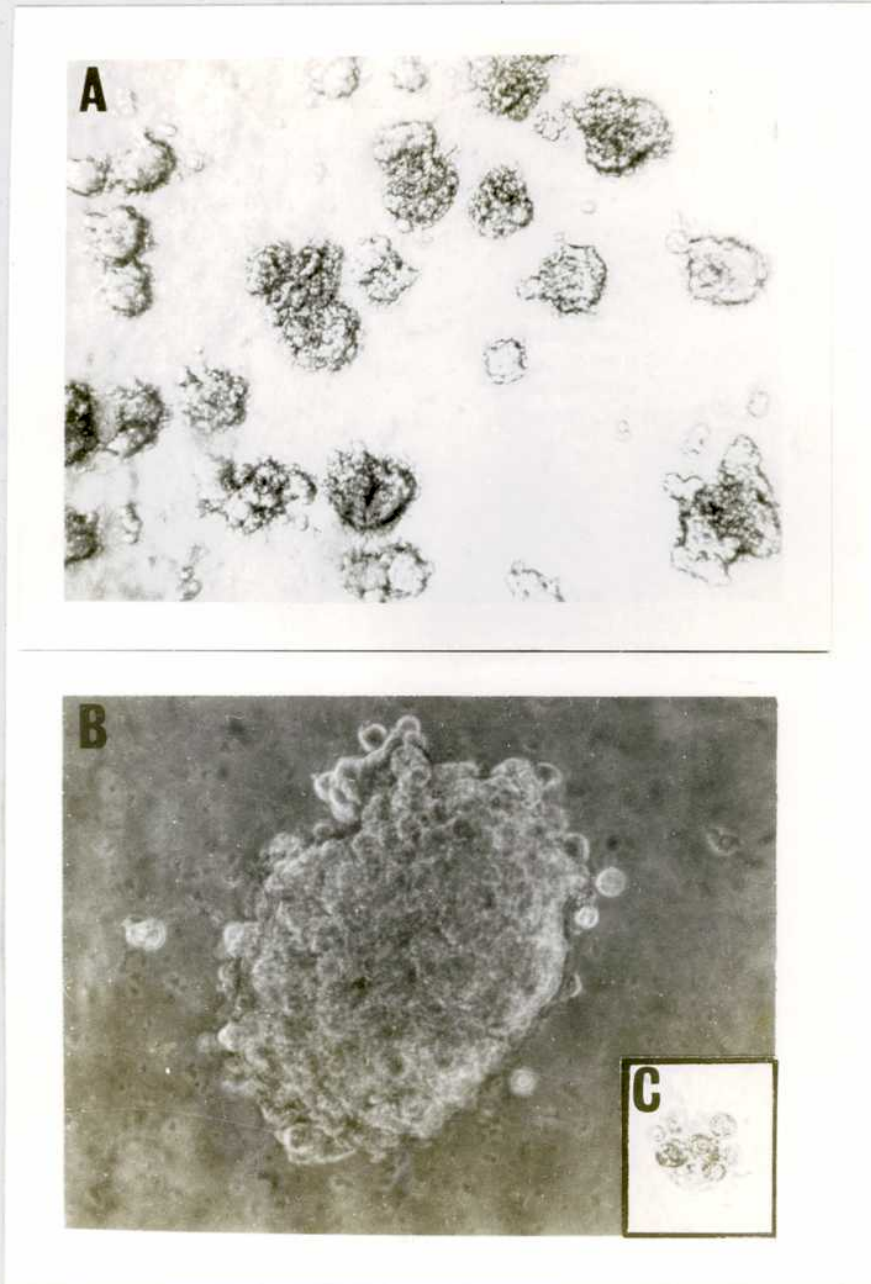
Fig. 21: Crecimiento independiente del anclaje de las células MCF-7.

Las células MCF-7 se cultivaron durante 20 días en el medio químicamente definido antes de someterlas al ensayo clonogénico en agar blando. Los detalles experimentales se explicitan en la sección materiales y métodos.

(A) Crecimiento en el medio químicamente definido (40 X).

(B) Tamaño comparativo de una colonia creciendo en el medio químicamente definido en relación al de una colonia creciendo en presencia de suero (inserto C).

(C) Tamaño de una colonia creciendo en presencia de suero (100 X).



10 días en el medio químicamente definido, su eficiencia clonogénica fue de  $(2,55 \pm 0,06)\%$ . Dado que a los 10 días de cultivo en ausencia de suero las células manifestaron su requerimiento hormonal (tal como se explica en la sección D.2.1.), se decidió efectuar el ensayo clonogénico en presencia de  $10^{-10}$  M estradiol. En estas condiciones se verificó un incremento del 80% en la capacidad de generar colonias en agar blando (eficiencia clonogénica =  $(4,63 \pm 0,11)\%$ ) pero no se modificó el tamaño de las colonias ( $\leq 30$  células/colonia).

#### B.6. Distribución de las células en gradientes de densidad de Percoll

Se sometieron las células cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. La distribución de las células en el gradiente se presenta en la Tabla IX.

En el medio químicamente definido se verificó un incremento en la contribución de las subpoblaciones A y B a expensas de una disminución en el aporte de las subpoblaciones D y F mientras que no se modificaron las subpoblaciones C y E. Los cambios descritos se acentuaron a medida que transcurrieron los días de cultivo en el medio químicamente definido.

#### B.7. Expresión de marcadores celulares

##### B.7.1. Expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA)

Se utilizó la técnica inmunocitoquímica para analizar la expresión y distribución del antígeno carcinoembrionario en las

Tabla IX. Distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad de Percoll

Condiciones de cultivo					
Subpoblaciones	En presencia de suero	En el medio químicamente definido (días)			
	%	3 (%)	7 (%)	10 (%)	19 (%)
A	17,0	19,3	20,8	20,0	24,6
B	21,7	24,5	25,2	26,8	28,8
C	30,0	29,0	29,2	33,0	30,3
D	4,5	4,2	3,9	3,3	3,4
E	5,8	5,7	5,3	5,5	5,4
F	21,0	17,3	15,6	11,4	7,5

Las células MCF-7 en crecimiento exponencial se sembraron en un gradiente de densidad de Percoll a razón de  $3 \times 10^6$  células/tubo, tal como se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de 2 experimentos.

células cultivadas en presencia o ausencia de suero.

Se ensayó sobre células en crecimiento exponencial y plaqueadas a la misma densidad dado que Kufe y col. demostraron en 1983 que la expresión del CEA en células MCF-7 depende del ciclo celular.

En la Fig. 22 puede apreciarse que la distribución del CEA fue difusa cuando las células se cultivaron en presencia de suero. En cambio, en las células cultivadas en el medio químicamente definido, el CEA se concentró en un "casquete" próximo al núcleo celular.

#### B.7.2. Expresión de la proteína p21 codificada por el oncogen ras

En la Fig. 23 (A y B) se presentan los resultados obtenidos luego de determinar la expresión de la proteína p21 por la técnica inmunocitoquímica.

Las células cultivadas en presencia de suero dieron una reacción intensa; las células cultivadas en el medio químicamente definido, por el contrario, presentaron un bajo grado de positividad, con una distribución difusa de la proteína p21.

#### B.7.3. Expresión de receptores estrogénicos (RE)

Los resultados correspondientes a la determinación del contenido de receptores estrogénicos por la técnica inmunocitoquímica se presentan en la Figura 23 (C y D). Se detectaron 2 niveles de positividad: intenso (s) y débil (w).

El contenido de RE se incrementó en las células cultivadas durante 10 días en ausencia de suero, principalmente a expensas de



Fig. 22: Expresión de antígeno carcinoembrionario, revelado por la técnica inmunocitoquímica.

Se procedió tal como se describe en la sección materiales y métodos.

- (A) Células cultivadas en presencia de suero.  
(B) Células cultivadas en el medio químicamente definido  
(X 560).

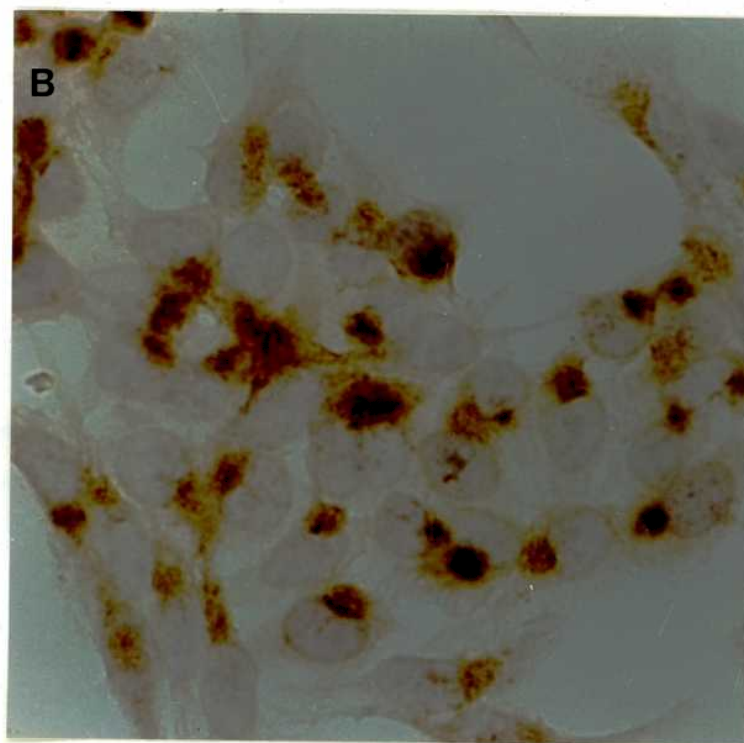
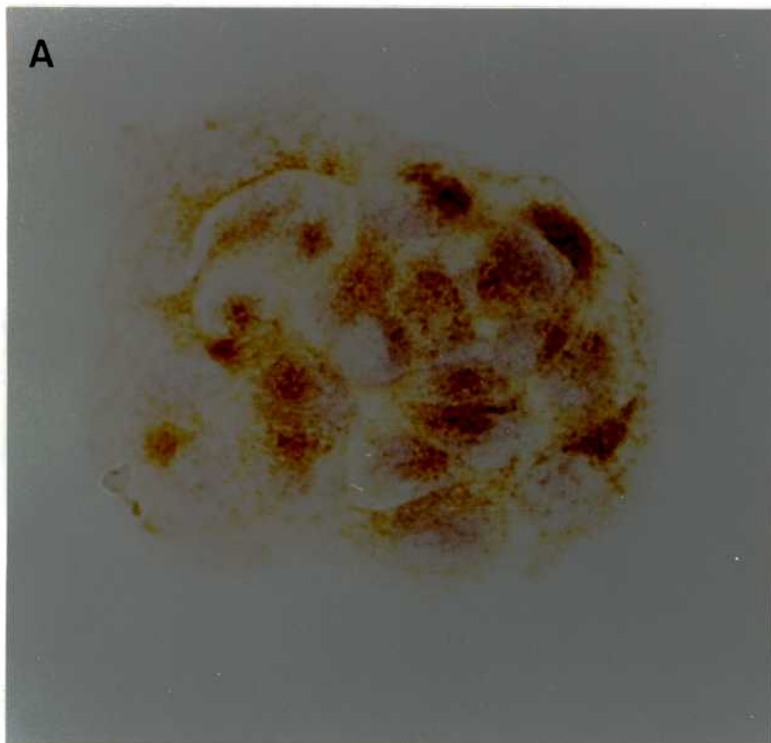
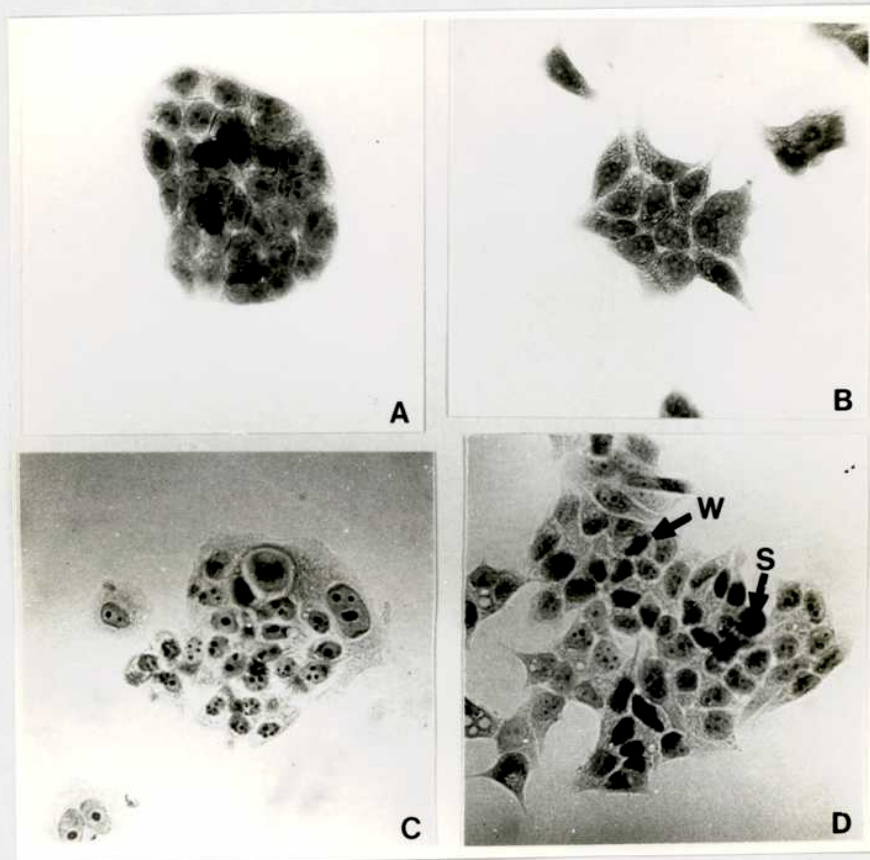


Fig. 23: Determinación de la proteína p21, codificada por el gen ras (A y B) y receptores estrogénicos (C y D) en células MCF-7.

A y C: células cultivadas en presencia de suero.  
B y D: células cultivadas en el medio químicamente definido durante 10 días.  
Las flechas indican células intensamente (S) y débilmente (W) teñidas (X 360).





las células que daban una tinción intensa (Tabla X). Dicho incremento fue transiente dado que desapareció al cultivar las células durante un tiempo mayor o menor a 10 días en el medio químicamente definido; en estos casos, el contenido de RE se mantuvo como en las células cultivadas en presencia de suero.

Tabla X. Expresión de receptores estrogénicos en células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero

% de células RE-positivas	en presencia de suero	en medio químicamente definido
débilmente teñidas (W)	27	56
intensamente teñidas (S)	5	22
W + S	32	78

Los valores obtenidos corresponden al promedio de 2 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado. Las células MCF-7 se cultivaron durante 10 días en el medio libre de suero antes de someterlas a este análisis.

### C. Efecto de moduladores de la diferenciación

Se ensayó el efecto de moduladores de la diferenciación (13-cis retinal, dimetilsulfóxido y butirato de sodio) sobre las células MCF-7 cultivadas en presencia o ausencia de suero.

#### C.1. 13-cis retinal

##### C.1.1. Efecto del 13-cis retinal sobre la proliferación celular

Se ensayó el efecto de este derivado de la vitamina A sobre la proliferación de células cultivadas en presencia de suero o en el medio químicamente definido. Las curvas de crecimiento celular en presencia de distintas dosis de 13-cis retinal se muestran en la Fig. 24 (A y B). Paralelamente, se hizo un control cultivando las células en presencia de dimetilsulfóxido para descartar que el efecto del retinal se debiera en parte al DMSO usado como diluyente. Los resultados obtenidos demostraron que 0,1% DMSO no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento celular. La mayor estimulación del crecimiento celular se verificó a concentraciones  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M de 13-cis retinal y se manifestó a partir de las 24 horas de cultivo. Cuando la concentración empleada fue del orden de  $10^{-6}$  M, hubo una inhibición del crecimiento celular que se manifestó hasta el tercer día de cultivo; a partir de entonces, y a pesar del agregado de  $10^{-6}$  M de 13-cis retinal en cada cambio de medio de cultivo (efectuado cada 3 días), las células se recuperaron y crecieron con la misma velocidad que los controles.

Concentraciones de 13-cis retinal mayores de  $10^{-6}$  M resultaron ser tóxicas en todas las experiencias efectuadas.

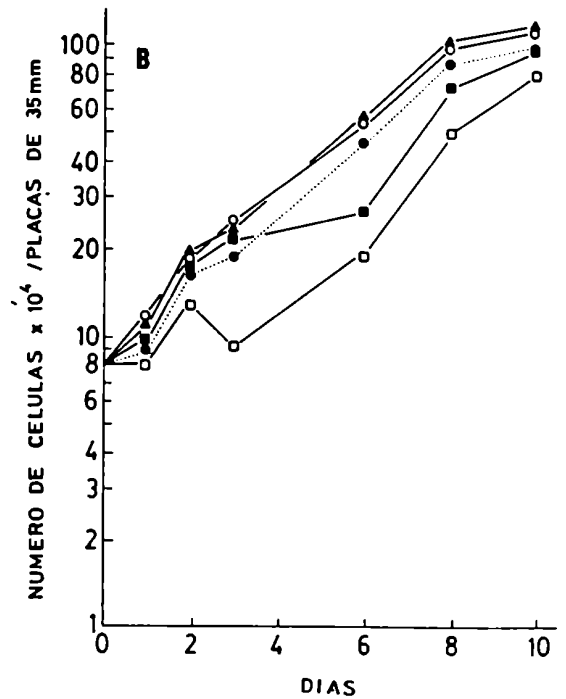
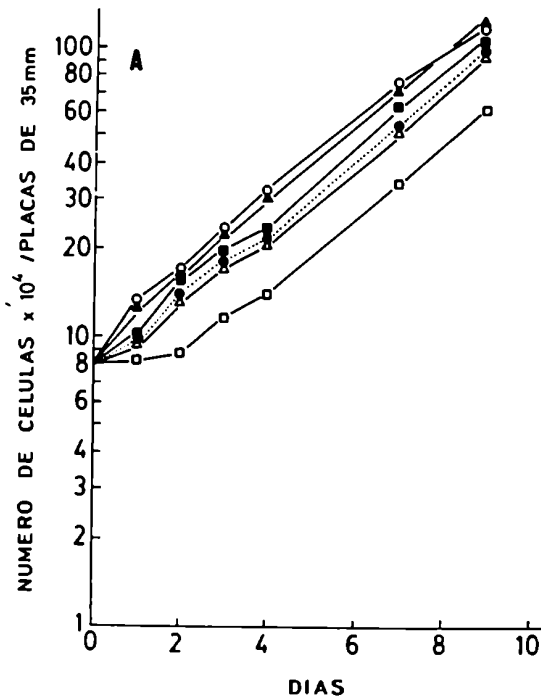
Cuando se utilizó el ácido retinoico en lugar del 13-cis

**Fig. 24: Efecto del 13-cis retinal sobre el crecimiento de las células MCF-7.**

Las células se sembraron a razón de  $8 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Se ensayaron distintas concentraciones de 13-cis retinal durante 10 días. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de 6 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado.

(A) Células cultivadas en presencia de 10% de suero fetal bovino.

(B) Células cultivadas en el medio químicamente definido.  
 ●: controles; △: 0,1% DMSO; □:  $10^{-6}$  M retinal; ■:  $5 \times 10^{-7}$  M retinal; ○:  $10^{-7}$  M retinal; ▲:  $10^{-8}$  M retinal.



retinal se obtuvieron los mismos resultados.

Se ensayó el efecto del 13-cis retinal en otras líneas celulares de tumor de mama humano, como T-47D clon 11 (de origen metastásico, obtenida por Keydar y col. en 1979 y también como MCF-7, sensible a estrógenos) y Hs-578 T, estrógeno-independiente (derivada de un carcinosarcoma mamario y obtenida por Hackett y col. en 1977), habiéndose obtenido similares resultados.

También se reprodujeron los resultados obtenidos cuando el 13-cis retinal se preparó diluido en etanol. Las células tratadas con 0,1% etanol no variaron su velocidad de crecimiento con respecto al control.

Debo agregar también que el reemplazo de suero fetal bovino por suero de caballo no modificó el efecto inducido por el 13-cis retinal en las líneas celulares estudiadas.

#### C.1.2. Efecto del 13-cis retinal sobre la síntesis de proteínas celulares y liberadas al medio de cultivo

En la Tabla XI se muestra el efecto del 13-cis retinal sobre la incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-Met a proteínas y sobre el contenido proteico de células cultivadas en presencia de 10% de suero fetal bovino.

El tratamiento de las células con  $10^{-8}$  M de 13-cis retinal durante 3 días produjo una leve inhibición de la incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina a las proteínas celulares y a las proteínas liberadas al medio de cultivo. Luego de 15 días de tratamiento se verificó un incremento del 50-60% tanto en la incorporación de precursor radioactivo como en el contenido de proteínas intracelu-

Tabla XI. Efecto del 13-cis retinal sobre la síntesis y acumulación de proteínas en células MCF-7

Días de tratamiento	Proteínas celulares totales			Proteínas citoplasmáticas			Proteínas nucleares			Proteínas liberadas al medio de cultivo				
	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-Met.		Cuantificación por la técnica de Lowry	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-Met.		Cuantificación por la técnica de Lowry	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-Met.		Cuantificación por la técnica de Lowry	Incorporación de ( <sup>35</sup> S)-Met.				
	cpm x 10 <sup>-5</sup> /10 <sup>5</sup> células	%		cpm x 10 <sup>-5</sup> /10 <sup>5</sup> células	%		cpm x 10 <sup>-5</sup> /10 <sup>5</sup> células	%		cpm x 10 <sup>-3</sup> /10 <sup>5</sup> células	%			
Controles	1,86	100 (18)	573	100 (7)	1,24	100 (18)	384	100 (7)	0,62	100	189	100 (7)	1,74	100
3 días	1,47	78 (4)	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	1,54	89 (4)
15 días	2,92	157 (8)	860	150 (2)	1,86	150 (8)	550	143 (2)	1,00	162 (8)	310	164 (2)	1,34	77 (8)
60 días	3,05	164 (3)	951	166 (2)	1,30	105 (3)	409	106,5 (2)	1,80	292 (3)	542	287 (2)	2,40	138 (3)
110-120 días	4,70	253 (3)	1.400	244 (2)	2,52	203 (3)	640	167 (2)	2,58	419 (3)	720	381 (2)	1,41	81 (3)

Las células se cultivaron en presencia de 13-cis retinal durante los tiempos que se indican. Los números entre paréntesis indican el número de experimentos distintos realizados, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado. Los detalles experimentales se especifican en materiales y métodos. N.D.: No determinado.

lares (de localización citoplasmática y nuclear). Las proteínas liberadas al medio de cultivo sufrieron una leve inhibición.

El tratamiento crónico de las células durante 60 días mostró una diferencia notable: el contenido proteico de la fracción soluble fue similar al del control pero fue en la fracción nuclear donde se produjeron los cambios más importantes, con un incremento de casi 3 veces en el contenido de proteínas y en la incorporación de precursor radioactivo. En cuanto a las proteínas liberadas al medio de cultivo, se produjo un incremento del 40%.

Estos efectos se modificaron más dramáticamente luego de 4 meses de tratamiento de las células; se duplicó la incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina a la fracción soluble y se cuadruplicó en la fracción nuclear; estos cambios se acompañaron de un incremento de la masa proteica (167% para la fracción soluble; 381% para la nuclear).

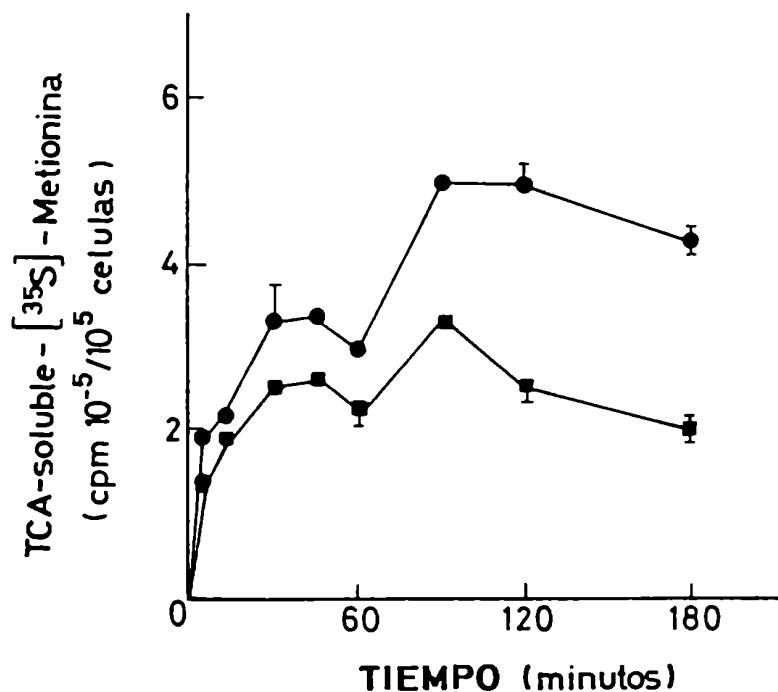
Para descartar que el efecto del 13-cis-retinal sobre la incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina a proteínas se debiera a una alteración en el transporte de precursor radioactivo, se efectuó una cinética para medir la incorporación de radiactividad al material soluble en presencia de TCA. Los resultados obtenidos se graficaron y se presentan en la Fig. 25. En esta figura se demuestra que el incremento en la incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina a fracciones insolubles en presencia de TCA observado en las células tratadas con 13-cis retinal, no se debió a un aumento del transporte del aminoácido marcado. Por el contrario, luego de una incubación de 60 minutos, fue mayor la radiactividad en la fracción soluble en presencia de TCA medida en los controles con

Fig. 25: Incorporación de ( $^{35}\text{S}$ )-metionina al material soluble en presencia de TCA en células MCF-7 controles y crónicamente tratadas con 13-cis retinal.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 35 mm, tal como se describió para la determinación de la síntesis de proteínas. La incorporación de precursor radioactivo al material soluble en presencia de TCA se efectuó tal como fue descrito en la sección materiales y métodos.

Los valores graficados corresponden a 6 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por triplicado.

●: controles; ■: células crónicamente tratadas con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M (durante 110-120 días).





respecto a las células crónicamente tratadas con 13-cis retinal.

El análisis de los geles no reveló cambios cualitativos en las células tratadas con 13-cis retinal. Sólo cuando se corrieron las proteínas nucleares de las células tratadas durante 15 días con retinal se observó la aparición de una proteína de 32.000 daltons de peso molecular que no se encontró en las células no tratadas. No se continuó con el análisis de esta proteína ya que no siempre los geles dieron resultados reproducibles respecto a su presencia.

#### C.1.3. Efecto del 13-cis retinal sobre el crecimiento independiente del anclaje

Cuando las células crónicamente tratadas con 13-cis retinal se cultivaron en un medio semisólido (agar blando) en presencia de suero fetal bovino, aproximadamente un 20-30% de las células fue capaz de dar macrocolonias de células, viables aún después de 14 días de cultivo en esas condiciones. Los controles de células no tratadas, por el contrario, fueron incapaces de dar colonias en ese medio, como ya se describió anteriormente.

En la Fig. 26 se muestra un ejemplo del tipo de colonias que indujo el 13-cis retinal en agar blando.

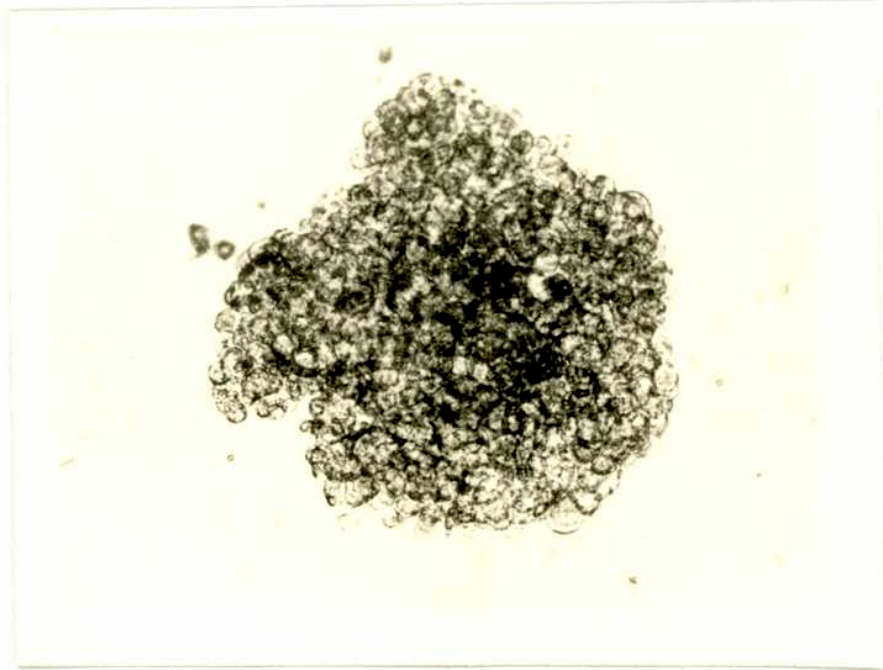
#### C.1.4. Efecto del 13-cis retinal sobre la distribución de las células en gradientes de densidad

El tratamiento de las células con  $10^{-8}$  M de 13-cis retinal en presencia de suero fetal bovino indujo modificaciones en la contribución de las distintas subpoblaciones, tal como se muestra

Fig. 26: Crecimiento independiente del anclaje de células MCF-7 crónicamente tratadas con 13-cis retinal.

Las células MCF-7 se trataron con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M durante 60 días antes de someterlas al ensayo clonogénico en agar blando, tal como se describe en la sección materiales y métodos.

La fotografía muestra una colonia de más de  $0,5 \text{ mm}^2$  (X 100).



en la Tabla XII.

Ya a los 4 días de cultivo, se observó una disminución en el porcentaje de las subpoblaciones C y F, a expensas de un incremento en las subpoblaciones con menor grado de diferenciación (A y B). Este efecto se acentuó a medida que transcurría el tratamiento con 13-cis retinal y fue máximo a los 120 días. En ese momento, se alcanzó la mayor contribución de las subpoblaciones A y B a expensas de la disminución de las subpoblaciones C, D y F. La contribución de la subpoblación de células "stem" (E) permaneció invariable.

#### C.1.5. Efecto del 13-cis retinal sobre las subpoblaciones aisladas

Para comprobar que el 13-cis retinal actuaba como modulador negativo de la diferenciación, se decidió probar su efecto sobre las subpoblaciones con menor grado de diferenciación (A,B,E).

En la Fig. 27 (a y b) se observan los perfiles de los gradientes obtenidos luego de 7 días de cultivo de la subpoblación A en ausencia o en presencia de  $10^{-8}$  M de 13-cis retinal.

Al cabo de 7 días, el 13-cis retinal detuvo la diferenciación de la subpoblación A; el 65% de las células quedó como A, el 28% como B y el porcentaje restante se distribuyó entre C, D y F. Para el control no tratado, sólo el 17% se conservó como A.

Cuando el tratamiento de las células se prolongó durante 47 días, aproximadamente el 70% de las células quedó como A mientras que las células no tratadas terminaron en la subpoblación F.

Resultados similares se obtuvieron para las subpoblaciones B y E. En el primer caso, el tratamiento de las células durante 7

Tabla XII. Efecto del 13-cis retinal sobre la distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad

Subpoblación (%)	Días de tratamiento				
	0	4	26	68	120
A	16,0	20,0	20,0	24,0	20,0
B	23,0	24,7	25,4	28,9	35,0
C	33,5	30,0	31,6	27,8	32,0
D	4,5	4,5	4,7	3,4	2,5
E	5,8	5,8	5,9	5,7	6,0
F	17,2	15,0	12,4	10,2	4,5

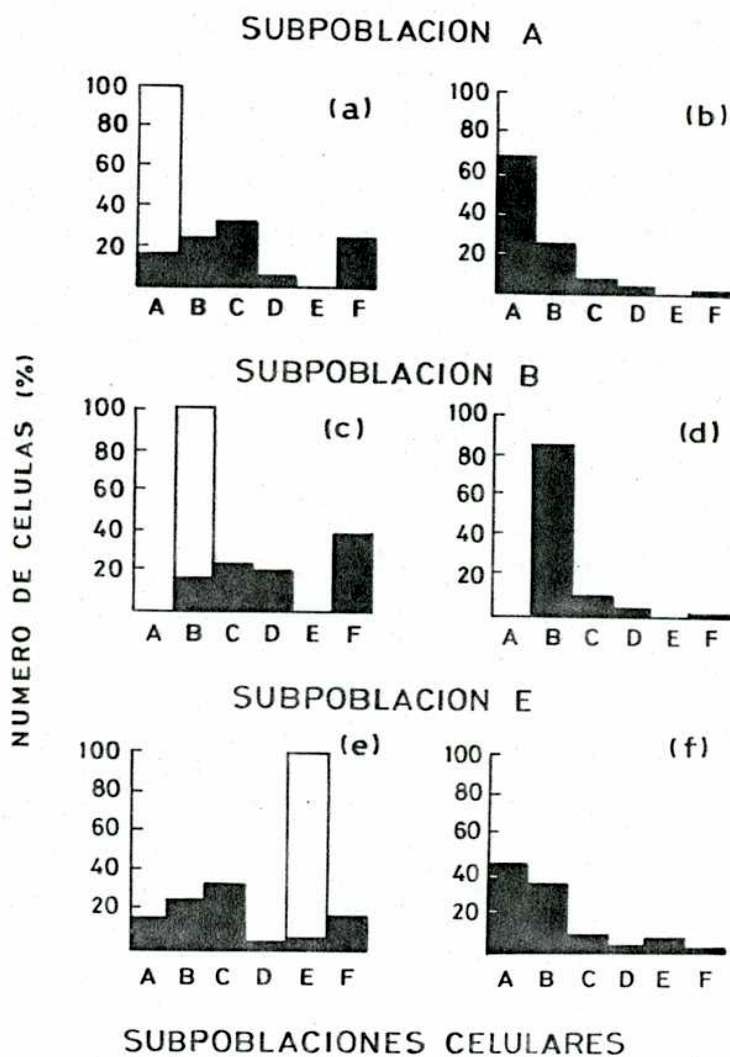
Las células fueron tratadas con  $10^{-8}$  M de 13-cis retinal durante distintos tiempos. Según se indica, fueron sometidas a una centrifugación en gradientes de densidad, tal como se describe en materiales y métodos.

Fig. 27: Efecto del 13-cis retinal sobre las subpoblaciones A, B y E.

Las subpoblaciones A y B se trataron con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M durante 7 días y se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. Para la subpoblación E, el tratamiento con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M se prolongó durante 47 días.

(a),(c),(e): Células no tratadas (controles).

(b),(d),(f): Células tratadas con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M.



días detuvo la generación de subpoblaciones con mayor grado de diferenciación, quedando el 84% de las células como B. El control no tratado generó C, D y F y sólo el 16% de las células permaneció como B (Fig. 27 c y d).

El tratamiento de la subpoblación E durante 47 días provocó un notable incremento en la contribución de las subpoblaciones A y B al total (78% versus 38% en el control) a expensas de la disminución del aporte de las subpoblaciones C, D y F (14% versus 56% en el control). En las células tratadas con retinal hubo un 8% de E mientras que en el control disminuyó al 5,8% (Fig. 27 e y f).

Estos resultados demuestran que  $10^{-8}$  M de 13-cis retinal actúa en estas células como modulador negativo de la diferenciación.

## C.2. Dimetilsulfóxido

### C.2.1. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la proliferación celular

Se ensayó el efecto de distintas dosis de DMSO sobre la proliferación de las células cultivadas en presencia de suero.

Las correspondientes curvas de crecimiento celular se muestran en la Fig. 28. Se puede apreciar que 0,1% DMSO no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento, tal como se había comprobado anteriormente cuando se utilizó esta dosis como control en las curvas del 13-cis retinal (Fig. 24A).

Una concentración del 0,5% produjo una inhibición del 50% del crecimiento celular que se manifestó ya a las 24 horas de tratamiento.

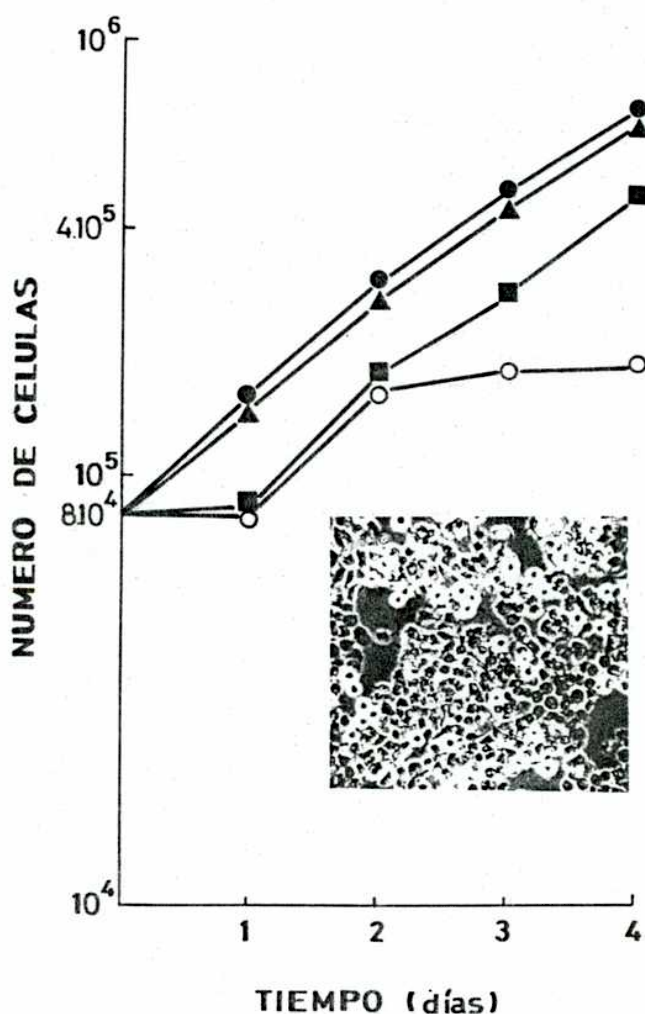
Cuando la dosis ensayada fue del 2%, hubo una inhibición

Fig. 28: Efecto del DMSO sobre el crecimiento de las células MCF-7.

Las células MCF-7 se sembraron a razón de  $8 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm y se cultivaron durante 4 días en presencia de distintas concentraciones de DMSO. Cada 24 horas se efectuó el recuento celular por triplicado.

●: control; ▲: 0,1% DMSO; ■: 0,5% DMSO; ○: 2% DMSO.

En el inserto de la figura se observa la morfología que adquirieron las células luego de 48 hs de tratamiento con 0,5% de DMSO.



del 50% del crecimiento celular durante las primeras 48 horas; a partir de entonces se detuvo el crecimiento.

En el inserto de la Fig. 28 puede observarse la morfología que presentaron las células tratadas con 0,5% DMSO durante 48 horas. Las células se redondearon y adquirieron un aspecto más pequeño y más oscuro que las células no tratadas.

Estos cambios morfológicos fueron irreversibles; las células perdieron su viabilidad y se colorearon con el colorante azul tripán.

A partir de las curvas de crecimiento obtenidas, se decidió elegir la concentración de 0,5% DMSO para los sucesivos experimentos.

#### C.2.2. Efecto del DMSO sobre la diferenciación celular

Para comprobar que el DMSO actuaba como inductor de la diferenciación en estas células, se sometieron las células tratadas durante 4 días con 0,5% DMSO a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll. La Tabla XIII muestra los resultados obtenidos para las células tratadas y para un control de células MCF-7, sin tratar.

El efecto del tratamiento con 0,5% DMSO durante 4 días fue notable: la distribución de las células en el gradiente sufrió alteraciones, con un importante enriquecimiento en las subpoblaciones más diferenciadas (D y F) a expensas de la disminución de las subpoblaciones con mayor capacidad proliferativa. La subpoblación de células "stem" (E) no resultó afectada por este tratamiento.



Tabla XIII. Efecto del dimetilsulfóxido sobre la diferenciación de las células MCF-7

Subpoblación (%)	Células	
	Control	Tratadas
A	15,5	4,4
B	23,0	9,0
C	33,5	14,0
D	4,2	17,0
E	5,8	5,5
F	18,0	50,1

Las células cultivadas en presencia de suero fueron tratadas durante 4 días con 0,5% DMSO. Se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad, tal como se describe en materiales y métodos.

Estos resultados demuestran que el DMSO ejerce un efecto inductor de la diferenciación en las células MCF-7.

### C.3. Butirato de sodio

#### C.3.1. Efecto del butirato de sodio sobre la proliferación celular

Se ensayó el efecto de distintas concentraciones de butirato de sodio sobre la proliferación de las células cultivadas en presencia de 10% de suero fetal bovino o en el medio químicamente definido. Las correspondientes curvas de crecimiento celular se presentan en la Fig. 29 (a y b).

En presencia de suero, concentraciones de butirato de sodio de 1 y 2 mM resultaron inhibitorias del crecimiento celular (65% y 73%, respectivamente, al 3° día de cultivo) mientras que concentraciones de 3 y 4 mM tuvieron efectos tóxicos; quedaron el 18 y 11%, respectivamente, de las células presentes en el control al cabo de 3 días de cultivo.

En el medio químicamente definido, las células fueron más sensibles al efecto del butirato de sodio. Concentraciones de 1 y 2 mM resultaron ser tóxicas; a partir de las 24 hs se detuvo el crecimiento celular cuando la concentración empleada fue 1 mM. Concentraciones de 3 y 4 mM tuvieron un importante efecto tóxico. Al cabo de 3 días de cultivo y en presencia de butirato de sodio 4 mM, el número de células fue de apenas el 5% del control.

El butirato de sodio indujo cambios morfológicos en las células, que se manifestaron a las 36 horas cuando la dosis empleada fue 1 mM; los cambios morfológicos observados fueron similares a los descritos anteriormente para el DMSO.

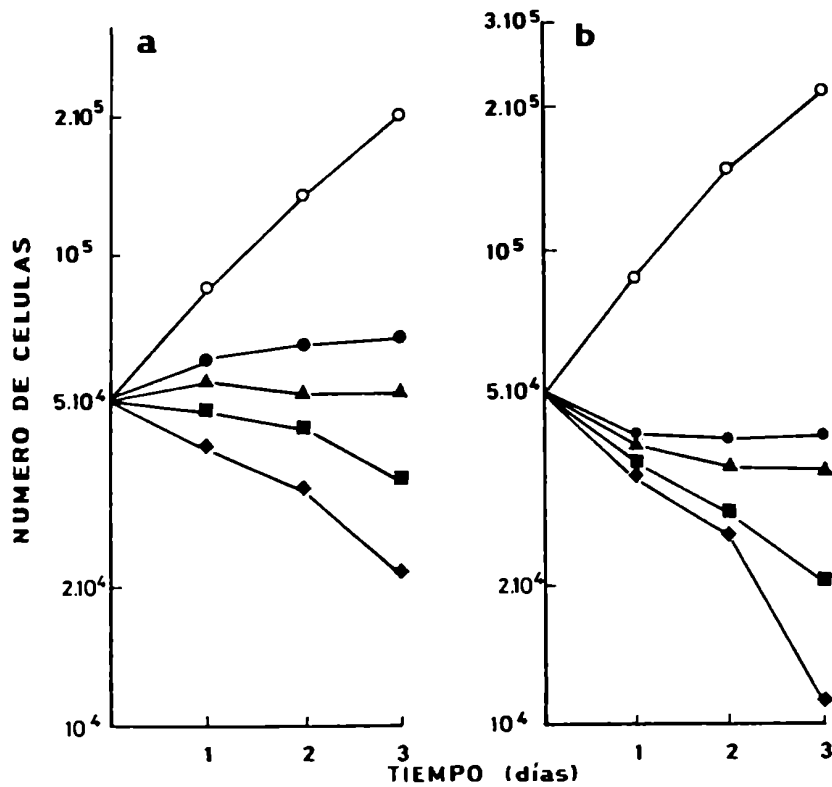
Fig. 29: Efecto del butirato de sodio sobre el crecimiento de las células MCF-7.

Las células se sembraron a razón de  $5 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm y se cultivaron durante 3 días en presencia de distintas concentraciones de butirato de sodio. Cada 24 horas se efectuó el recuento celular por triplicado.

(a): Células cultivadas en presencia de suero.

(b): Células cultivadas en el medio químicamente definido.

o: control; ●: 1 mM But; ▲: 2 mM But; ■: 3 mM But; ◆: 4 mM But.



### C.3.2. Efecto del butirato de sodio sobre la diferenciación celular

Las células MCF-7 cultivadas durante 2 días en presencia de suero y 1 mM de butirato de sodio fueron sometidas a una centrifugación en gradientes de densidad. El perfil del gradiente obtenido a partir de las células tratadas y del control se observa en la Fig. 30.

El tratamiento de las células durante 2 días fue suficiente como para observar un cambio en la distribución de las células en el gradiente. Tal como fue descrito anteriormente para el DMSO, se incrementó la contribución de las subpoblaciones más diferenciadas (en este caso, el incremento más importante se registró para la subpoblación D) a expensas de la disminución de las subpoblaciones A, B y C. No se alteró el porcentaje de la subpoblación E, que contiene las células "stem".

### C.4. Combinación de moduladores de la diferenciación

#### C.4.1. Efecto sobre la proliferación celular

Se decidió estudiar el efecto producido por la combinación de 13-cis retinal  $10^{-8}$  M con butirato de sodio, a concentraciones de 1 y 4 mM, sobre la proliferación de las células cultivadas en presencia de suero y en el medio químicamente definido (en ambos casos adheridas a las placas de cultivo) y en células crecidas en suspensión. En la Fig. 31 se graficaron las curvas de crecimiento celular, correspondientes a cada caso.

El análisis de esta figura permitió concluir que:

Fig. 30: Efecto del butirato de sodio sobre la distribución de las células MCF-7 en gradientes de densidad de Percoll.

Las células MCF-7 se cultivaron durante 2 días en presencia de 1 mM butirato de sodio. Posteriormente, se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll.

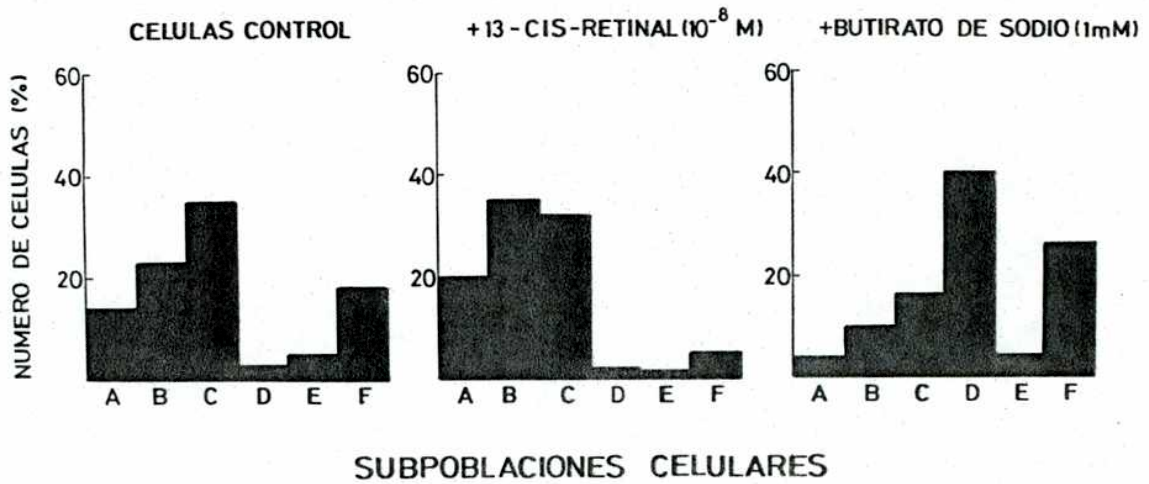


Fig. 31: Efecto del 13-cis retinal y del butirato de sodio (agregados por separado o en combinación) sobre el crecimiento de las células MCF-7 adheridas al sustrato, en presencia o ausencia de suero, y en suspensión.

Las células MCF-7 se sembraron a razón de  $5 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Se ensayó el efecto de retinal  $10^{-8}$  M; butirato de sodio 1 mM y 4 mM agregados por separado o en combinación con 13-cis retinal  $10^{-8}$  M sobre el crecimiento de las células durante 4 días de cultivo.

Las células MCF-7 adheridas al sustrato se sembraron en presencia de suero. Al cabo de 4 horas, se lavaron con PBS- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y se agregó el medio químicamente definido. Las células MCF-7 en suspensión se cultivaron directamente en el medio químicamente definido; la acción de la tripsina se detuvo con inhibidor de tripsina de soja, tal como se describe en la sección materiales y métodos.

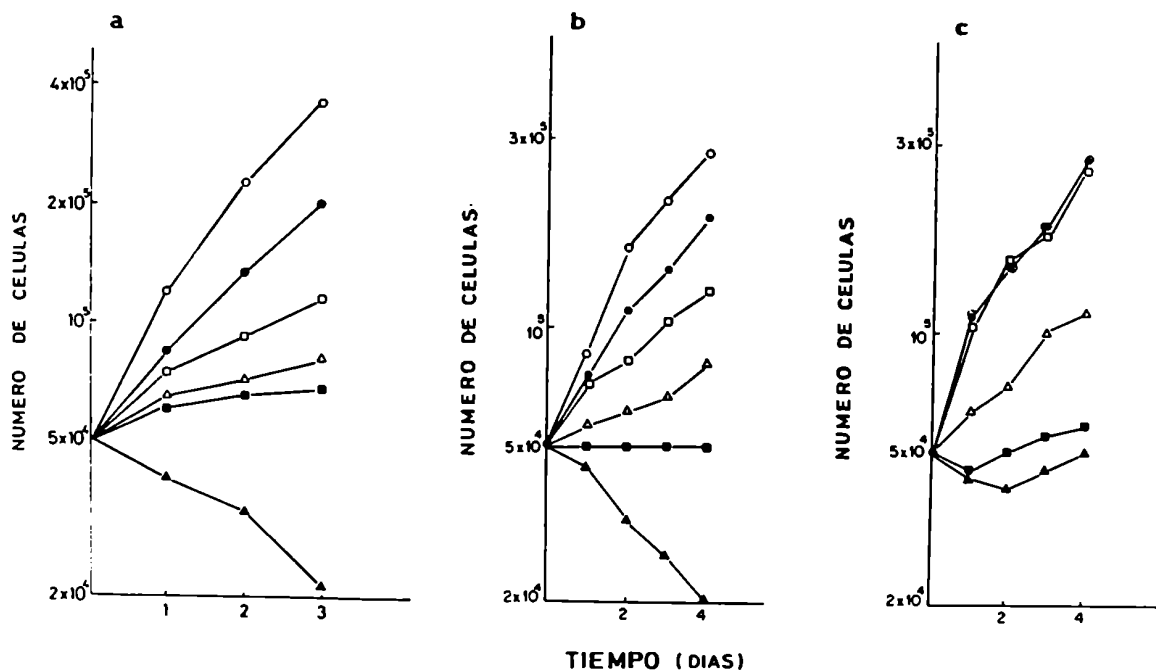
(a): Células cultivadas en presencia de suero.

(b): Células cultivadas en el medio químicamente definido, adheridas al sustrato.

(c): Células en suspensión.

●: controles; ○:  $10^{-8}$  M Ral; □:  $10^{-8}$  M Ral + 1 mM But; △:  $10^{-8}$  M Ral + 4 mM But; ■: 1 mM But; ▲: 4 mM But.

Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos efectuados por triplicado.



- el 13-cis retinal estimuló el crecimiento de las células que crecían adheridas al sustrato de las placas de plástico de cultivo pero no logró estimular el crecimiento de las células que crecían en suspensión;
- los efectos del butirato de sodio fueron más dramáticos sobre las células que crecían adheridas al sustrato de las placas de cultivo;
- resultó sumamente interesante el efecto observado por la combinación de los dos moduladores ya que el 13-cis retinal tuvo un efecto protector sobre las células, disminuyendo su sensibilidad al butirato de sodio.

## D. Crecimiento de la línea celular en suspensión

### D.1. Obtención de la línea celular en suspensión

Las células MCF-7 se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad. Las subpoblaciones aisladas se plaquearon en presencia de suero durante 3 horas para permitir la adherencia a las placas de cultivo y luego de aspirar el medio, se lavaron 2 veces con PBS y se agregó medio libre de suero. En estas condiciones las subpoblaciones crecieron muy poco y sobrevivieron durante 8-10 días. El agregado de  $10^{-10}$ - $10^{-9}$  M estradiol aceleró la muerte de las subpoblaciones A, B, C, D y F al inducir una rápida diferenciación de las células, con aparición de la misma morfología provocada por tratamiento con DMSO o butirato de sodio. En la Fig. 32 se observa la morfología que presentaron las células de la subpoblación B luego de 24 horas de tratamiento con  $10^{-10}$  M estradiol. La subpoblación B se muestra a modo de ejemplo de lo que ocurrió también con las subpoblaciones A, C, D y F.

Con respecto a la subpoblación E, el agregado de  $10^{-10}$  M estradiol al día 10 indujo un nuevo fenómeno: esta hormona permitió la supervivencia de las células luego de 3 días de tratamiento (es decir, al día 13 después de haber sido plaqueadas) pero con la aparición de un nuevo fenotipo debido a que las células se desprendieron espontáneamente de la placa de cultivo, creciendo en forma de agregados multicelulares en suspensión.

Este fenómeno no fue un hecho aislado sino que se reprodujo en todas las oportunidades ensayadas (6 veces), siempre que las subpoblaciones aisladas se cultivaran en el medio químicamente definido e independientemente de que la población total hubiera



Fig. 32: Morfología que presenta la subpoblación B de las células MCF-7 luego del tratamiento con estradiol o DMSO.

Las células MCF-7 se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad para aislar las subpoblaciones A a F.

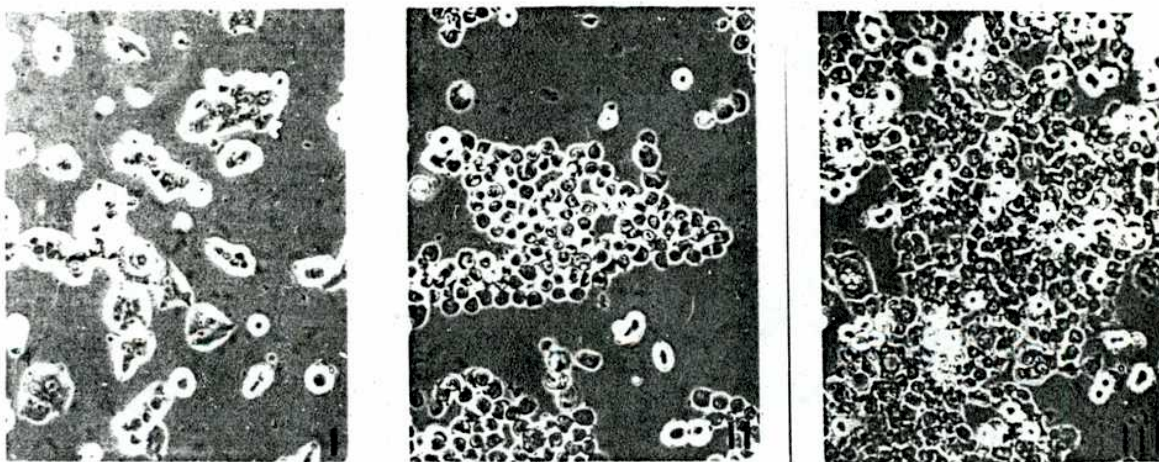
La subpoblación B se muestra en esta figura como ejemplo de lo que ocurrió con el resto de las subpoblaciones, a excepción de la subpoblación E.

I: Células no tratadas (control).

II: Células tratadas durante 24 horas con  $10^{-10}$  M estradiol.

III: Células tratadas durante 72 horas con 0,5% DMSO.

Las fotografías se obtuvieron con una cámara Polaroid (X 100).



crecido en presencia o ausencia de suero. Hasta el momento, las células llevan más de 2 años creciendo en suspensión.

A partir del momento en que las células adquirieron la capacidad de crecer en forma independiente del anclaje, dejaron de requerir estradiol para su crecimiento o supervivencia.

## D.2. Análisis de las células

### D.2.1. Curvas de crecimiento celular

En la Fig. 33 se graficaron las curvas de crecimiento para las células en suspensión y para el control, cultivado en presencia de suero. Se puede apreciar que las células en suspensión tienen una mayor velocidad de crecimiento que el control. En el inserto de la Fig. 33 se observan los agregados multicelulares creciendo en suspensión.

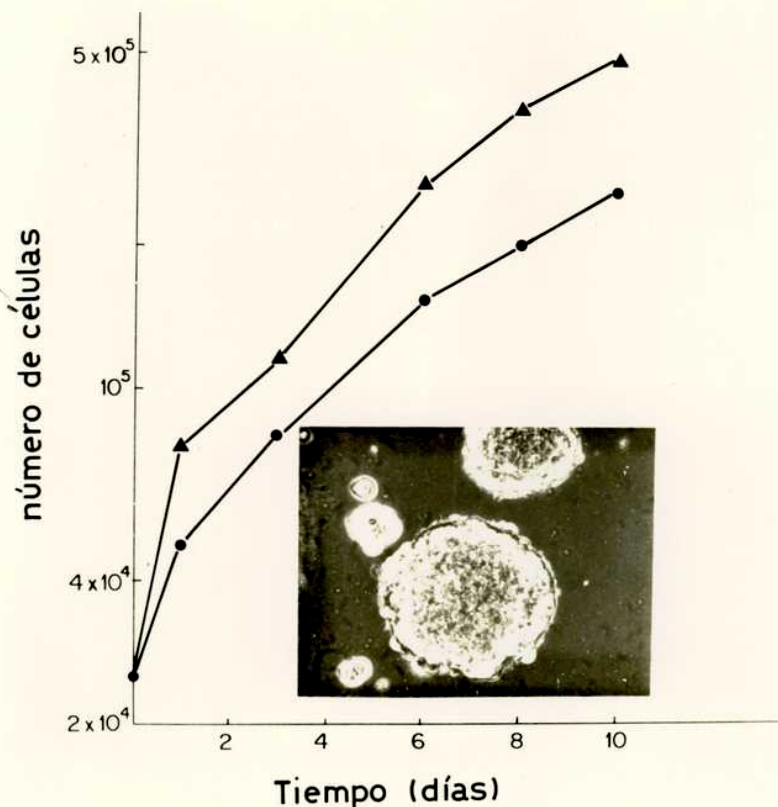
### D.2.2. Distribución de las células en gradientes de densidad

Cuando las células que crecen en suspensión se sometieron a una centrifugación en gradientes de densidad de Percoll, se observó que la población total estaba enriquecida en las subpoblaciones A y B (juntas sumaron el 86% de las células) a expensas de la disminución de las subpoblaciones D y F, cuya contribución fue del 4%. Por el contrario, en presencia de suero, las subpoblaciones A y B constituyeron el 38% del total mientras que las subpoblaciones D y F aportaron el 22%. Esta alteración en la distribución de las células en el gradiente explicaría la mayor velocidad de crecimiento observada en las células en suspensión con respecto a las células cultivadas en presencia de suero. Por

Fig. 33: Curvas de crecimiento de las células MCF-7 en suspensión y en presencia de suero.

Las células se sembraron a razón de  $2,5 \cdot 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm. Las células MCF-7 adheridas al sustrato se cultivaron en medio Dulbecco/F-12/FBS (●). Las células MCF-7 en suspensión se cultivaron en medio Dulbecco/F-12 (1:1) sin suplementar (▲). Los resultados obtenidos corresponden al promedio de 2 experimentos distintos, cada uno de los cuales se efectuó por duplicado.

El inserto de la figura muestra las células MCF-7 creciendo como agregados multicelulares en suspensión. La fotografía fue tomada con una cámara Polaroid asociada al microscopio Wild (X 100).



la misma razón se explicaría la mayor velocidad de crecimiento de estas células con respecto a las que crecen en el medio químicamente definido pero adheridas al sustrato de las placas de plástico de cultivo.

#### D.2.3. Crecimiento independiente del anclaje

Obviamente, por su capacidad de crecer en suspensión, estas células dieron fácilmente colonias en un medio semisólido de cultivo como el agar blando. Al cabo de 7 días de cultivo en estas condiciones, las colonias fueron grandes con más de  $10^5$  células/colonia mientras que las células cultivadas en el medio químicamente definido adheridas a las placas de cultivo generaron colonias en agar blando con un tamaño promedio de 4.000 células/colonia medido al séptimo día de cultivo.

#### D.2.4. Contenido de receptores estrogénicos

Se determinó el contenido de receptores estrogénicos por el método inmunocitoquímico.

A los 3 días de cultivo en el medio químicamente definido, el RE se detectó en el 33% de las células. Al día 10, el 80% de las células dieron reacción positiva para el RE; esto se correlacionó con el requerimiento de estradiol que manifestaron las células. Al día 13, cuando las células ya crecían en suspensión, el RE se detectó sólo en el 10% de las células y coincidió con una falta de requerimiento de estrógeno por parte de las mismas. No sólo se modificó el porcentaje de células RE-positivas sino también la intensidad de la tinción. Al día 3, el 19% del total de

las células RE-positivas dieron una tinción intensa; al día 10, el porcentaje ascendió al 30% mientras que al día 13 disminuyó al 8%.

#### D.2.5. Respuesta a factores de crecimiento

Se ensayó el efecto de diversos factores de crecimiento sobre estas células. Ninguno de ellos (PDGF, EGF, trombina, transferrina e insulina) logró modificar la velocidad de crecimiento de estas células, que demostraron tener un crecimiento autócrino.

Incluso se ha logrado cultivar las células en un medio Dulbecco/F-12 (1:1) sin el aporte de albúmina, insulina y estradiol.

#### D.2.6. Efecto de moduladores de la diferenciación celular

##### D.2.6.1. Efecto del 13-cis retinal

Tal como puede apreciarse en la Fig. 31C, el 13-cis retinal no logró estimular el crecimiento de estas células.

##### D.2.6.2. Efecto del butirato de sodio

En base a los resultados obtenidos y presentados en la Fig. 31C, se deduce que las células en suspensión resultaron ser más resistentes a la inhibición del crecimiento inducida por el butirato de sodio.

## DISCUSION

### 1. Heterogeneidad celular

La línea celular MCF-7 utilizada en este trabajo no ha sido previamente clonada y conserva las características que fueron descritas en el momento de su obtención por Soule y col. en 1973.

Varios investigadores han descrito su heterogeneidad celular (Yang y col, 1977; Barkley Butler y col., 1986) pero la han atribuido a la coexistencia de distintas sublíneas, cada una de las cuales presenta diferentes propiedades. La pregunta crucial era dilucidar si cada una de las subpoblaciones obtenidas luego de someter la línea celular a una centrifugación en gradientes de densidad correspondía a distintos clones o sublíneas o bien si todas ellas se originaban a partir de una misma subpoblación de células "stem" y por lo tanto correspondían a distintos estadios de diferenciación. Este trabajo apoya la segunda hipótesis dado que:

- cuando las subpoblaciones se cultivan en forma aislada, dan origen a otras subpoblaciones, a excepción de la subpoblación F que queda como tal;
- las subpoblaciones con mayor capacidad proliferativa originan subpoblaciones con menor velocidad de crecimiento. Este resultado es justamente el opuesto al que se podría esperar si coexistieran 2 subpoblaciones no relacionadas con distinta capacidad proliferativa.

La subpoblación E cumple con los requisitos indispensables para ser considerada una subpoblación enriquecida en células "stem":

- contribuye con un pequeño pero constante porcentaje ( $5,8 \pm 0,2$ )% a la población total;
- es la subpoblación de mayor capacidad proliferativa, determinada por las curvas de crecimiento celular y la capacidad de síntesis de ADN;
- es la subpoblación con mayor eficiencia clonogénica en agar blando;
- tiene la capacidad de autorenovarse y de originar a las demás subpoblaciones sin que ninguna de ellas pueda generarla.

El hecho de que posea la misma composición genética y los mismos marcadores cromosomales que la línea celular parental confirma que su distinta capacidad proliferativa se debe a su contenido de células "stem" y descarta la posibilidad de que corresponda a un clon de mayor velocidad de crecimiento obtenido en forma aislada.

Por otro lado, cabe agregar que si bien las líneas celulares tumorales tienen cierta tendencia a sufrir variaciones genéticas espontáneas en cultivo, los resultados citogenéticos obtenidos para la línea celular MCF-7 de nuestro laboratorio coinciden con los descritos por Soule y col. (1973) y Whang-Peng y col. (1983).

Las subpoblaciones A, B, C y D (mencionadas en orden decreciente de capacidad proliferativa) constituyen las células transicionales, dentro de la jerarquía celular propuesta por Buick y Pollak en 1984.

La subpoblación F contiene las células más diferenciadas dado que la misma no alcanza a duplicar su número de células al cabo de 8 días de cultivo; tiene bajo índice de marcación con timidina

tritiada; es incapaz de generar otras subpoblaciones; corresponde a la subpoblación de mayor densidad (1,070-1,080 gr/ml) y es la que presenta mayor producción de lípidos, teñidos con el colorante oil red O. Estas características descritas para la subpoblación F coinciden con las observadas por Mackillop y Buick (1981) en células diferenciadas de carcinoma de ovario humano. Estos autores caracterizaron a las células diferenciadas por su baja incorporación de timidina tritiada, por ser células densas y por su contenido de lípidos, revelados como gotas de color rojo brillante en el citoplasma de células teñidas con oil red O. Asimismo, estas células son incapaces de generar colonias en medio semisólido.

La expresión de marcadores tan diversos como la proteína p21 codificada por el gen ras, receptores estrogénicos y el antígeno carcinoembrionario no permite establecer una relación precisa entre la expresión de los mismos y el estadio de diferenciación. La proteína p21 se expresa principalmente en la subpoblación C, siendo menor su expresión en la subpoblación E que corresponde a la de mayor capacidad proliferativa. Por lo tanto, estos resultados contradicen la hipótesis formulada por el grupo de investigación liderado por Schlom (Horan-Hand y col., 1984; Thor y col., 1984; Viola y col., 1985 y 1986) acerca de la correlación existente entre altos niveles de expresión de esta proteína y alta capacidad proliferativa. Más recientemente, Garin Chesa y col. (1987) demostraron en tumores humanos que la expresión de la proteína p21 se correlaciona con la diferenciación celular y no con la capacidad proliferativa. Estos autores analizaron tumores conteniendo células en distintos estadios de diferenciación y



encontraron que las células más diferenciadas correspondían a las de reacción inmunocitoquímica más intensa. Correlacionaron estas observaciones con las anteriormente descritas por Cotton y Brugge (1983) y Brugge y col. (1985) para la expresión de una proteína codificada por otro oncogen; en este caso, los mayores niveles de expresión de la proteína pp60 codificada por el gen src se detectaron en las células diferenciadas.

Clair y col. (1987) demostraron en tumores humanos hormonodependientes la existencia de una correlación entre mayores niveles de expresión de receptores estrogénicos y mayor expresión de la proteína p21. Los resultados presentados en este trabajo coinciden con dichas observaciones por cuanto la subpoblación C es la que presenta mayor contenido de receptores estrogénicos y mayor expresión de la proteína p21.

De Bortoli y col. (1985) y Ohuchi y col. (1986) demostraron en carcinomas de mama humanos una expresión aumentada de la proteína p21, con localización citoplasmática. Correlacionaron la mayor expresión de este marcador con propiedades biológicas, tales como la capacidad invasiva y el crecimiento "in vivo". Al respecto, podría mencionar que resultados preliminares indican que la subpoblación C, con mayor expresión de la proteína p21, sería la de mayor tumorigenicidad en ratones atímicos. Dicho estudio se efectúa en presencia de aporte estrogénico y coincidentemente, dicha subpoblación es la de mayor respuesta al estímulo hormonal. La subpoblación E, enriquecida en células "stem" y la de mayor crecimiento independiente del anclaje, curiosamente no resultó la más tumorigénica en estos ensayos preliminares. Estas obser-

vaciones probablemente puedan explicarse a partir del trabajo de Nicolson y col. (1988) en el cual los autores demuestran que la eficiencia clonogénica en agar blando es un parámetro que no correlaciona con la tumorigenicidad "in vivo". Por otro lado, el ensayo en los ratones atímicos requiere del aporte hormonal y como se mencionó anteriormente, la subpoblación E es la de menor contenido de receptores estrogénicos y responde a dicho estímulo "in vitro" sólo en condiciones muy particulares (como se explica más adelante, en la sección 3.3).

Con respecto al contenido de receptores estrogénicos en las distintas subpoblaciones, en el presente trabajo se observa una mayor expresión de este marcador en las subpoblaciones C y F. Podhajcer y col. describieron en 1986 que el contenido de receptores estrogénicos en tumores primarios de mama humanos se debía a la expresión de este marcador exclusivamente en las células más diferenciadas. Sin embargo, sus resultados contradicen a los de Huseby y col. (1984) y Osborne y col. (1984) por cuanto descartan la expresión de receptores estrogénicos en células proliferativas, oponiéndose al efecto directo de los estrógenos sobre la proliferación celular en líneas celulares tumorales humanas RE-positivas. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio coinciden con los de Podhajcer y col. (1986) en cuanto a la expresión en las células más diferenciadas (en nuestro caso, la subpoblación F) pero también coinciden con los trabajos de Huseby y col. (1984) y Osborne y col. (1984) en cuanto al contenido de receptores estrogénicos en células proliferativas (como son las células de la subpoblación C). La discrepancia observada en los distintos traba-

jos probablemente se deba a que las líneas celulares tumorales humanas no representen fielmente lo que sucede en los tumores "in vivo".

Los cambios tan drásticos que se manifiestan en el índice de marcación con timidina ("TLI") cuando las subpoblaciones se cultivan en forma aislada sugieren que cuando están juntas, en la población total de células MCF-7, interactúan entre sí. Dichas interacciones enmascaran el real comportamiento que presenta cada subpoblación por separado. Cuando se originan todas las subpoblaciones a partir de las células "stem", se reestablecen las interacciones entre las distintas subpoblaciones y se pierden las características de cada una de ellas, comportándose como la línea celular parental. Esto se manifiesta a partir del día 14 de cultivo de la subpoblación E (Fig. 2). Los resultados presentados en dicha figura sugieren un proceso de diferenciación unidireccional en las células MCF-7, siguiendo este orden: E → A → B → C → D → F. La tinción de lípidos con oil red O resultó un método valioso para el seguimiento de este proceso. A las 24 horas de cultivo de la subpoblación E, no se detectaron lípidos pero en cambio se observó aproximadamente un 8% de núcleos mitóticos por campo analizado (Fig. 6b). Cuando la tinción se repitió al cabo de 14 días de cultivo, la coloración fue intensa y correlacionó con la aparición de las subpoblaciones diferenciadas (Figs. 2 y 6 c).

El estudio de las interacciones entre las distintas subpoblaciones aportó información sumamente interesante. Como cabía esperar por su condición de célula "stem", el aporte de la subpoblación E resultó imprescindible para el óptimo crecimiento de

las células MCF-7. En ausencia de dicha subpoblación, el crecimiento observado a los 6 días fue de apenas el 20% del control pero se recuperó al agregar el medio condicionado por las células "stem" (Fig. 10). Dicho medio condicionado, ensayado a una concentración final del 50%, fue capaz de triplicar el crecimiento de la subpoblación F. Más impactante aún fue su efecto sobre el crecimiento en agar blando dado que a una concentración final del 25%, logró que las células de la subpoblación F generaran colonias con una eficiencia del 1% (Fig. 13 II). Este efecto podría deberse al contenido de TGF- $\alpha$  en el medio condicionado dado que mimetiza el efecto inducido por el EGF en estas células. Actualmente, en el laboratorio se está trabajando en la purificación de TGF- $\alpha$  a partir del medio condicionado de las células "stem". Por el contrario, el medio condicionado por la subpoblación F probablemente contenga TGF- $\beta$  dado que tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la subpoblación E (Fig. 11) pero no afecta su eficiencia clonogénica en agar blando. Estos resultados e hipótesis concuerdan con los trabajos de Salomon y col. (1984) y Knabbe y col. (1987) por los cuales demuestran la presencia de TGF- $\beta$  en el medio condicionado de las células MCF-7. Estos autores indican además que la línea celular MCF-7 es heterogénea, tal como se demuestra en el presente trabajo, y postulan que dicha heterogeneidad se manifestaría también en la distinta producción de TGF- $\alpha$  o  $\beta$  por parte de las células.

Por otra parte, la diferente producción de estos factores por parte de las células de las subpoblaciones E y F explicaría su distinta capacidad de generar colonias en un medio semisólido. Por

lo tanto, la alta eficiencia clonogénica que presenta la subpoblación E se explicaría por la presunta existencia de TGF- $\alpha$  en su medio condicionado; dicho factor actuaría como modulador positivo del crecimiento autócrino. Asimismo, la incapacidad de las células de la subpoblación F para crecer en forma independiente del anclaje corelacionaría con la producción de TGF- $\beta$  por parte de estas células. La mayor contribución de las células F con respecto a las células "stem" en la población total cultivada en presencia de suero explicaría la bajísima eficiencia clonogénica de las células MCF-7, debido a que predominaría el efecto inhibitorio sobre el crecimiento ejercido por el TGF- $\beta$ . Knabbe y col. (1987) postularon que dicho factor actuaría como modulador negativo del crecimiento autócrino y paracrino de las células MCF-7.

## 2. Crecimiento de las células en el medio libre de suero

### 2.1. Requerimiento de factores de crecimiento

Una vez considerada la validez del modelo de las células MCF-7 y sus subpoblaciones aisladas, la siguiente pregunta que debía ser contestada era averiguar qué factores de crecimiento estaban verdaderamente involucrados en la regulación de la proliferación de estas células de tumor de mama humano.

Barnes y Sato describieron en 1979 un medio libre de suero para el crecimiento de las células MCF-7 que incluía además de nutrientes e insulina, otros factores de crecimiento como EGF, transferrina y PgF $_{2\alpha}$ . En el presente trabajo, se describen las modificaciones fenotípicas que experimentan las células MCF-7 cuando se cultivan en un medio químicamente definido, con el

aporte de insulina como único factor regulatorio. La morfología de las células cultivadas en este medio mínimo de cultivo es muy semejante a la que presentaban las células descritas por Barnes y Sato en 1979. Sin embargo, ciertas deficiencias se hacen evidentes cuando se siembran las células a baja densidad. Los factores de adhesión provistos por el suero fetal bovino serían una de las deficiencias críticas del medio químicamente definido empleado. Las células MCF-7 se adhirieron al sustrato de las placas de cultivo previamente tratadas con colágeno pero su crecimiento fue más lento que el observado al sembrar las células en presencia de suero durante 4 horas antes de transferirlas al medio químicamente definido. Al respecto, Karey y Sirbasku (1988) comentan que si luego de plaquar las células en presencia de suero, se hacen lavados con buffers de pH neutro no se consigue eliminar el efecto residual del suero en cuanto a su aporte de hormonas y factores de crecimiento. Para lograr que las células pierdan la "memoria" del suero, se requieren lavados con buffers de pH ácido. Esta observación explicaría la menor velocidad de crecimiento observada al sembrar las células sobre placas recubiertas con colágeno y probablemente se deba a que las células requieran otras glicoproteínas involucradas en la adhesión celular y que serían normalmente provistas por el suero. En ausencia de suero, las células deberían sintetizar dichos factores, retardando así su velocidad de crecimiento.

El uso del medio libre de suero permite analizar los requerimientos de factores de crecimiento y el rol que cumplen los mismos en esta línea celular. Las células MCF-7 no experimentan requeri-

miento alguno de transferrina, considerada un nutriente esencial para la mayoría de las células. Esta falta de requerimiento probablemente se deba a que las células sintetizan y liberan al medio de cultivo un factor con actividad de sideroforo, tal como describieron Kitada y Hays (1985) en 2 líneas celulares que no manifiestan requerimiento de transferrina. Por otro lado, Lee y col. (1987) describieron que la transferrina es una proteína mayoritaria de la leche de ratón, siendo producida por células epiteliales de mama. Sin embargo, no se detectó producción de ARNm de transferrina en las células MCF-7 (Zakin y Medrano, resultados no publicados).

Con respecto al requerimiento de factores de crecimiento, varios grupos de investigación (Osborne y col., 1981; Imagawa y col., 1982; Imai y col., 1982) describieron que EGF ejerce un efecto estimulador del crecimiento en las células MCF-7. En nuestro caso, este efecto se manifiesta sólo cuando las células se siembran a baja densidad (Tabla V). La falta de requerimiento de EGF cuando las células se encuentran a alta densidad celular probablemente se correlacione con la capacidad que presentan estas células para producir TGF- $\alpha$  o EGF, tal como fue descrito por Salomon y col. (1984) y Mori y col. (1986).

A baja densidad, las células también requieren trombina para su óptimo crecimiento. Dicho requerimiento desaparece cuando los cultivos alcanzan una alta densidad celular y probablemente se deba a que las células liberan inhibidores de proteasas al medio de cultivo, tal como fue descrito por Gendler y col. (1982) y Morissett y col. (1986).

Zetter y col. (1977) y Gospodarowicz y col. (1978) observaron que trombina tiene la capacidad general de potenciar el efecto de otros factores de crecimiento. En este trabajo, se observó que trombina potencia el efecto de EGF sólo cuando las células se encuentran a baja densidad. Uno de los mecanismos posibles para explicar la potenciación del efecto postula que trombina induce modificaciones a nivel de membrana celular, aumentando la sensibilidad de las células al efecto de otros factores de crecimiento. Blumberg y Robbins (1975) y Baker y col. (1979) demostraron que trombina induce modificaciones en proteínas de membrana y su acción a nivel de membrana es suficiente para estimular la síntesis de ADN y el crecimiento celular (Carney y Cunningham, 1978a). Dichos efectos consisten en una mayor exposición de receptores presentes en la membrana celular específicos para otros factores de crecimiento.

El otro mecanismo de potenciación propuesto se basa en que trombina aumentaría la vida media del complejo factor de crecimiento-receptor, disminuyendo la endocitosis mediada por receptor (Goldstein, 1979) o la degradación intracelular de factores de crecimiento tales como insulina y EGF.

Por otro lado, Medrano y col. (1987) observaron que trombina puede reemplazar casi completamente al EGF en otra línea celular de tumor de mama humano, T-47D. Sin embargo, la relación entre estos dos factores de crecimiento no se daría a nivel de membrana dado que para cada uno de ellos existen receptores específicos y por ende, estos factores de crecimiento no se unirían al mismo receptor (Carney y Cunningham, 1978b). En consecuencia, es posible



que estimulen un segundo mensajero en común que conduzca a la síntesis de ADN.

El agregado de trombina a las células MCF-7 resulta en una rápida estimulación de la proteínasquinasa C, aunque su efecto es menor que el inducido por insulina (Gómez y col., 1988).

En fibroblastos de hamster chino IIC 9, trombina estimula la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de fosfatidilinositol (Raben y col., 1987). L'Allemain y col. demostraron en 1986 que trombina induce formación de inositol fosfato en fibroblastos de pulmón de hamster. Carney y col. (1985) habían descrito, anteriormente, que trombina estimulaba la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a fosfatidil inositol-4-fosfato en fibroblastos de hamster.

Determinados los requerimientos de factores de crecimiento en la línea celular MCF-7, el paso siguiente consistió en analizar los requerimientos manifestados por cada subpoblación en particular.

En ausencia de insulina, las subpoblaciones más diferenciadas (D y F) detuvieron su crecimiento y entraron en un estado de quiescencia. Las subpoblaciones A, B y E, por el contrario, continuaron proliferando probablemente debido a que estas células produzcan algún factor semejante a la insulina. En este sentido, Huff y col. (1986 y 1987) describieron la producción de factores que pueden reemplazar a la insulina en células MCF-7.

En cuanto a la subpoblación C, estas células manifiestan el requerimiento de insulina sólo cuando se encuentran a baja densidad; el mismo desaparece cuando los cultivos superan una den-

sidad de  $5 \times 10^4$  células/placa de cultivo de 35 mm.

El agregado de 10 ug/ml de insulina, que es la concentración empleada para mantener los cultivos madres de células MCF-7, estimuló dramáticamente la incorporación de timidina tritiada en las subpoblaciones D y F quiescentes. Rechler y col. (1980) demostraron que a estas concentraciones, insulina ejerce su efecto mitogénico a través de la unión a los receptores de IGF-I.

Trombina indujo un notable incremento en la incorporación de timidina tritiada en las subpoblaciones más diferenciadas (D y F) cuando se encontraban en estado de quiescencia. Cuando las células estaban en activa proliferación, trombina estimuló el crecimiento de ambas subpoblaciones, siendo mayor su efecto en ausencia de insulina. Sin embargo, el efecto sobre la subpoblación F fue limitado dado que se detuvo al cabo de 2 duplicaciones. Sobre la subpoblación D, por el contrario, trombina indujo la supervivencia de las células en el medio químicamente definido durante más de 2 meses, demorando la diferenciación celular. Este efecto es notable dado que en ausencia de trombina, las células no sobrevivieron más de 8-10 días.

La prostaglandina  $F_{2\alpha}$  estimuló la síntesis de ADN de las subpoblaciones C y D quiescentes y en cultivo. No ejerció efecto alguno sobre las células de la subpoblación B quiescentes; sin embargo, tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento cuando las células de la subpoblación B se encontraban en activa proliferación (Fig. 8).

El tratamiento de las células de la subpoblación C con  $PgF_{2\alpha}$  permitió la supervivencia de las mismas en el medio libre

de suero durante más de 2 meses. Tal como se describió anteriormente para la subpoblación D tratada con trombina, en este caso también el factor de crecimiento detuvo la diferenciación celular. Las células controles no tratadas no pudieron sobrevivir en esas condiciones por más de 10 días.

Varios grupos de investigación (Macphee y col., 1984; Davis y col., 1987) demostraron que la  $\text{Pgf}_2\alpha$  actúa estimulando el metabolismo de fosfoinosítidos. Sin embargo, aunque trombina y  $\text{Pgf}_2\alpha$  actúen a través del mismo segundo mensajero, la regulación debe ser distinta en las subpoblaciones C, D y F dado que la subpoblación F sólo es sensible a trombina; la subpoblación C sólo responde a  $\text{Pgf}_2\alpha$  mientras que la subpoblación D es estimulada por ambos factores. En este trabajo no se ha estudiado el metabolismo de fosfoinosítidos ni se ha identificado el mecanismo de acción de estos mitógenos como para poder dilucidar por qué algunas subpoblaciones celulares manifiestan el requerimiento de un determinado factor de crecimiento mientras que otras prescinden del aporte exógeno del mismo factor.

Las subpoblaciones celulares también resultaron heterogéneas en cuanto al requerimiento de PDGF y EGF. Las subpoblaciones A y E no manifestaron requerimiento alguno de factores de crecimiento. La subpoblación B respondió al EGF sólo cuando se cultivaba en ausencia de insulina. La subpoblación C respondió a la combinación de PDGF/EGF cuando se encontraba en estado de quiescencia y sólo durante 24 horas en activa proliferación.

Las subpoblaciones D y F respondieron al efecto de EGF, el cual se potenció en combinación con PDGF tanto sobre las células

quiescentes como en activa proliferación.

La falta de requerimiento de EGF por parte de las subpoblaciones A y E probablemente se correlacione con la producción endógena de TGF- $\alpha$ . Los resultados presentados permiten establecer una correlación entre diferenciación y mayor requerimiento de factores de crecimiento aportados al medio de cultivo. Las células con mayor capacidad proliferativa, por el contrario, son las que presentan un crecimiento autócrino.

## 2.2. Ultraestructura de las células

Por microscopía electrónica se observa que las células cultivadas en el medio libre de suero, con el aporte de insulina como único factor regulatorio, presentan una ultraestructura típica de célula secretora caracterizada por un aparato de Golgi muy grande y distendido y por la presencia de vesículas con cubierta en la membrana plasmática. Franke y col. (1976) describieron a estas vesículas como vehículos para la eliminación de lactosa, iones inorgánicos y agua en células de epitelio mamario de rata. Estas vesículas también se relacionan con el transporte selectivo de proteínas solubles y de membrana y con la endocitosis mediada por receptor.

La morfología secretoria de las células cultivadas en ausencia de suero se correlaciona con una mayor liberación de productos de naturaleza proteica al medio de cultivo y con la aparición de una proteína de 56 kDa (Fig. 19). Asimismo, este hecho podría explicar también un menor requerimiento de factores de crecimiento y una mayor capacidad de originar colonias en agar blando que pre-

sentan estas células en relación a las cultivadas en presencia de suero. En este sentido, este trabajo concuerda con los de otros autores (Chalbos y col., 1982; Zwiebel y col., 1982; Ikeda y col., 1984; Salomon y col., 1984; Hiragun y col., 1985; Mori y col., 1986) acerca de que varias proteínas contribuirían al crecimiento autócrino de las células de tumor de mama.

Los geles bidimensionales de las proteínas intracelulares revelan cambios cualitativos pero queda por establecer el origen subcelular de esas proteínas.

El análisis de las citoqueratinas por la técnica de "Western blot" demuestra que las citoqueratinas son idénticas en ambas condiciones de cultivo aún cuando la distribución topológica sea diferente. Lo mismo ocurre con la expresión del CEA: es difusa en las células cultivadas en presencia de suero mientras que se presenta como un anillo perinuclear en las células cultivadas en el medio químicamente definido (Fig. 22). Resta dilucidar si existe alguna relación entre la expresión del CEA y la estructura del Golgi en ambas condiciones de cultivo.

La mayor actividad secretoria de las células cultivadas en el medio libre de suero no correlaciona con la expresión de un fenotipo más diferenciado por parte de las células, dado que las células cultivadas en el medio químicamente definido están enriquecidas en las subpoblaciones con menor grado de diferenciación y mayor velocidad de crecimiento (Tabla IX). Más aún, el medio condicionado de las células cultivadas en presencia de suero es el que induce diferenciación de las células CHEF/18 mientras que no se logra ese efecto cuando se agrega el medio condicionado de las

células cultivadas en ausencia de suero. Por otro lado, las células cultivadas en presencia de suero presentan una intensa reacción inmunocitoquímica para la proteína p21, siendo menor la positividad de la reacción cuando las células se cultivan en el medio químicamente definido (Fig. 23). Tal como se comentó anteriormente, haciendo referencia a los trabajos de Garin Chesa y col. (1987), existe correlación entre la expresión de este marcador y el grado de diferenciación.

Katzenellenbogen y col. (1987) describieron un incremento de 3 veces en el contenido de receptores estrogénicos en células MCF-7 cultivadas durante períodos prolongados en ausencia de estrógenos. Sin embargo, el medio químicamente definido empleado en este trabajo contiene rojo fenol que ejerce efecto estrogénico, según fue descrito por Berthois y col. (1986).

De los resultados obtenidos puede concluirse que el suero es una mezcla compleja de sustancias entre las cuales se cuentan hormonas, factores estimulatorios e inhibitorios del crecimiento que pueden atenuar el metabolismo de las células MCF-7 y/o el efecto que ejerce la insulina sobre esta línea celular.

Estos resultados coinciden con los de Hammond y col. (1984) acerca del efecto inhibitorio que ejerce el suero sobre las células epiteliales de mama humana. El suero enmascararía el fenotipo agresivo de las células MCF-7. En ese sentido resulta interesante comentar los resultados presentados en la Tabla VIII donde se observa la alta eficiencia clonogénica que presentan las células cultivadas durante más de 20 días en el medio químicamente definido.

El requerimiento hormonal que presentan las células al 10° día de cultivo en el medio libre de suero coincide con el incremento transiente en la expresión de receptores estrogénicos. El agregado de estradiol incrementa en un 80% la eficiencia clonogénica de estas células. Cabe mencionar que Stampfer y col. describieron en 1980 un medio de cultivo para epitelio de mama normal, en el cual la reducción de 10% a 1% de suero permitía una mayor proliferación.

### 3. Moduladores de la diferenciación celular

#### 3.1. Efectos de 13-cis retinal

Los resultados presentados en la Fig. 24 demuestran que el 13-cis retinal estimula la proliferación de las células MCF-7 independientemente del medio de cultivo empleado, obteniéndose resultados similares tanto en presencia como en ausencia de suero. Estos resultados no se restringen a esta línea celular sino que se reprodujeron en las células T-47D de origen metastásico (obtenida por Keydar y col. en 1979) y en la línea celular Hs-578T derivada de un carcinosarcoma mamario (obtenida por Hackett y col., 1977).

En este trabajo se describe un efecto novedoso del 13-cis retinal: la acumulación de proteínas nucleares en las células crónicamente tratadas. Dicho efecto podría deberse a un incremento en la síntesis y/o transporte de proteínas nucleares o a una mayor estabilidad de estas proteínas. En este sentido, el efecto del 13-cis retinal se asemeja a la estimulación de proteínas intranucleares inducida por el PDGF sobre fibroblastos 3T3 quiescentes, tal como fue descrito por Kellermayer y col. (1984). Por

otro lado, el 13-cis retinal ejerce un efecto transiente y opuesto sobre las proteínas de la fracción soluble y las proteínas liberadas al medio de cultivo. Estas variaciones podrían relacionarse con la distinta capacidad que tienen las células crónicamente tratadas con retinal para dar origen a macrocolonias en agar blando. Luego de 4 meses de tratamiento, el tamaño de las colonias en agar disminuye con respecto al tamaño que presentan las macrocolonias a los 60 días de tratamiento. Este hecho probablemente refleje variaciones en la concentración y calidad de las proteínas liberadas al medio de cultivo.

La estimulación del crecimiento observada como consecuencia del tratamiento de las células con 13-cis retinal se debe a un enriquecimiento en subpoblaciones con menor grado de diferenciación y mayor capacidad proliferativa, a expensas de la disminución en la contribución de las subpoblaciones más diferenciadas (D y F). Estos efectos se acentúan a medida que transcurre el tratamiento (Tabla XII).

Los resultados presentados en la Fig. 27 demuestran que el 13-cis retinal actúa como modulador negativo de la diferenciación, retardando la generación de subpoblaciones diferenciadas a partir de las que presentan mayor capacidad proliferativa (E, A y B). A pesar de los trabajos publicados acerca de los efectos de los derivados de la Vitamina A sobre la diferenciación, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que deben efectuarse ensayos bioquímicos y celulares, incluyendo tratamientos prolongados, antes de poder considerar a los compuestos retinoideos como agentes en la prevención del cáncer. Al respecto cabe agregar que



el uso de estos derivados de la Vitamina A en el tratamiento de pacientes con tumores avanzados no ha resultado auspicioso, tal como comentan Goodman y col., 1982; Kerr y col., 1982 y Clamon y col., 1985.

### 3.2. Efecto de agentes inductores de la diferenciación: DMSO y butirato de sodio

Estos agentes inhiben el crecimiento de las células MCF-7, induciendo cambios morfológicos irreversibles en las células, las cuales adquieren un aspecto más pequeño y oscuro. "Disparan" la diferenciación terminal de forma tal que las células dejan de dividirse y en caso de ser tripsinizadas, pierden la capacidad de adherirse al plástico de las placas de cultivo. Su efecto inductor de la diferenciación se manifiesta porque incrementan la contribución de subpoblaciones más diferenciadas (D y F) a expensas de la disminución en el aporte de las subpoblaciones A y B. Dado que la población de células "stem" no se ve afectada por este tratamiento, cuando se remueven estos compuestos se recupera en parte el crecimiento. La inducción de la diferenciación va acompañada de un mayor contenido de lípidos, teñidos con el colorante oil red O.

Estos resultados coinciden con los descritos por Abe y Kufe (1984a y b; 1986) para la misma línea celular y con los resultados presentados por Graham y Buick (1988) en otras líneas celulares de tumores de mama humanos. Estos autores, además, describen la expresión de marcadores de diferenciación relacionados con el glóbulo de grasa de la leche, como el antígeno DF3, luego del tratamiento de las células con butirato de sodio.

Varios son los efectos que induce el butirato de sodio a nivel del ADN. Giancotti y col. (1988) describieron que el tratamiento de fibroblastos con butirato de sodio resulta en una inhibición de las deacetilasas con aparición de histonas hiperacetiladas que resultan más sensibles a la acción de la DNasa I.

De Haan y col. (1986) describieron que el tratamiento de fibroblastos de pulmón humano WI-38 con este agente inductor de la diferenciación induce hipermetilación del ADN. El sitio clave ("hot spot") de metilación del ADN se encuentra en el cromosoma 11. Utilizando una sonda de calcitonina, que mapea en dicho cromosoma, de Brestos y col. (1988) detectaron cambios en los niveles de metilación del ADN como consecuencia del tratamiento de las células con butirato de sodio. En este momento, en nuestro laboratorio se están efectuando los mismos experimentos con el fin de dilucidar si este mecanismo de acción del butirato de sodio también ocurre en las células MCF-7.

El tratamiento combinado de butirato de sodio con 13-cis retinal resultó particularmente interesante dado que el derivado de la Vitamina A ejerció un efecto protector sobre las células, disminuyendo su sensibilidad al butirato de sodio. Bryant y col. (1986) describieron que el butirato de sodio interfería con los fenómenos de adhesión celular por reducción en el número de receptores de laminina.

Kato y De Luca (1987) demostraron que los derivados de la Vitamina A incrementan la adhesión celular de fibroblastos NIH 3T3, favoreciendo la síntesis de las glicoproteínas involucradas en la interacción con la matriz extracelular. Estos autores obser-

van un incremento en la adhesión celular mediada por laminina y colágeno de tipo IV. Considerando que las células MCF-7 requieren laminina para su adhesión e interacción con la matriz extracelular, puede pensarse que el efecto protector del 13-cis retinal probablemente se deba a que neutraliza los efectos del butirato de sodio a ese nivel. Por otro lado, los efectos inhibitorios del crecimiento inducidos por el butirato de sodio son más dramáticos sobre las células que crecen adheridas a las placas de plástico de cultivo que sobre las células que crecen como agregados multicelulares en suspensión (Fig. 31 a, b y c). En consecuencia, es factible que su acción a nivel de los receptores de laminina sea importante para desencadenar la inhibición del crecimiento.

Abe y Kufe (1986) demostraron que el ácido retinoico disminuye la expresión de antígeno DF3 en células diferenciadas por efecto del butirato de sodio. Estos experimentos conjuntamente con los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que mientras agentes como el DMSO o el butirato de sodio son inductores de la diferenciación, los derivados de la Vitamina A no pueden considerarse agentes protectores contra el cáncer en estas células dado que todos sus efectos están dirigidos a promover la proliferación y neutralizar la diferenciación celular.

### 3.3. Efectos del estradiol

A una dosis de  $10^{-10}$  M, el estradiol indujo un rápido efecto inductor de la diferenciación en las subpoblaciones A, B, C, D y F cultivadas durante 10 días en el medio químicamente definido.

Cuando se ensayó el efecto de esta hormona sobre las sub-

poblaciones quiescentes, sólo las células de las subpoblaciones C y F, con mayor contenido de receptores estrogénicos, respondieron al estímulo estrogénico. Pero si bien estas 2 subpoblaciones celulares fueron las únicas sensibles al efecto del estradiol, la regulación hormonal ocurriría por distintos mecanismos en cada una de ellas dado que la subpoblación C resultó estimulada mientras que en la subpoblación F se inhibió la síntesis de ADN.

El efecto del estradiol sobre la subpoblación E resultó sorprendente dado que no sólo permitió la sobrevivencia de las células en el medio químicamente definido sino que le confirió a las células la capacidad de desprenderse del sustrato de las placas de cultivo y crecer como agregados multicelulares en suspensión. El requerimiento hormonal es transiente y se manifiesta al 10º día de cultivo de las células en el medio libre de suero. Coincidentemente, en ese momento es máxima la expresión de receptores estrogénicos. Al día 13 de cultivo, cuando las células se despegaron de las placas de cultivo, deja de manifestarse el requerimiento estrogénico y concomitantemente, la expresión de receptores estrogénicos decae hasta alcanzar el nivel basal. Con respecto a estos fenómenos, no he encontrado datos semejantes en la bibliografía.

Estas células llevan más de 3 años de cultivo y presentan un crecimiento mucho más agresivo que la línea celular parental. Tienen un crecimiento autócrino dado que no requieren el aporte exógeno de ningún factor de crecimiento y se han cultivado, incluso, en un medio mínimo libre de albúmina, insulina y estrógenos. La mayor velocidad de crecimiento se correlaciona con

un incremento en el porcentaje de subpoblaciones con alta capacidad proliferativa a expensas de la disminución en el aporte de las subpoblaciones D y F.

Esta nueva línea celular es mucho más resistente al efecto del DMSO o del butirato de sodio en relación a las células que crecen en ausencia de suero pero adheridas al sustrato. El tratamiento de las células "stem" con estradiol permitió la obtención de una población celular con un crecimiento más agresivo y asimismo le dio la posibilidad al laboratorio de contar con otro modelo para el estudio de la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células "stem" de tumor de mama humano.

## CONCLUSIONES GENERALES

- El presente trabajo de tesis aporta un sistema experimental que permite obtener en forma aislada y purificada a la célula "stem" y a las diferentes subpoblaciones celulares que componen la jerarquía celular de un tumor o de una línea celular, propuesta por Buick y Pollak en 1984. Este modelo posibilitó el estudio de las características biológicas y bioquímicas de cada una de las subpoblaciones y permitió analizar las modificaciones en la expresión de diversos marcadores de naturaleza proteica y lipídica que acompañan al proceso de diferenciación celular. Se determinó la secuencia de aparición de las subpoblaciones y se planteó un proceso de diferenciación unidireccional. Se analizaron las interacciones existentes entre las subpoblaciones, responsables de que el comportamiento de la línea celular no resulte de la simple adición de las características que presenta cada subpoblación por separado. Se definió el requerimiento hormonal y de factores de crecimiento que manifiesta cada subpoblación cuando se cultiva en forma aislada.
- En este trabajo se propone un medio de cultivo libre de suero, con el aporte de insulina como único factor de crecimiento regulatorio. Se describe el crecimiento de la línea celular en dicho medio químicamente definido y se comprueba que el empleo de suero como suplemento en el medio de cultivo enmascara el fenotipo agresivo de estas células. Este hecho probablemente se deba a que el suero es una mezcla compleja de hormonas y factores promotores e inhibidores del crecimiento que pueden atenuar el metabolismo de las células y/o la actividad que ejerce la insulina sobre esta línea celular.

- Se describe un efecto novedoso para el 13-cis retinal, derivado de la Vitamina A. Dicho efecto consiste en un notable incremento en la síntesis y acumulación de proteínas nucleares en células crónicamente tratadas. A pesar de que algunos grupos de investigación consideran el uso de compuestos retinoideos en la prevención del cáncer, los resultados presentados en este trabajo alertan sobre los peligros de su uso prolongado. Se comprueba además que el 13-cis retinal actúa como modulador negativo de la diferenciación en esta línea celular ya que retarda la aparición de subpoblaciones más diferenciadas a partir de las de mayor capacidad proliferativa y protege a las células del efecto inductor de la diferenciación ejercido por el butirato de sodio.
- Se describe también un efecto novedoso para el estradiol sobre la subpoblación de células "stem" cultivadas durante 10 días en el medio químicamente definido. El aporte hormonal dio origen a la línea celular en suspensión, caracterizada por un crecimiento mucho más agresivo y autócrino, dado que es independiente del aporte exógeno de factores de crecimiento.
- El presente trabajo apoya la hipótesis acerca de que varias proteínas contribuyen al crecimiento autócrino de las células. Actualmente, en el laboratorio se está investigando la presencia de TGF- $\alpha$  en el medio de cultivo condicionado por la célula "stem".

*Saulo P*

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M. y Kufe, D.W.  
(1984)a Breast Cancer Research and Treatment 4:269-274.  
(1984)b Cancer Research 44:4574-4577.  
(1986) J. Cell. Physiol. 126:126-132.
- Adams, S.O., Nissley, S.P., Handwerker, S. y Rechler, M.M.  
(1983) Nature 302:150-153.
- Allegra, J.C. y Lippman, M.E.  
(1978) Cancer Research 38:3823-3829.
- Antoniades, H.N., Scher, C.D. y Stiles, C.D.  
(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1809-1813.
- Ashley, R.L., Cardiff, R.D., Mitchell, D.J., Faulkin, L.J. y Lund, J.K.  
(1980) Cancer Research 40:4232-4242.
- Baker, J.B., Simmer, R.L., Glenn, K.L. y Cunningham, D.D.  
(1979) Nature 278:743-745.
- Barkley Butler, W., Kelsey, W.H. y Goran, N.  
(1981) Cancer Research 41:82-88.
- Barkley Butler, W., Kirkland, W.L., Gargala, T.L., Goran, N., Kelsey, W.H. y Berlinsky, P.J.  
(1983) Cancer Research 43:1637-1641.
- Barkley Butler, W., Berlinsky, P.J., Hillman, R.M., Kelsey, W.H. y Toenniges, M.M.



- (1986) Cancer Research 46:6339-6348.
- Barnes, D. y Sato, G.  
(1979) Nature 281:388-389.  
(1980) Cell 22:649-655.
  - Bartholomew, J.C., Neff, N.T. y Ross, P.A.  
(1976) J. Cell. Physiol. 89:251-258.
  - Baserga, R.  
(1976) Multiplication and Division in Mammalian Cells (Ed. Marcel Dekker, N. York).
  - Beguinot, L., Hanover, J.A., Ito, S., Richert, N.D., Willingham, M.C. y Pastan, I.  
(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2774-2778.
  - Bennett, D.C., Peachley, L.A., Durbin, H. y Rudland, P.S.  
(1978) Cell 15:283-298.
  - Ben-Ze'ev, A.  
(1985) Biochim. et Biophys. Acta 780:197-212.
  - Berridge, M.J.  
(1987) Biochim. et Biophys. Acta 907:33-45.
  - Berridge, M.J. e Irvine, R.F.  
(1984) Nature 312:315-321.
  - Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A. y Katzenellenbogen, B.S.  
(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2496-2500.

- Blumberg, P.M. y Robbins, P.W.  
(1975) Cell 6:137-147.
  
- Boning, W., Kakunaga, T., Emura, M. y Mohr, U.  
(1986) Exptl. Cell Res. 163:255-260.
  
- Bonner, W. y Laskey, R.  
(1974) Eur. J. Biochem. 46:83-88.
  
- Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., Mc.Clure, D.B., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G. y Wu, R.  
(1979) Meth. Enzymol. 58:94-109.
  
- Bravo, A.I., Sorin, I., Guman, N. y Mordoh, J.  
(1985) J. Exp. Clin. Cancer Res. 4:3-9.
  
- Breitman, T.R., Collins, S.J. y Keene, B.R.  
(1981) Blood 57:1000-1004.
  
- Bronzert, D.A., Pantazis, P., Antoniadis, H.N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R.B. y Lippman, M.E.  
(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5763-5767.
  
- Brown, K.D., Blay, J., Irvine, R.F., Heslop, J.P. y Berridge, M.J.  
(1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 123:377-384.
  
- Brugge, J.S., Cotton, P.C., Qeral, A.E., Barret, J.N., Nouner, D. y Keane, R.W.  
(1985) Nature 316:554-557.

- Bryant, G., Haberern, C., Rao, C.N. y Liotta, L.A.  
(1986) Cancer Research 46:807-811.
- Buick, R.N. y Pollak, M.N.  
(1984) Cancer Research 44:4909-4918.
- Calvo, F., Brower, M. y Carney, D.  
(1984) Cancer Research 44:4553-4559.
- Carney, D.H.  
(1983) J. Cell. Physiol. 117:297-307.
- Carney, D.H. y Cunningham, D.D.  
(1978)a Cell 14:811-823.  
(1978)b Cell 15:1341-1349.
- Carney, D.H., Stiernberg, J. y Fenton, J.W.  
(1984) J. Cell. Biochem. 26:181-186.
- Carney, D.H., Scott, D.L., Gordon, E.A. y La Belle, E.F.  
(1985) Cell 42:479-488.
- Carpenter, G. y Cohen, S.  
(1975) J. Cell. Physiol. 88:227-238.  
(1979) Ann. Rev. Biochem. 48:193-216.
- Carpenter, G. y Zendegui, J.G.  
(1986) Exptl. Cell Res. 164:1-10.
- Cassel, D.  
(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6224-6228.

- Cassidy, J., Lippman, M.E., Lacroix, A., Peck, G. y Ozols, R.  
(1981) Am. Soc. Clin. Oncol. 22:424
  
- Cifone, M. y Fidler, I.J.  
(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6249-6252.
  
- Clair, T., Miller, W.R. y Cho-Chung, Y.S.  
(1987) Cancer Research 47:5290-5293.
  
- Clamon, G., Chabot, G.G., Valeriote, F., Davilla, E., Vogel, C.,  
Gorowski, E. y Birch, R.  
(1985) Cancer Research 45:1874-1878.
  
- Clemmons, D.R., Underwood, L.E. y Van Wyk, J.J.  
(1981) J. Clin. Invest. 67:10-19.
  
- Cochran, B.H., Zullo, J., Verma, I.M. y Stiles, C.D.  
(1984) Science 226:1080-1082.
  
- Cochet, C., Gill, G.N., Meisenhelder, J., Cooper, J.A. y Hunter,  
T.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:2553-2558.
  
- Cockerfoot, S. y Gomperts, B.D.  
(1985) Nature 314:534-536.
  
- Cohen, S.  
(1962) J. Biol. Chem. 237:1555-1562.
  
- Cohen, S. y Carpenter, G.  
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1317-1321.

- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. y Gallo, R.C.  
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2458-2462.
- Chalbos, D.F., Vignon, I., Keydar, D. y Rochefort, H.  
(1982) J. Clin. Endocrinol. Metab. 55:276-283.
- Chen, L.B. y Buchanan, J.M.  
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:131-135.
- Cherington, P.V. y Pardee, A.B.  
(1980) J. Cell. Physiol. 105:25-32.
- Cherington, P.V., Smith, B.L. y Pardee, A.B.  
(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3937-3941.
- Childs, C.B., Proper, J.A., Tucker, R.F. y Moses, H.L.  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5312-5316.
- Chinkers, M. y Garbers, D.L.  
(1986) J. Biol. Chem. 261:8295-8297.
- Cotton, P.C. y Brugge, J.S.  
(1983) Mol. Cell. Biol. 3:1157-1162.
- Darbe, P., Yates, J., Curtis, S. y King, R.J.B.  
(1983) Cancer Research 43:349-354.
- Darbe, P., Curtis, S. y King, R.J.B.  
(1984) Cancer Research 44:2790-2793.
- Davis, R.J. y Czech, M.P.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:8545-8549.

- (1985)a Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1974-1978.
- (1985)b Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4080-4084.
- (1985)c Growth Factors and Transformation. Cold Spring Harbor. Vol. 3.
- (1986) Biochem. J. 233:435-441.
- Davis, J.S., Weakland, L.L., Weiland, D.A., Farese, R.V. y West, L.A.  
(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3728-3732.
- De Bortoli, M.E., Abou-Issa, H., Haley, B.E. y Cho-Chung, Y.S.  
(1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:699-706.
- Deeks, S., Richards, J. y Naudi, S.  
(1988) Exptl. Cell Res. 174:448-460.
- de Brestros, A., Nelkin, B.D., Silverman Ehrlich, G., Poiesz, B. y Baylin, S.  
(1988) PNAS 85:5693-5697.
- de Haan, J.B., Gevers, W. e Iqbal Parker, M.  
(1986) Cancer Research 46:713-716.
- De Larco, J.E. y Todaro, G.J.  
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4001-4005.  
(1980) J. Cell. Physiol. 102:267-277.
- D'Ercole, A.J., Stiles, C.D. y Underwood, L.E.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:935-939.
- Devare, S.G., Reddy, E.P., Law, J.D., Robbins, K. y Aaronson, S.A.

- (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:731-735.
- Dexter, D.L. y Calabresi, P.  
(1982) Biochim. et Biophys. Acta 695:97-112.
  - Dexter, D.L., Kowalski, H.M., Blazar, M.A., Fliegel, Z., Volger, R. y Heppner, G.H.  
(1978) Cancer Research 38:3174-3181.
  - Dickson, R.B., Bates, S.E., McManaway, M.E. y Lippman, M.E.  
(1986) Cancer Research 46:1707-1713.
  - Dickson, R.B., Huff, K.K., Spencer, E.M. y Lippman, M.E.  
(1986) Endocrinology 118:138-142.
  - Dickson, R.B., Kasid, A., Huff, K.K., Bates, S.E., Knabbe, C., Bronzert, D., Gelman, E.P. y Lippman, M.E.  
(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:837-841.
  - Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K., Aaronson, S.A. y Antoniades, H.N.  
(1983) Science 221:275-277.
  - Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scarce, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. y Waterfield, M.D.  
(1984) Nature 307:521-527.
  - Downward, J., Waterfield, M.D. y Parker, P.J.  
(1985) J. Biol. Chem. 260:14538-14546.
  - Dubrow, R., Riddle, V.G.H. y Pardee, A.B.  
(1979) Cancer Research 39:2718-2726.

- Dulbecco, R.  
(1970) Nature 227:802-806.
- Elder, P.K., Schmidt, L.J., Ono, T. y Getz, M.J.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7476-7480.
- Espinal, J.  
(1987) Nature 328:574-575.
- Ek, B. y Heldin, C-H.  
(1982) J. Biol. Chem. 257:10486-10491.
- Fabbro, D., Kung, W., Roos, W., Regazzi, R. y Eppenberger, U.  
(1986) Cancer Research 46:2720-2725.
- Farese, R.V., Kuo, J.Y., Babishkin, J.S. y Davis, V.S.  
(1986) J. Biol. Chem. 261:8589-8592.
- Fearn, J.C. y King, A.C.  
(1985) Cell 40:991-1000.
- Feher, I. y Giraldi, J.  
(1974) Nature 247:550-551.
- Fidler, I.J. y Hart, I.R.  
(1985) Cancer, Principles and Practice of Oncology (De Vita, V.T. et al., Eds.) 2nd. Edition, p. 113-150, J.B., Lippincott Company, Philadelphia.
- Fidler, I.J. y Kripke, M.L.  
(1977) Science 197:893-895.



- Fitzpatrick, S.L., La Chance, M.P. y Schultz, G.S.  
(1984) Cancer Research 44:3442-3447.
- Fleischman, L.F., Chahwala, S.B. y Cantley, L.  
(1986) Science 231:407-410.
- Frackelton, A.J.Jr., Tremble, P.M. y Williams, L.T.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:7909-7915.
- Franke, W.W., Luder, M.R., Kartenbecke, J., Zerban, H. y Keenan, T.W.  
(1976) J. Cell. Biol. 69:173-176.
- Friedman, B.A., Frackelton, A.J.Jr., Ross, A.H., Connors, J.M., Fujiki, H., Sugimura, T. y Rosner, M.R.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3034-3038.
- Friend, C., Scher, W., Holland, J.C. y Soto, T.  
(1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:378-382.
- Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. y Sporn, M.B.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:10995-11000.
- Furlanetto, R.W. y DiCarlo, J.N.  
(1984) Cancer Research 44:2122-2128.
- Furth, M.E., Davis, L.J., Fleurdelys, B. y Scolnick, E.M.  
(1982) J. Virol. 43:294-304.
- Garin Chesa, P., Rettig, W.J., Melamed, M.R., Old, L.J. y Niman, H.L.  
(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3234-3238.

- Gendler, S.J., Dermer, G.B., Silverman, L.M. y Tokes, Z.A.  
(1982) Cancer Research 42:4567-4573.
- Giacotti, V., Pani, B., D'Andrea, P. y Symmons, P.  
(1988) Exptl. Cell Res. 174:34-40.
- Glenn, K.C., Carney, D.H., Fenton, J.W. y Cunningham, D.D.  
(1980) J. Biol. Chem. 255:6609-6616.
- Gold, E., Metelsman, R., Moore, M.H. y Clarckson, B.D.  
(1981) Blood 58:139.
- Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. y Brown, M.S.  
(1979) Nature 279:679-685.
- Gómez, M.L., Medrano, E.E., Cafferata, E.G.A. y Téllez-Iñón, M.T.  
(1988) Exptl. Cell Res. 175:74-80.
- Goodman, G.E., Einspahr, J.G., Alberts, D.S., Davis, T.P., Leigh, S.A., Chen, H.S. y Meyskens, F.L.  
(1982) Cancer Research 42:2087-2091.
- Gospodarowicz, D., Brown, K.D., Birdwell, C.R. y Zetter, B.R.  
(1978) J. Cell. Biol. 77:774-788.
- Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D. y Moses, H.L.  
(1986) Cancer Research 46:1015-1029.
- Graham, K.A., Richardson, C.L., Minden, M.D., Trent, J.M. y Buick, R.N.  
(1985) Cancer Research 45:2201-2205.

- Graham, K.A. y Buick, R.N.  
(1988) J. Cell. Physiol. 136:63-71.
- Greenberg, M.E. y Ziff, E.B.  
(1984) Nature 311:433-438.
- Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A., King, W.C., Nist, C., Mitchell, C.D. y Ross, R.  
(1981) J. Biol. Chem. 256:1232-1233.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, H.L. y Gardner, M.B.  
(1977) J. Natl. Cancer Inst. 58:1795-1806.
- Hager, J., Fliegel, S., Stanley, W., Richardson, A.M. y Heppner, G.H.  
(1981) Cancer Research 41:1293-1300.
- Ham, R.G.  
(1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288-293.
- Ham, R.G. y McKeehan, W.L.  
(1979) Meth. Enzymol. 58:44-93.
- Hamburger, A.W. y Salmon, S.E.  
(1977) Science 197:461-463.
- Hammond, S.L., Ham, R.G. y Stampfer, M.R.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5435-5439.
- Hayashi, I. y Sato, G.  
(1976) Nature 259:132-134.

- Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Suzuki, S. y Ruoslahti, E.  
(1985) *Exptl. Cell Res.* 160:245-258.
- Heldin, C-H. y Westermark, B.  
(1984) *Cell* 37:9-20.
- Heldin, C-H., Betsholtz, C., Claesson-Welsh, L. y Westermark, B.  
(1987) *Biochim. et Biophys. Acta* 907:219-244.
- Heppner, G.H.  
(1984) *Cancer Research* 44:2259-2265.
- Heppner, G.H., Miller, B.E. y Miller, F.R.  
(1984) *Biochim. et Biophys. Acta* 695:215-226.
- Herman, B. y Pledger, W.J.  
(1985) *J. Cell. Biol.* 100:1031-1040.
- Hesketh, T.R., Moore, J.P., Morris, J.D.H., Taylor, M.V.,  
Rogers, J., Smith, G.A. y Metcalfe, J.C.  
(1985) *Nature* 313:481-484.
- Hiragun, A., Sato, M. y Mitsui, H.  
(1983) *Exptl. Cell Res.* 145:71-78.
- Hiragun, A., Yoshida, Y., Sato, M., Tominaga, T. y Mitsui, H.  
(1985) *J. Natl. Cancer Inst.* 75:471-482.
- Hollenberg, M.D. y Cuatrecasas, P.  
(1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2964-2968.
- Holley, R.W.  
(1975) *Nature* 258:487-490.

- Holley, R.W. y Kiernan, J.A.  
(1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60:300-304.  
(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:2908-2911.
  
- Holley, R.W., Baldwin, J.H., Kiernan, J.A. y Messmer, T.O.  
(1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3229-3232.
  
- Horan-Hand, P., Thor, A., Wunderlich, D., Murano, R., Caruso, A.  
y Schlom, J.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5227-5231.
  
- Horwitz, K.B., Koseki, Y. y Mc.Guire, W.L.  
(1978) Endocrinology 103:1742-1751.
  
- Huff, K.K., Kaufman, D., Gabbay, K., Lippman, M.E., Spencer,  
E.M. y Dickson, R.B.  
(1986) Cancer Research 46:4613-4619.
  
- Huff, K.K., Knabbe, C., Kaufman, D., Gabbay, K., Lippman, M.E. y  
Dickson, R.B.  
(1987) J. Cell. Biochem. Suppl. 11A, 28 (abstract).
  
- Human Gene Mapping 8 - 8th International Workshop on Human Gene  
Mapping.  
(1985) Cytogenet. Cell Genet. 40:1-4.
  
- Hunter, T.  
(1986) Nature 322:14-16.
  
- Hunter, T. y Cooper, J.A.  
(1981) Cell 24:741-752.  
(1985) Ann. Rev. Biochem. 54:897-930.

- Hunter, T., Ling, N. y Cooper, J.A.  
(1984) Nature 311:480-483.
  
- Huseby, R.A., Maloney, T.M. y Mc.Grath, C.M.  
(1984) Cancer Research 44:2654-2659.
  
- Ikeda, T., Danielpour, D. y Sirbasku, S.A.  
(1984) Progress in Cancer Research and Therapy (Bresciani et al., Eds.) Vol. 31, p. 117-183, Raven Press, N. York.
  
- Imagawa, W., Tomaoka, Y. y Naudi, S.  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4074-4077.
  
- Imai, Y., Leung, C.K.H., Friesen, H.G. y Shin, R.P.C.  
(1982) Cancer Research 42:4394-4398.
  
- Isaacs, J.T., Wake, N., Coffey, D.S. y Sandberg, A.A.  
(1982) Cancer Research 42:2353-2361.
  
- ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature.  
(1978) Birth defects: Original Article Series, Vol. XIV, N° 8  
(National Foundation, N. York).  
(1978) Cytogenet. Cell Genet. 21:309-404.
  
- Iwashita, S. y Fox, C.F.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:2559-2567.
  
- James, R. y Bradshaw, R.A.  
(1984) Ann. Rev. Biochem. 53:259-292.
  
- Jetten, A.M.  
(1984) Federation Proc. 43:134-139.

- Jetten, A.M., Gilmer, T.M. y Barrett, J.C.  
(1985) Proceedings of AACR 26:60.
- Jiménez de Ansúa, L., Clingan, D. y Rudland, P.S.  
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2724-2728.
- Jiménez de Ansúa, L., Richmond, K.M.V., O'Farrell, M.K., Otto, A.M., Kubler, A.M. y Rudland, P.S.  
(1979) Hormones and Cell Culture Cold Spring Harbor Conferences in Cell Proliferation - Vol. 6.
- Jiménez de Ansúa, L., Richmond, V. y Otto, A.M.  
(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1004-1008.
- Jozan, S., Moure, C., Gillois, M. y Bayard, F.  
(1979) J. Steroid Biochem. 10:341-342.
- Jozan, S., Tournier, J.F., Tauber, J.P. y Bayard, F.  
(1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:1566-1570.
- Kahn, P. y Shin, S-I.  
(1979) J. Cell. Biol. 82:1-16.
- Karey, K.P. y Sirbasku, D.A.  
(1988) Cancer Research 48:4083-4092.
- Kasuga, M., Van Obberghen, E., Nissley, S.P. y Rechler, M.M.  
(1981) J. Biol. Chem. 256:5305-5308.
- Kato, S. y De Luca, L.M.  
(1987) Exptl. Cell Res. 173:450-462.

- Katzenellenbogen, B.S., Kendra, K.L., Norman, J. y Berthois, Y.  
(1987) Cancer Research 47:4355-4360.
  
- Kellermayer, M., Prestayko, A.W. y Hazlewood, C.F.  
(1984) Exptl. Cell. Res. 152:255-259.
  
- Kelly, K.  
(1985) Nature 317:390.
  
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. y Leder, P.  
(1983) Cell 35:603-610.
  
- Kerr, I.G., Lippman, M.E., Jenkins, J. y Myers, C.E.  
(1982) Cancer Research 42:2069-2073.
  
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcick, S. y Brenner, H.J.  
(1979) Eur. J. Cancer 15:659-670.
  
- King, C.S. y Cooper, J.A.  
(1986) J. Biol. Chem. 261:10073-10078.
  
- Kitada, S. y Hays, E.F.  
(1985) Cancer Research 45:3537-3540.
  
- Knabbe, C., Lippman, M.E., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Kasid, A., Derynck, R. y Dickson, R.B.  
(1987) Cell 48:417-428.
  
- Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T. y Verma, I.M.  
(1984) Nature 312:711-716.



- Kufe, D.W., Nadler, L., Sargent, L., Shapiro, H., Hand, P., Austin, F., Colcher, D. y Schlom, J.  
(1983) Cancer Research 43:851-857.
- Lacroix, A. y Lippman, M.E.  
(1981) J. Clin. Invest. 65:586-591.
- Laemmlí, U.K.  
(1970) Nature 227:680-685.
- L'Allemain, G., Paris, S. y Pouysségur, J.  
(1984) J. Biol. Chem. 259:5809-5815.
- L'Allemain, G., Paris, S., Magnaldo, I. y Pouysségur, J.  
(1986) J. Cell. Physiol. 129:167-174.
- Laskey, R. y Mills, A.  
(1977) FEBS Letters 82:314-316.
- Lechner, J.F.  
(1984) Federation Proc. 43:116-120.
- Leder, A. y Leder, P.  
(1975) Cell 5:319-322.
- Lee, E., Barcellos-Hoff, M.H., How Chen, L., Parry, G. y Bissell, M.J.  
(1987) In Vitro Cell and Develop. Biol. 23:221-226.
- Lee, L.S. y Weinstein, I.B.  
(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5168-5172.

- Leof, E.B., Wharton, W., Van Wyk, J.J. y Pledger, W.J.  
(1982) *Exptl. Cell Res.* 141:107-115.
- Leof, E.B., Van Wyk, J.J., O'Keefe, E.J. y Pledger, W.J.  
(1983) *Exptl. Cell Res.* 147:202-208.
- Linebaugh, B.E. y Rillema, J.A.  
(1982) *Biochim. et Biophys. Acta* 720:346-355.
- Litosch, I., Wallis, C. y Fain, J.N.  
(1985) *J. Biol. Chem.* 260:5464-5471.
- Lotan, R.  
(1979) *Cancer Research* 39:1014-1019.  
(1980) *Biochim. et Biophys. Acta* 605:33-91.
- Low, D.A., Welley, H.S. y Cunningham, D.D.  
(1985) *Growth Factors and Transformation*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.  
(1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lyman, G.H., Preisler, H.D. y Papahadjopoulos, D.  
(1976) *Nature* 262:360-363.
- Mackillop, W.J. y Buick, R.N.  
(1981) *Stem Cells* 1:355-366.
- Mackillop, W.J., Ciampi, A., Till, J.E. y Buick, R.N.  
(1983) *J. Natl. Cancer Inst.* 70:9-16.

- Macphee, C.H., Drummond, A.H., Otto, A.M. y Jiménez de Ansúa, L.  
(1984) J. Cell Physiol. 119:35-40.
  
- Marshall, C.J.  
(1987) Cell 49:723-725.
  
- Martin, R.G. y Stein, S.  
(1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1655-1659.
  
- Massagüe, J. y Czech, M.P.  
(1982) J. Biol. Chem. 257:5038-5045.
  
- Massagüe, J. y Like, B.  
(1985) J. Biol. Chem. 260:2636-2645.
  
- Matrisian, L.M., Glaichehans, N., Gesnel, M.C. y Breatchnach, R.  
(1985) EMBO J. 4:1435-1440.
  
- Mc.Grath, C.M. y Soule, H.D.  
(1983) J. Cell. Physiol. 116:385-396.
  
- Mc.Grath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V. y Levinson, A.D.  
(1984) Nature 310:644-649.
  
- Medrano, E.E., Cafferata, E.G.A. y Larcher, F.  
(1987) Exptl. Cell Res. 172:354-364.
  
- Miller, F.R. y Heppner, G.H.  
(1980) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 21:201.
  
- Miller, B.E., Miller, F.R., Leith, J. y Heppner, G.H.  
(1980) Cancer Research 40:3977-3981.

- Miller, B.E., Miller, F.R. y Heppner, G.H.  
(1981) Cancer Research 41:4378-4381.
  
- Miller, B.E., Roi, L.D., Howard, L.M. y Miller, F.R.  
(1983) Cancer Research 43:4102-4107.
  
- Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.H. y De Laat, S.W.  
(1984)a J. Biol. Chem. 259:7563-7569.  
(1984)b J. Biol. Chem. 259:8066-8069.
  
- Moolenaar, W.H., Aerts, R.J., Tertoolen, L.G.H. y De Laat, S.W.  
(1986) J. Biol. Chem. 261:279-284.
  
- Mori, K., Kurobe, M., Furukawa, S., Kubo, K. y Hayashi, K.  
(1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136:300-305.
  
- Morisett, M., Capony, F. y Rochefort, H.  
(1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:102-109.
  
- Moses, H.L., Proper, J.A., Volkenant, M.E., Wells, D.J. y Getz, M.J.  
(1978) Cancer Research 38:2807-2812.
  
- Moses, H.L., Tucker, R.F., Leof, E.B., Coffey, R.J.Jr., Halper, J. y Shipley, G.D.  
(1985) Growth Factors and Transformation - Cancer Cells, vol. 3, Cold Spring Harbor, N. York; pp. 65-71.
  
- Mulcahy, L.S., Smith, M.R. y Stacey, D.W.  
(1985) Nature 313:241-243.
  
- Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. y Curran, T.  
(1984) Nature 312:716-720.

- Neal Burnette, W.  
(1981) Anal. Biochem. 112:195-203.
  
- Newmark, P.  
(1985) Nature 317:380.
  
- Nicolson, G.L., Lembo, T.M. y Welch, D.R.  
(1988) Cancer Research 48:399-404.
  
- Nishimura, J., Huang, J.S. y Deuel, T.F.  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4303-4308.
  
- Nishizuka, Y.  
(1984) Nature 308:693-698.
  
- O'Farrell, P.H.  
(1975) J. Biol. Chem. 250:4007-4021.
  
- O'Farrell, M.K., Clingan, D., Rudland, P.S. y Jiménez de Ansúa, L.  
(1979) Exptl. Cell Res. 118:311-321.
  
- Ohuchi, N., Thor, A., Page, D.L., Horan Hand, P., Halter, S.A. y Schlom, J.  
(1986) Cancer Research 46:2511-2519.
  
- O'Keefe, E.J. y Pledger, W.J.  
(1983) Mol. Cell. Endocrinology 31:167-186.
  
- Osborne, C.K., Bolan, G., Mónico, M.E. y Lippman, M.E.  
(1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:4536-4540.

- Osborne, C.K., Mōnaco, M.E. y Lippman, M.E.  
(1976) Diabetes 25 (Suppl. 1):380.
- Osborne, C.K., Hamilton, B, Titus, G. y Livingston, R.B.  
(1980) Cancer Research 40:2361-2366.
- Osborne, C.K., Hamilton, B. y Nover, M.  
(1981) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 22:4.
- Osborne, C.K., Boldt, D.H. y Estrada, P.  
(1984) Cancer Research 44:1433-1439.
- Otto, A.M., Nielsen-Hamilton, M., Boss, B.D., Ulrich, M.O. y Jimēnez de Ansúa, L.  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4992-4996.
- Page, M.J., Field, J.K., Everett, N.P. y Green, C.D.  
(1983) Cancer Research 43:1244-1250.
- Papendorp, J.H., Schatz, R.W., Soto, A.M. y Sonnenschein, C.  
(1985) J. Cell Physiol. 125:591-595.
- Pardee, A.B.  
(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1286-1290.  
(1987)a Cancer Research 47:1488-1491.  
(1987)b J. Cell Physiol. Suppl. 5:107-110.
- Paris, S. y Pouyssēgur, J.  
(1986) EMBO J. 5:55-60.
- Paulsson, Y., Hammacher, A., Haldin, C.-H. y Westermark, B.  
(1987) Nature 328:715-717.

- Perdue, J.F., Lubensky, W., Kivity, E., Sonder, S.A. y Fenton, J.W.  
(1981) J. Biol. Chem. 256:2767-2776.
- Peres, R., Betsholtz, C., Westermark, B. y Heldin, C-H.  
(1987) Cancer Research 47:3425-3429.
- Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. y Scher, C.D.  
(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4481-4485.  
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2839-2843.
- Podhajcer, O.L., Bravo, A.I., Sorín, I., Guman, N., Cerdeiro, R. y Mordoh, J.  
(1986) Cancer 58:720-729.
- Pouysségur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G. y Paris, S.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4833-4837.
- Preiss, J., Loumis, C.R., Bishop, W.R., Stein, R., Niedel, J.E. y Bell, R.M.  
(1986) J. Biol. Chem. 261:8597-8600.
- Puricelli, L., Vidal, M. del C., Bal de Kier Joffé, E. y Colombo, L.L.  
(1984) J. Exp. Clin. Cancer Res. 3:175-184.
- Raben, D.M., Yasuda, K.M. y Cunningham, D.D.  
(1987) J. Cell Physiol. 130:468-473.
- Rechler, M.M., Zapf, J., Nissley, S.P., Froesch, E.R., Moses, A.C., Podskalny, J.M., Schelling, E.E. y Humbel, P.C.

- (1980) *Endocrinology* 107:451.
- Rillema, J.A.  
(1975) *Nature* 253:466-467.
- Rinderknecht, E. y Humbel, R.E.  
(1978)a *J. Biol. Chem.* 253:2719-2726.  
(1978)b *FEBS Letters* 89:283-288.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stein, D.F. y Sporn, M.B.  
(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:119-123.
- Robinson, J.H. y Smith, J.A.  
(1976) *J. Cell. Physiol.* 89:111-122.
- Rodríguez-Peña, A. y Rozengurt, E.  
(1985) *EMBO J.* 4:71-76.
- Roos, E.  
(1984) *Biochim. et Biophys. Acta* 738:263-284.
- Rose, S.P., Pruss, R.M. y Herschman, H.R.  
(1975) *J. Cell. Physiol.* 86:593-598.
- Ross, J., Ikawa, Y. y Leder, P.  
(1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:3620-3623.
- Ross, R., Raines, E.W. y Bowen-Pope, D.F.  
(1986) *Cell* 46:155-159.
- Rosen, O.M.  
(1987) *Science* 237:1452-1458.



- Roth, R.A., Maddux, B., Wong, K.Y., Styne, D.M., Van Vliet, G., Humbel, R.E. y Goldfine, I.D.  
(1983) Endocrinology 112:1865-1867.
  
- Rozengurt, E.  
(1986) Science 234:161-166.
  
- Rozengurt, E., Stroobant, P., Waterfield, M.D., Deuel, T.F. y Keehan, M.  
(1983) Cell 34:265-272.
  
- Rudland, P.S., Gusterson, B.A., Hughes, C.M., Ormerod, E.J. y Warburton, M.J.  
(1982) Cancer Research 42:5196-5208.
  
- Ruggiero, M. y Lapetina, E.C.  
(1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 131:1198-1205.
  
- Sachs, L.  
(1987) Cancer Research 47:1981-1986.
  
- Sager, R. y Kovak, P.  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:480-484.
  
- Salomon, D.S., Zwiebel, J.A., Bano, M., Losonczy, I., Fehnel, P. y Kidwell, W.R.  
(1984) Cancer Research 44:4069-4077.
  
- Scher, C.D., Pledger, W.J., Martin, D., Antoniades, H.N. y Stiles, C.D.  
(1978) J. Cell. Physiol. 97:371-380.

- Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R.E. y Froesch, E.R.  
(1982) Nature 296:252-253.
- Seabright, M.  
(1971) Lancet 2:971-972.
- Shafie, S.M.  
(1980) Science 209:701-702.
- Shibata, V. y Taylor-Papadimitriou, J.  
(1981) Int. J. Cancer 28:447.
- Shields, R.  
(1978) Nature 272:670-671.
- Shipley, G.D., Childs, C.B., Volkenant, M.E. y Moses, H.L.  
(1984) Cancer Research 44:710-716.
- Shin, S-I., Freedman, V.H., Risser, R. y Pollack, R.  
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:4435-4439.
- Shoyab, M., De Larco, J.E. y Todaro, G.J.  
(1979) Nature 279:387-391.
- Sirbasku, D.A.  
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3786-3790.
- Smith, A. y Martin, L.  
(1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:1263-1267.
- Smith, H.S.  
(1979) J. Natl. Cancer Inst. 62:225-230.

- Smith, H.S., Wolman, S.R. y Hackett, A.J.  
(1984) *Biochim. et Biophys. Acta* 738:103-123.
  
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. y Brennan, M.  
(1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1409-1415.
  
- Sporn, M.B. y Roberts, A.B.  
(1983) *Cancer Research* 43:3034-3040.  
(1985) *Nature* 313:745-747.
  
- Sporn, M.B. y Todaro, G.J.  
(1980) *N. England J. Med.* 303:878-880.
  
- Stacey, D.W., De Gudicibus, S.R. y Smith, M.R.  
(1987) *Exptl. Cell Res.* 171:232-242.
  
- Stevens, M.S., Aliabadi, Z. y Moore, M.R.  
(1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:132-138.
  
- Stiles, C.D.  
(1983) *Cell* 33:653-655.  
(1985) *Cancer Research* 45:5215-5218.
  
- Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J. y Pledger, W.J.  
(1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1279-1283.
  
- Stoker, M.G.P.  
(1973) *Nature* 246:200-203.
  
- Stoscheck, C.M. y King, L.E.Jr.  
(1986) *Cancer Research* 46:1030-1037.

- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y Schultz, I.  
(1983) Nature 306:67-69.
- Strickland, S. y Mahdavi, V.  
(1978) Cell 15:393-403.
- Stuart, C.A., Pietrzyk, R., Sin, A.K.Q. y Furlanetto, R.W.  
(1984) J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:90-96.
- Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. y Marks, P.  
(1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1003-1006.
- Temin, H.M.  
(1971) J. Cell. Physiol. 78:161-170.
- Thor, A., Horan-Hand, P., Wunderlich, D., Caruso, A., Murano, R. y Schlom, J.  
(1984) Nature 311:562-565.
- Thorpe, S.M.  
(1987) Cancer Research 47:6572-6575.
- Till, J.E. y Mc.Culloch, E.A.  
(1980) Biochim. et Biophys. Acta 605:431-459.
- Todaro, G., Lazar, G.K. y Green, H.  
(1965) J. Cell and Comp. Physiol. 66:325-334.
- Tsao, D., Morita, A., Bella, A., Lvu, P. y Kim, Y.  
(1982) Cancer Research 42:1052-1058.

- Tucker, R.F., Branum, E.L., Shipley, G.D., Ryan, R.J. y Moses, H.L.  
(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6157-6161.
- Vaheri, A., Ruoslahti, E., Hovi, T. y Nordling, S.  
(1973) J. Cell. Physiol. 81:355-364.
- Veldhuis, J.D. y Garmey, J.  
(1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:112-117.
- Viola, M.V., Fromovitz, F., Oravey, S., Deb, S. y Schlom, J.  
(1985) J. Exp. Med. 161:1213-1218.
- Viola, M.V., Fromovitz, F., Oravey, S., Deb, S., Finkel, G., Lundy, J., Horan-Hand, P., Thor, A. y Schlom, J.  
(1986) N. Engl. J. Med. 314:133-137.
- Walker, R.  
(1980) J. Clin. Pathol. 33:356-360.
- Wang, N., Yu, S.H., Liener, I.E., Hebbel, R.P., Eaton, J.W. y Mc.Khann, C.F.  
(1982) Cancer Research 42:1046-1051.
- Waterfield, M.D., Serase, G.T., Whittle, N., Stoobant, P., Johnson, A., Wasteson, A., Heldin, C-H., Huang, H.S. y Deuel, T.F.  
(1983) Nature 304:35-39.
- Whang-Peng, J., Lee, E.C., Kao-Shan, C-S., Seibert, K. y Lippman, M.E.  
(1983) J. Natl. Cancer Inst. 71:687-695.

- Wiesenthal, L.M. y Lippman, M.E.  
(1985) Cancer Treat. Rep. 69:615-632.
- Willingham, M.C., Pastan, I., Shih, T-Y. y Scolnick, E.M.  
(1980) Cell 22:1005-1014.
- Wolbach, S.B. y Howe, P.R.  
(1925) J. Exp. Med. 42:753-777.
- Wolfman, A. y Macara, I.G.  
(1987) Nature 325:359-361.
- Woodruff, M.F.A.  
(1983) Br. J. Cancer 47:589-594.
- Yamada, M. y Olden, K.  
(1978) Nature 275:179-184.
- Yang, N.S., Soule, H.D. y Mc.Grath, C.M.  
(1977) J. Natl. Cancer Inst. 59:1357-1367.
- Young, D.V., Cox, F.W., Chipman, S. y Hartman, S.C.  
(1979) Exptl. Cell Res. 118:410-414.
- Yu, C.L., Tsai, M.H. y Stacey, D.W.  
(1988) Cell 52:63-71.
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, Barbacid, M.  
(1985) Nature 315:382-385.
- Zetter, B.R., Sun, T.T., Chen, L.B. y Buchanan, J.M.  
(1977) J. Cell. Physiol. 92:233-240.

- Zwiebel, J.A., Davis, M.R., Khon, E., Salomon, D.S. y Kidwell,  
W.R.

(1982) Cancer Research 42:5117-5125.