

Tesis de Posgrado

Regulación del crecimiento tumoral a través del sistema inmune

Eijan, Ana María

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Eijan, Ana María. (1989). Regulación del crecimiento tumoral a través del sistema inmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2257_Eijan.pdf

Cita tipo Chicago:

Eijan, Ana María. "Regulación del crecimiento tumoral a través del sistema inmune". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2257_Eijan.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

REGULACION DEL CRECIMIENTO TUMORAL A TRAVES DEL SISTEMA INMUNE

AUTORA

ANA MARIA EIJAN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

LUGAR DE TRABAJO: DPTO. DE INVESTIGACIONES
INSTITUTO DE ONCOLOGIA "ANGEL H. ROFFO"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1989

- 2257 -
Ej: 2.

No es mi obligación entregar
a los demás lo objetivamente
mejor, sino lo mio, tan pura
y sinceramente como sea po-
sible.

HERMANN HESSE

Dedico esta Tesis a Hugo que es mi compañero incondicional
y a mis padres que fueron los responsables de mi formación.

Agradezco

A la Dra. Sara Oisgold-Dagá bajo cuya dirección me inicié en la investigación científica, con la cual realicé numerosos trabajos en colaboración.

A la Dra. Eugenia S. de Lustig por su invariable dedicación para la corrección de la presente Tesis.

Al CONICET que me permitió a través del otorgamiento y renovación de becas, llevar a cabo la presente investigación.

A la Universidad de Buenos Aires que apoyó esta investigación con subsidios.

Al personal del bioterio por su desinteresada colaboración.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

- SRE: Sistema retículo endotelial.
- IL1: Interleuquina 1.
- IL2: Interleuquina 2.
- MIF: Factor de inhibición de la migración de macrófagos.
- TNF: Factor necrótico tumoral.
- IFN: Interferón.
- BCGF: Factor de crecimiento de las células B.
- ETB: Ratones portadores de tumor chico.
- ATB: Ratones portadores de tumor grande.
- ETR: Ratones ex-portadores de tumor chico.
- ATR: Ratones ex-portadores de tumor grande.
- BN: Ratones normales.
- So: Sobrenadantes de esplenocitos.
- SFB: Suero fetal bovino.
- s.c.: Subcutáneo.
- i.p.: Intra peritoneal.
- FE: Factor exacerbador.
- SoS13: Sobrenadante de células tumorales S13.
- ExS13: Extracto de tejido tumoral S13
- ExON: Extracto de órganos normales
- anti thy: Suero contra linfocitos thy1,2
- C': Complemento.
- PBS: Buffer fosfato salina pH: 7,2.
- Vo: Volumen muerto.

Vt: Volumen total.

KD: Kilo Dalton.

PM: Peso molecular.

F1: Primera fracción proteica que eluye de una columna de Sephadex G-100 con el V_0 .

F2: Segunda fracción que eluye de la columna de Sephadex G-100 con muy bajo contenido proteico.

F3: Tercera fracción proteica que eluye de la columna de Sephadex G-100.

LIA: Angiogénesis inducida por linfocitos.

S-LIA: Angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos.

MCA: Membrana corioalantoidea de embrión de pollo.

FGF: Fibroblastos growth factor.

ECGF: Factores de crecimiento de células endoteliales.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

TGF: Factores de crecimiento transformantes.

PDGF: Factor de crecimiento de plaquetas.

TAF: Factor angiogénico tumoral.

Ag: Antígeno.

Ab: Anticuerpo.

CIC: Complejos inmunes circulantes.

PEG: Polietilén glicol.

Fc: Fracción cristalizable de las Ig.

ΔD_{450} : Diferencia de densidades ópticas a 450 nm.

FN: Fibronectina.

ME: Matriz extracelular.

TEF: Factor de exaltación de transformación.

K: Constante de disociación.

Anti-SoBN: Suero inmune en conejo contra el SoBN.

Anti-SoETB: Suero inmune en conejo contra el SoETB.

Anti-SoATB: Suero inmune en conejo contra el SoATB.

SCN: Suero de conejo normal.

CFA: Coadyuvante completo de Freund

INDICE GENERAL

| | | |
|------|--|-----|
| 1. | INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1. | Tolerancia Inmunológica..... | 3 |
| 1.2. | Inmunoselección..... | 4 |
| 1.3. | Modulación Antigénica..... | 4 |
| 1.4. | Inmunosupresión..... | 5 |
| 1.5. | Exacerbación Inmunológica..... | 6 |
| 1.6. | Inmuno estimulación..... | 7 |
| 1.7. | Objetivos..... | 8 |
| 2. | DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL..... | 16 |
| 2.1. | Exacerbación del crecimiento tumoral por factores esplénicos..... | 18 |
| 2.2. | Exacerbación del crecimiento tumoral por factores séricos..... | 113 |
| 2.3. | Relación huesped tumor..... | 142 |
| 3. | CONCLUSIONES GENERALES..... | 155 |
| 4. | RESUMEN GENERAL..... | 170 |
| 5. | BIBLIOGRAFIA..... | 172 |

INTRODUCCION

La mayoría de los tumores producen respuestas inmunes específicas en huéspedes singéneos (Hellström, 1978) pero a pesar de esto no son rechazados por el animal portador. Simultáneamente con la progresión del tumor, ocurren en el huésped cambios que modifican la respuesta inmune (Wang 1980, Fujimoto 1976 a , Manor 1976) y muchas veces no son suficientes para provocar el rechazo tumoral.

La razón por la cual un tumor no es rechazado se debe a factores propios del tumor y a otros del huésped.

¿Existe una inmunidad antitumoral?

Ya en 1908 Paul Ehrlich postuló que las células tumorales aparecen frecuentemente en el organismo, pero debido a cambios en su superficie son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune (Ehrlich, 1957).

Cinco años más tarde Lewis Thomas confirma además que la evolución de la inmunidad mediada por células es la responsable de la vigilancia inmunológica hacia nuevas neoplasias.

La hipótesis de la vigilancia inmunológica tiene una validez general ya que en huéspedes con tumores se ha demostrado tanto inmunidad humoral como celular hacia los antígenos tumorales (Prehn, 1957; Hewitt, 1976; Huber 1980). Pero una vigilancia inmunológica eficaz puede depender del tamaño del inóculo, como se ha observado en modelos experimentales.

El sistema inmune está en condición de manejar a veces un pequeño número de células tumorales pero no un gran inóculo.

En los casos en los cuales funciona la "inmunidad con comitante" el sistema inmune es capaz de inhibir el crecimiento de las metástasis pero no es suficiente para rechazar al tumor primario de mayor tamaño (Gorelik, 1979; Miner, 1983)

¿Cual es el mecanismo de escape que impide al sistema inmunológico funcionar en el portador de tumor?

Vamos a señalar algunos de los fenómenos conocidos que impiden que la vigilancia inmunológica sea efectiva.

1.1. Tolerancia inmunológica

Este fenómeno se manifiesta principalmente en individuos con un sistema inmunológico inmaduro, pero puede darse también en ciertas condiciones en individuos adultos.

Si animales neonatos son inoculados con células tumorales o altas dosis de antígenos asociados al tumor, se observa que frente a un desafío antigénico el animal es incapaz de responder. Este fenómeno de no respuesta hacia el tumor con el cual fue inoculado primeramente es la tolerancia inmunológica. El animal es tolerante en una forma específica ya que si es desafiado con otro tumor con el cual no comparta antígenos, es capaz de responder (Nossal 1983). De modo que existe una respuesta inmune negativa hacia el tumor para el cual se desarrolló la tolerancia y de esta forma escapa del control inmune.

1.2. Inmunoselección

Es un fenómeno dinámico que ocurre como consecuencia de la conocida heterogeneidad de un tumor primario.

Los tumores tienen distintas poblaciones celulares que van desde variantes antigénicas hasta no antigénicas.

El sistema inmune responde eliminando primero a las células más antigénicas. Así el tumor va creciendo con predominio de células poco o nada antigénicas, modificando en consecuencia la respuesta del sistema inmune hacia el.

El sistema inmune no induce cambios antigénicos en el tumor sino que selecciona a una población que se modificó independientemente (Prehn, 1970; Byers, 1977).

1.3. Modulación antigénica

La modulación antigénica fue demostrada y ampliamente estudiada en dos leucemias murinas.

Leucemias tíficas inducidas por virus en ratones, expresan el antígeno TL. Cuando estas células se transfieren a ratones inmunes para el antígeno TL, se observa que el tumor crece progresivamente.

Estudios sobre estas células tumorales mostraron que ya no expresaban dicho antígeno.

Los ensayos in vitro demostraron el mismo fenómeno, pero además se observó que cuando se eliminaban los anticuer-

pos específicos del medio de cultivo el antígeno TL se expresa nuevamente en la superficie de las células leucémicas.

Las moléculas de inmunoglobulinas en la superficie de linfocitos B normales o leucémicos sufren la misma modulación antigénica. En este caso se ha demostrado que las moléculas son removidas de la superficie por un fenómeno de "capping" en presencia de IgG y una posterior endocitosis (Boyse, 1969).

1.4. Inmunosupresión

Hay varias formas de inducir inmunosupresión. La más común en el ser humano es la ocasionada por el tratamiento con agentes antitumorales.

Tanto las radiaciones ionizantes como las drogas antitumorales inducen supresión, mediada en parte por la destrucción de células del sistema inmune.

En algunos cánceres es el propio tumor el inductor de supresión. Un ejemplo clásico es la enfermedad de Hodgkin. Los pacientes portadores de este linfoma tienen disminuida la inmunidad mediada por células y son así susceptibles a diversas infecciones como tuberculosis o herpes.

Por último, las células pueden estar infectadas con virus, que son productores de la inmunosupresión. Dos ejemplos muy comunes son el virus de la lactato deshidrogenasa (LDV) en el ratón y el citomegalovirus (CMV) en el hombre (Isakov, 1981) (Mc Donald, 1983).

La inmunosupresión es consecuencia de la inducción de células supresoras (Padarathsingh, 1979; Ting, 1979; Ting, 1982). En los últimos años se han descrito varios mecanismos supresores en diversos sistemas (Shoul, 1980; Takei, 1982).

La supresión de un amplio espectro de la respuesta inmune puede ocurrir por diversos caminos incluyendo células supresoras y factores solubles supresores (Venkataraman, 1980; Wang, 1982). Estos factores supresores han sido indentificados en el suero de portadores de tumor en modelos humanos experimentales (Cafruny, 1984, Kumrn, 1981; Koppi, 1984 a y b; Dewhirst, 1985) y en extractos de tejidos tumorales (Wang, 1982; Werkmeister, 1980, Yamagishi, 1980)

1.5. Exacerbación inmunológica

En algunos casos se ha observado que animales inmunizados con extractos de tumores alogeneicos permiten el crecimiento del tumor mientras que éste es rechazado en animales no inmunes.

Esta exacerbación inmunológica puede ser transferida pasivamente por suero de animales inmunizados (Hellström, 1974; Kaliss, 1957).

El suero de estos animales podría actuar bloqueando la función efectora. Así se ha demostrado exacerbación tumoral cuando se inoculan células tumorales recubiertas con estos anticuerpos.

Estos resultados sugieren que hay un bloqueo del mecanismo o alternativamente, los anticuerpos podrian inducir la maduración antigénica en la célula tumoral.

Algunos experimentos in vitro han mostrado la existencia de factores bloqueantes. Por ejemplo células tumorales pueden ser lisadas por linfocitos de animales portadores de tumor, pero este efecto es anulado por el suero del animal portador en forma específica (Snyderman, 1977; Esparza, 1983). Estos resultados pueden ser explicados por la presencia de anticuerpos que bloquean los determinantes antigénicos de la célula tumoral, impidiendo así el ataque celular.

En algunos casos tanto la tolerancia como la exacerbación inmunológica son el evento dominante dando como resultado la inhibición de la respuesta inmune.

1.6. Inmunoestimulación.

En la década del cincuenta se sugirió por primera vez que la respuesta inmune hacia tumores podia aumentar su crecimiento (Prehn, 1972).

Ni el tipo de anticuerpo, ni el tipo de célula responsable es aún bien conocida.

La inmunoestimulación podria involucrar interacciones entre determinantes celulares que normalmente controlan la proliferación, pero el verdadero mecanismo es aún poco claro.

Los mecanismos mencionados nos explicarían la supresión o bloqueo del sistema inmune dando como resultado una exacerbación tumoral en el huésped.

Tanto la exacerbación inmunológica como la inmuoestimulación son dos mecanismos que aún no han sido bien aclarados. En el presente trabajo de Tesis concentraremos nuestra atención principalmente hacia el punto de la inmuoestimulación.

1.7. Objetivo

La exacerbación del crecimiento tumoral fue atribuida a diversos mecanismos entre los cuales los factores esplénicos tienen un rol importante, sin embargo su mecanismo de acción no ha sido muy estudiado.

En esta tesis nos proponemos aclarar algunos puntos de este fenómeno. Queremos estudiar el mecanismo íntimo de exacerbación esplénica, entonces nos proponemos caracterizar las poblaciones que intervienen y cuales son los factores que regulan esta actividad

1.7.1. Exacerbación del crecimiento tumoral por factores esplénicos.

Treves y colaboradores (Treves, 1976) informaron que en etapas tempranas del crecimiento tumoral, los esplenocitos

del huésped eran capaces de inhibir el crecimiento tumoral cuando se coinoculan junto con las células tumorales. A medida que el tumor progresa, esa actividad inhibitoria desaparece y a los 16-18 días de evolución, encuentran actividad exacerbadora del crecimiento tumoral tanto en los esplenocitos como en sobrenadantes de cultivo de ellos.

La exacerbación del crecimiento tumoral fue atribuida a diversos mecanismos (Isakov, 1978).

Se ha postulado que el bazo tiene un rol regulatorio importante en la aparición y crecimiento de un tumor, ya que raramente es un sitio donde aparecen focos metastásicos comparado con otros órganos linfoides (Chang, 1977)

Teniendo en cuenta esto, en nuestro laboratorio realizamos cultivos de esplenocitos de ratones portadores de tumor. Luego estudiamos el efecto de los sobrenadantes de dichos cultivos sobre el crecimiento tumoral. Encontramos entonces que en dichos sobrenadantes existen factores que inducen una clara exacerbación tumoral (Oisgold-Dagá, 1981). Este fenómeno podría incluirse en lo que denominamos mecanismo de inmunoestimulación.

1.7.1.1. Correlación con el tamaño tumoral y efecto de la cirugía sobre la producción de factores exacerbadores tumorales:

Teniendo en cuenta los mecanismos antes mencionados

de inmunoselección y modulación antigénica y habiendo determinado que, en medios condicionados por esplenocitos de portadores de tumor, hay factores que favorecen el crecimiento del mismo tumor: estudiamos la liberación de estos factores exacerbadores en estadios diferentes de la evolución tumoral y el efecto que la cirugía tumoral produce sobre su liberación.

1.7.1.2. Mecanismo de liberación de los factores exacerbadores.

Diversos investigadores encuentran factores inmunoreguladores en medios condicionados por células tumorales (Young, 1982; Watanabe, 1978).

Por lo tanto podría ocurrir que sean las células tumorales las verdaderas responsables de la exacerbación. Ellas podrían sintetizar factores que se pegarían luego a linfocitos y estos posteriormente lo liberarían en las condiciones de cultivo. (Isakov, 1978). Dado que este punto es controvertido estudiamos el mecanismo de inducción de la exacerbación para establecer si este fenómeno es una consecuencia del crecimiento del tejido neoplásico o una secuela de su desarrollo. O sea, si dichos factores son producidos por la célula tumoral o se producen como respuesta del huésped al crecimiento tumoral.

1.7.1.3. Población esplénica celular liberadora de factores exacerbadores tumorales.

El bazo es un órgano formado principalmente por dos poblaciones linfoideas que son linfocitos B y T (LB, LT). Hay además entre un 2-3% de macrófagos. Cualquiera de estas poblaciones celulares por sí solas pueden ser las responsables de la liberación de factores exacerbadores. Alternativamente puede ser necesaria la colaboración entre ellas para obtener dicho efecto.

Suspensiones de esplenocitos con actividad facilitadora tumoral fueron enriquecidas en las distintas poblaciones para establecer cual de ellas libera factores exacerbadores.

1.7.1.4. Caracterización parcial de los factores esplénicos que exacerbaban el tumor.

Como es sabido los linfocitos son células que se comunican entre sí por la liberación de productos solubles. Principalmente los linfocitos T y los macrófagos liberan mediadores químicos llamados linfoquinas. Muchas de ellas se han descrito en detalle como la interleuquina 1 y 2 (IL-1, IL-2) el factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF), en la actualidad se siguen describiendo más de estos mediadores biológicos como el tumor necrosis factor (TNF), interferón (IFN), factor de crecimiento de células B (BCGF) etc (Dewhirst, 1985; Ohara, 1985, Cochran, 1976; Kothe S, 1975; Lattime, 1988).

A pesar de este caudal de información poco se habla de factores inmunológicos exacerbadores tumorales.

En este punto del trabajo, caracterizamos parcialmente al factor(es) responsable de la exacerbación tumoral en este modelo experimental.

1.7.1.5. Neutralización de la actividad exacerbadora tumoral por antisueros xenogéneos.

Hemos encontrado factores exacerbadores tumorales en sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor. La actividad facilitadora tumoral no fue detectada en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos normales (Jasnis, 1987).

Esplenocitos de un portador de tumor precoz liberan en cultivo factores exacerbadores con un peso molecular alto. En estadios avanzados del desarrollo tumoral, aparece actividad exacerbadora en dos zonas, una de alto y otra de bajo peso molecular (Eiján, 1989a). En un intento de modular la actividad exacerbadora, preparamos sueros inmunes xenogéneos dirigidos contra SoETB, SoATB y SoBN. Los inmunos sueros se usaron in vivo para neutralizar la actividad exacerbadora, e in vitro para estudios de citotoxicidad.

1.7.1.6. Angiogénesis inducida por linfocitos.

Es sabido que la angiogénesis juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de tumores (Folkman, 1974; Lanser, 1980). Si bien es un mecanismo necesario para que cé

lulas competentes lleguen al sitio neoplásico y eliminen a las células tumorales, se ha observado que en muchos casos favorece el crecimiento tumoral. Así por ejemplo melanomas en su etapa de crecimiento vascular son totalmente curables, mientras que cuando están irrigados no sólo crecen más rápidamente sino que también desarrollan metástasis a distancia (Folkman, 1987).

Por lo tanto estudiamos en los medios condicionados por esplenocitos con actividad exacerbadora tumoral, la presencia de factores angiogénicos, su correlación con la exacerbación tumoral, así como también las poblaciones celulares involucradas.

1.7.2. Exacerbación del crecimiento tumoral por factores sericos.

Dentro del mecanismo de exacerbación inmunológica se postulan que factores presentes en el suero de los portadores de tumor, bloquean la respuesta inmune hacia el propio tumor.

Estos factores bloqueantes de la inmunidad darían como resultado una exacerbación tumoral.

Se ha postulado que los anticuerpos específicos para el tumor así como también complejos inmunes formados entre estos y antígenos tumorales serían los responsables del bloqueo de la inmunidad hacia el tumor (Iluber, 1980; Cafruny, 1984, Kumar, 1981).

En vista de ello estudiamos los niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) en el suero de animales portadores de tumor, a distintos tiempos post inóculo tumoral.

Luego de lo cual los CIC fueron aislados para purificarlos y estudiar su efecto sobre el crecimiento tumoral.

1.7.3. Relación huésped tumor.

Sabemos que no sólo el sistema inmune regula el crecimiento tumoral, sino que también el tumor se autoregula con la liberación de sus propios factores tales como factores transformantes y angiogénicos (Anzano, 1983; Roberts, 1981; Todaro, 1980).

Hay que considerar además que el tumor al crecer, invade tejido sano y degrada con sus proteasas a la matriz extracelular y membranas basales (Garbisa, 1980; Liotta, 1980; Mignatti, 1986).

Como es sabido una de las principales proteínas de la membrana basal es la fibronectina (FN).

Hace algunos años se ha demostrado que productos de degradación de la FN tienen actividad transformante (De-Petro, 1981; Barlati, 1983). Dado que células linfocíticas tienen receptores para esta glicoproteína (Kradin, 1986), estudiamos el efecto de la FN y algunos de sus fragmentos sobre los linfocitos normales.

Analizamos si son capaces de inducir exacerbación tu

moral, modificación de los niveles de CIC y/o angiogénesis.

DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

INDICE DETALLADO DEL CAPITULO 2

| | | |
|--------|--|-----|
| 2. | DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL | 16 |
| 2.1. | Exacerbación del crecimiento tumoral por factores esplénicos | 18 |
| 2.1.1. | Correlación con el tamaño tumoral y efectos de la cirugía sobre la producción de factores exacerba dores tumorales | 18 |
| 2.1.2. | Mecanismo de liberación de factores exacerbadores | 39 |
| 2.1.3. | Población esplénica celular liberadora de factores exacerbadores tumorales | 53 |
| 2.1.4. | Caracterización parcial de los factores esplénicos que exacerban el tumor | 65 |
| 2.1.5. | Neutralización de la actividad exacerbadora tumoral con antisueros xenogénicos | 78 |
| 2.1.6. | Angiogénesis inducida por linfocitos | 94 |
| 2.2. | Exacerbación del crecimiento tumoral por factores séricos: complejos inmunes circulantes | 113 |
| 2.3. | Relación huésped tumor | 142 |

2.1. Exacerbación del crecimiento tumoral por factores esplénicos.

2.1.1. Correlación con el tamaño tumoral y efecto de la cirugía sobre la producción de factores exacerbadores tumorales.

A pesar de la capacidad del huésped para producir una respuesta inmune, los tumores comúnmente no son rechazados por éste. No es claro si este crecimiento progresivo del tumor se debe a antígenos, anticuerpos o complejos antígeno anticuerpos bloqueantes de la inmunidad (Hellström, 1978; Rao, 1980; Balawin, 1975; Sjögren, 1971). Alternativamente pueden intervenir elementos supresores tales como células linfoides (Fujimoto, 1976; Hollander, 1978), macrófagos (Ting, 1982) o posiblemente el tumor por sí mismo (Cheung, 1979; Isakov, 1978; Watanabe, 1978) que podrían antagonizar activamente la respuesta del huésped hacia el tumor.

Diversos estudios in vivo e in vitro demostraron que bajo condiciones apropiadas, y dependiendo del modelo experimental usado, las células linfoides pueden tener un comportamiento estimulador o inhibitorio sobre la célula tumoral. Así, usando el ensayo de neutralización adoptiva in vivo, (test de Winn) algunos autores han demostrado que las células de bazo de animales portadores de tumor en estadios precoces son capaces de inhibir específicamente el crecimiento

tumoral, mientras que, en estados avanzados del crecimiento tumoral, las células muestran una actividad exacerbadora (Gabizon, 1976; Treves, 1976). Usando sobrenadantes de cultivo de esplenocitos Mayor y colaboradores (Isakov, 1978) demostraron que solamente la actividad exaltadora podía ser transferida por productos solubles.

Otros autores postulan que los factores inmunoregulatorios liberados por esplenocitos de portadores de tumor, no son en realidad secretados por los linfocitos sino secretados por las células tumorales y absorbidas luego sobre los esplenocitos (Hollander, 1978).

En vista de esto nos propusimos estudiar el rol del bazo luego de la extirpación del tumor. Así, analizamos el efecto in vivo sobre el crecimiento tumoral de los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones portadores y exportadores de tumor en relación al momento de la extirpación.

2.1.1.1. Materiales y Métodos

Animales

Se usaron ratones BALB/c de dos meses, de ambos sexos. Se partió de 100 animales normales que recibieron en forma subcutánea en el flanco izquierdo, 1mm^3 de tumor S13 con trocar. Estos animales fueron separados en cuatro grupos:

a) Portadores de tumor chico (ETB): se permitió que el tumor creciera hasta alcanzar un diámetro promedio de 10 mm (7-10 días de evolución), luego se sacrificaron los animales por dislocación cervical y sus bazos fueron procesados para obtener sobrenadantes.

b) Portadores de tumor grande (ATB): los bazos de estos animales fueron procesados a los 20-25 días de evolución tumoral (diámetro promedio 20 mm).

c) Ex-portadores de tumor chico (ETR): cuando el tumor alcanzó un diámetro de 10 mm, se extirpó bajo anestesia (Nembutal). Los bazos de estos animales fueron procesados a distintos tiempos post-cirugía. Los animales que presentaron recurrencias locales, se trataron como un grupo separado.

d) Ex-portadores de tumor grande (ATR): Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 20 mm, los animales fueron anestesiados para la extirpación de la masa tumoral. Los bazos fueron procesados a distintos tiempos post-cirugía.

e) Normales (BN): se procesaron los bazos de animales normales para obtener sobrenadante.

Para descartar que los resultados se deban a la presencia del virus de la lactico deshidrogenasa, se midieron los niveles de la enzima en suero de ratones normales y portadores de tumor (Mc Donald, T.L., 1982).

Procesamiento de los bazos

Los sobrenadantes de bazo de los cinco grupos antes mencionados se prepararon como sigue:

Preparación de la suspensión esplénica: Los bazos fueron extirpados en condiciones estériles y sus células dispersadas mecánicamente. Los glóbulos rojos fueron lisados con Tris- NH_4Cl (9 vol, 0.83% NH_4Cl y 1 vol, 0.17M Tris-(hidroxy methyl)-aminoethane, pH: 7.2). Las células linfocíticas fueron suspendidas en medio 199 y lavadas dos veces. Estas células fueron cultivadas por 24 hs en medio 199 suplementado con 10 mM HEPES, 50 unidades de PENICILINA por ml y 50 ug de STREPTOMICINA por ml, en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37°C.

La viabilidad de las células, determinada por el método de exclusión del Tripán blue fue siempre superior al 85%. Se cultivaron 25×10^6 células viables/ml en tubos de poliestireno de 9 ml de capacidad. Se cultivaron 2 ml por tubo.

Obtención de los sobrenadantes (So) de esplenocitos: Luego de cultivar las células por 24 hs los sobrenadantes libres de células fueron obtenidos por centrifugación a 1500 Xg por 15 min. Estos So así obtenidos se envasaron en frascos conteniendo 10 ml, se congelaron a -40°C y luego se liofilizaron. La concentración proteica de los mismos fue de 1 mg/ml.

Los So se conservaron liofilizados y se usaron en todas las experiencias siguientes.

Tumor

Se usó en todos los casos el tumor de nuestro laboratorio S13. Este tumor es un adenocarcinoma mamario, medianamente metastatizante en pulmón. Se mantiene por trasplante subcutáneo en ratones singeneicos. Produce la muerte de los animales a los 30-35 días post-transplante. Además se usó otro adenocarcinoma mamario M3 para comprobar si la acción era específica para cada tumor.

Suspensión de células tumorales: Las células del tumor S13 se separan en forma mecánica en medio 199 que contiene antibiótico y SFB. La suspensión de células se siembra en F1-COLL-HYPAQUE densidad 1.08 g/ml y se centrifuga 15 min. a 1500 Xg. Este procedimiento separa las células muertas que quedan en el fondo del tubo, las células vivas quedan en la interfase.

Las células se recogen cuidadosamente con pipeta Pasteur y se lavan dos veces en medio completo. De esta forma se obtienen suspensiones celulares con viabilidades que oscilan entre el 80 y 90% medido por el método de exclusión de tripan blue.

Ensayo de la actividad biológica.

Determinación de la actividad exacerbadora del crecimiento tumoral in vivo: Todos los sobrenadantes de esplenocitos,

fueron probados in vivo para comprobar si tenían actividad exacerbadora del crecimiento del tumor S13.

Los sobrenadantes se inoculan en la almohadilla plantar de ratones BALB/c en un volumen de 5 ul. 24 hs después se inoculan en la misma almohadilla 20×10^3 células S13. Se registra el crecimiento tumoral con un calibre de precisión cada dos días, durante 25 días. Se compara con los correspondientes controles por el test de Student't.

Ensayo de los sobrenadantes sobre el crecimiento tumoral in vitro.

Cultivo primario tumoral: Se sacrifican los animales y se saca esterilmente el tumor. Este se limpia cuidadosamente eliminando cápsula y zonas necróticas.

El tumor se corta en trozos pequeños (1mm^3) y se trata con medio 199 que contiene pronasa (0.01% P/V) y 5 gotas de DNAasa (2.4 mg/ml) durante 30 min. a 37°C con agitación constante. Luego se descarta el sobrenadante y sobre el pellet se realiza un segundo tratamiento con pronasa+DNAasa durante 30 min en iguales condiciones. Se recogió el sobrenadante y las células cosechadas se lavaron tres veces con medio MEM. Se midió la viabilidad celular y se resuspendieron en medio MEN con 10% de SFB, glutamina (80 ug/ml).

El procedimiento fue el mismo para el tumor M3 y S13.

Tratamiento de los cultivos y evaluación del crecimiento celular.

Los cultivos primarios de tumor S13 ó M3 fueron tratados con distintas dosis (10-120 ug/ml) de SoETB, SoBN y F1 y F2 de SoETB y SoBN. Todos los ensayos se realizaron por triplicado se midió el crecimiento evaluando el contenido proteico celular a distintos tiempos de tratamiento.

Ensayo de transferencia de la actividad de los sobrenadantes de esplenocitos (So).

Para probar si la actividad biológica de los sobrenadantes de cultivo podía ser absorbida in vivo en el bazo de ratones normales, 50 ul del SoETB se inyectó en ratones BALB/c normales por vía s.c. o i.p.. Luego de transcurridas tres horas de la inoculación, los animales se sacrificaron y se extirparon los bazos. Los sobrenadantes de cultivo se prepararon como se indicó anteriormente y luego se probó la actividad sobre el crecimiento tumoral como se indica en el punto anterior.

Ensayo estadístico: los resultados se evaluaron por el test de Student. Los experimentos se repitieron por lo menos tres veces con no menos de diez ratones por grupo y una desviación estandar (DS) variando entre un 10 y 15% de la media.

Las figuras muestran los resultados de uno de los experimentos representativos.

2.1.1.2. Resultados

Exacerbación del crecimiento tumoral in vivo por sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor S13.

Los SoETB y SoATB mediaron una significativa facilitación tumoral cuando se compararon con el grupo control que recibió medio 199. Este efecto exacerbador se observó tanto por un mayor tamaño tumoral, como por una aparición más temprana del tumor.

El SoBN nunca exacerbó el crecimiento tumoral (Figura 1).

La facilitación del crecimiento tumoral no demostró ser un fenómeno específico ya que los sobrenadantes de bazo de portadores de tumor también exacerbaron el crecimiento del tumor M3. (Figura 2).

Actividad de los sobrenadantes de bazo de exportadores de tumor sobre el crecimiento tumoral in vivo.

Para determinar si la actividad exacerbadora tumoral del SoETB persistía luego de la cirugía tumoral, los bazos de ratones ETR fueron procesados 20, 13, 9, y 1 días luego de

la cirugía tumoral.

Sobrenadantes obtenidos a los 13,9, y 1 día luego de la cirugía tumoral ya no facilitan el crecimiento tumoral (Figura 3). Así, se puede observar que el factor(es) exacerbador aparece en el bazo del portador como resultado de la interacción con el tejido neoplásico y desaparece o disminuye a valores no detectables rápidamente luego de la cirugía de un tumor precoz. No se observó actividad exacerbadora en los sobrenadantes del día 20 post-cirugía, salvo cuando los animales tenían recidivas locales en el momento de procesar los bazos (Figura 4).

¿La cirugía de un tumor avanzado también revierte rápidamente la actividad exacerbadora?

Para aclarar este punto se extirparon los bazos de ratones exportadores de tumor avanzado entre los días 1 y 20 post cirugía tumoral como se ilustra en la figura 5 la actividad exacerbadora se detecta hasta el día 15 post cirugía y luego desaparece.

Ensayo de los sobrenadantes exacerbadores sobre el crecimiento tumoral in vitro.

Los ensayos in vitro se realizaron sobre cultivos primarios de S13 y M3, susceptibles in vivo al efecto exacerbador. Los cultivos se trataron con distintas concentraciones de SoETB, SoBN y fracciones F1 y F2 (separadas por Sephadex G100

como se explica más adelante) y se evaluaron los resultados a diferentes períodos post tratamiento.

El crecimiento de los cultivos de S13 a los 3 días de tratamiento fue independiente de la dosis (10, 20 y 40 ug/ml) y del sobrenadante empleado (Figura 6). El efecto de SoETB y SoBN (10 a 120 ug/ml) sobre cultivo de M3 se evaluó a los 3, 5 y 7 días no observándose tampoco en este caso diferencias (Figura 7).

El tratamiento con F1 y F2 de SoETB y SoBN (40 y 80 ug/ml) durante 4 días no mostró diferencias significativas (Tabla 1).

En conclusión el SoETB no demostró estimulación sobre el crecimiento de células tumorales in vitro, sugiriendo que la exaltación tumoral in vivo requeriría de la mediación del sistema inmune.

Transferencia de la actividad exacerbadora a ratones normales

Teniendo en cuenta que los sobrenadantes con actividad exacerbadora tumoral in vivo no tenían efecto in vitro, decidimos estudiar la participación del huésped en este fenómeno. Para ello realizamos transferencias a ratones normales. La figura 8 muestra como ya a las 3 horas post inóculo del So-exaltador el bazo del animal transferido libera dicha actividad al medio de cultivo. Esta actividad es transferida tanto por vía sc. como ip. y aunque no se muestra en la figura está

presente aún 24 horas luego de la transferencia.

2.1.1.3 Conclusión.

Los resultados muestran que cultivos de corto tiempo de esplenocitos de portadores de tumor contienen factor(es) con actividad exacerbadora tumoral in vivo. En este modelo la exacerbación se manifiesta tanto por una aparición más temprana como por un mayor tamaño tumoral. Este efecto facilitador está relacionado con la presencia del tumor primario ya que no aparece en medios condicionados por esplenocitos de ratones normales.

El efecto exacerbador parece ser no específico ya que los sobrenadantes facilitan también el crecimiento del tumor M3.

El paso siguiente fue estudiar el efecto directo de estos sobrenadantes sobre células tumorales en cultivo. Así observamos que no existe un fenómeno exacerbador directo, por lo tanto decidimos estudiar la participación del huésped. Para ello transferimos la actividad a ratones normales. Comprobamos además que la facilitación tumoral puede ser transferida independiente de la ruta de inoculación. En vista de esto se podría pensar que la exacerbación tumoral aparece como consecuencia de mecanismos inmunosupresores en el huésped (Manor, 1976).

El crecimiento tumoral lleva como consecuencia a cam

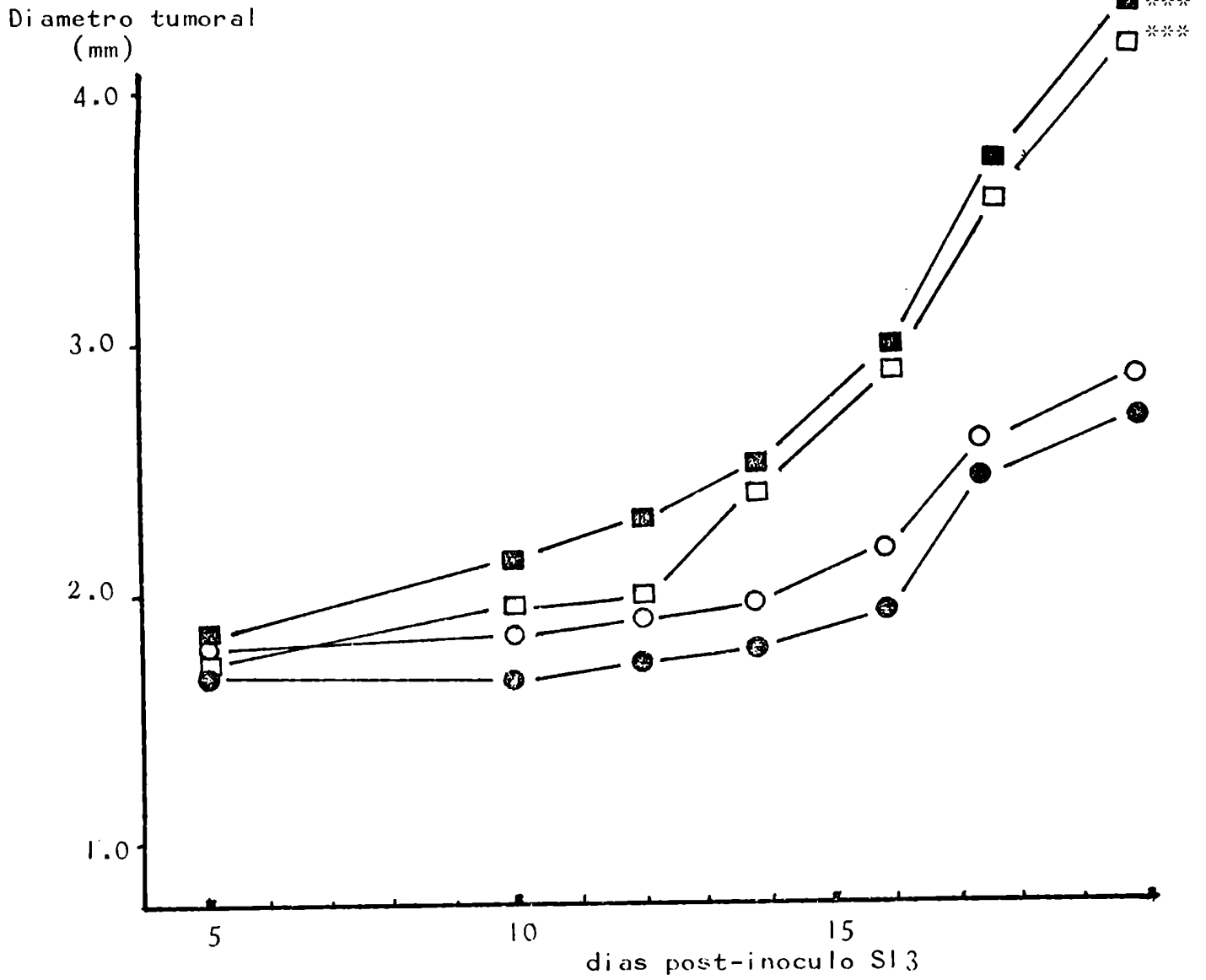
bios explénicos funcionales en el huesped. Para determinar si la cirugía tumoral afecta la liberación de factores exacerbadores estudiamos su producción en dos grupos ETR y ATR. Los datos sugieren que la actividad en los sobrendantes de cultivo depende del tamaño tumoral al tiempo de la cirugía.

Muchos autores atribuyen la supresión de la respuesta inmune durante el desarrollo tumoral a ciertos virus presentes en el huesped. El más común en cepas de ratones es el virus de la lactico deshidrogenasa (LDV) (Mc Donald T.L., 1982; Isakov, 1981). Nosotros descartamos la posibilidad de que este efecto exacerbador se deba a la presencia de virus ya que tanto ratones normales como portadores tienen los mismos niveles de la enzima en suero.

Nuestros resultados muestran que cambios cualitativos o cuantitativos pueden ser responsables del diferente comportamiento del bazo luego de la cirugía tumoral. En el ETB la actividad exacerbadora podría deberse a la generación de un pequeño número de células supresoras, sin embargo dicha actividad desaparece muy rápidamente luego de la cirugía tumoral. Por el contrario cuando se extirpa un tumor avanzado la actividad exacerbadora persiste por dos semanas luego de la cirugía. La mayor estimulación antigénica podría afectar al sistema inmune en forma diferente que en el ETB. Así, cambios cuali y cuantitativos en mecanismos de exacerbación (como un menor clearance de los factores exacerbadores luego de la extirpación de un tumor grande) pueden existir entre ETB y ATB.

Actividad exacerbadora tumoral en sobrenadantes de cultivo de
esplenocitos de portadores de tumor

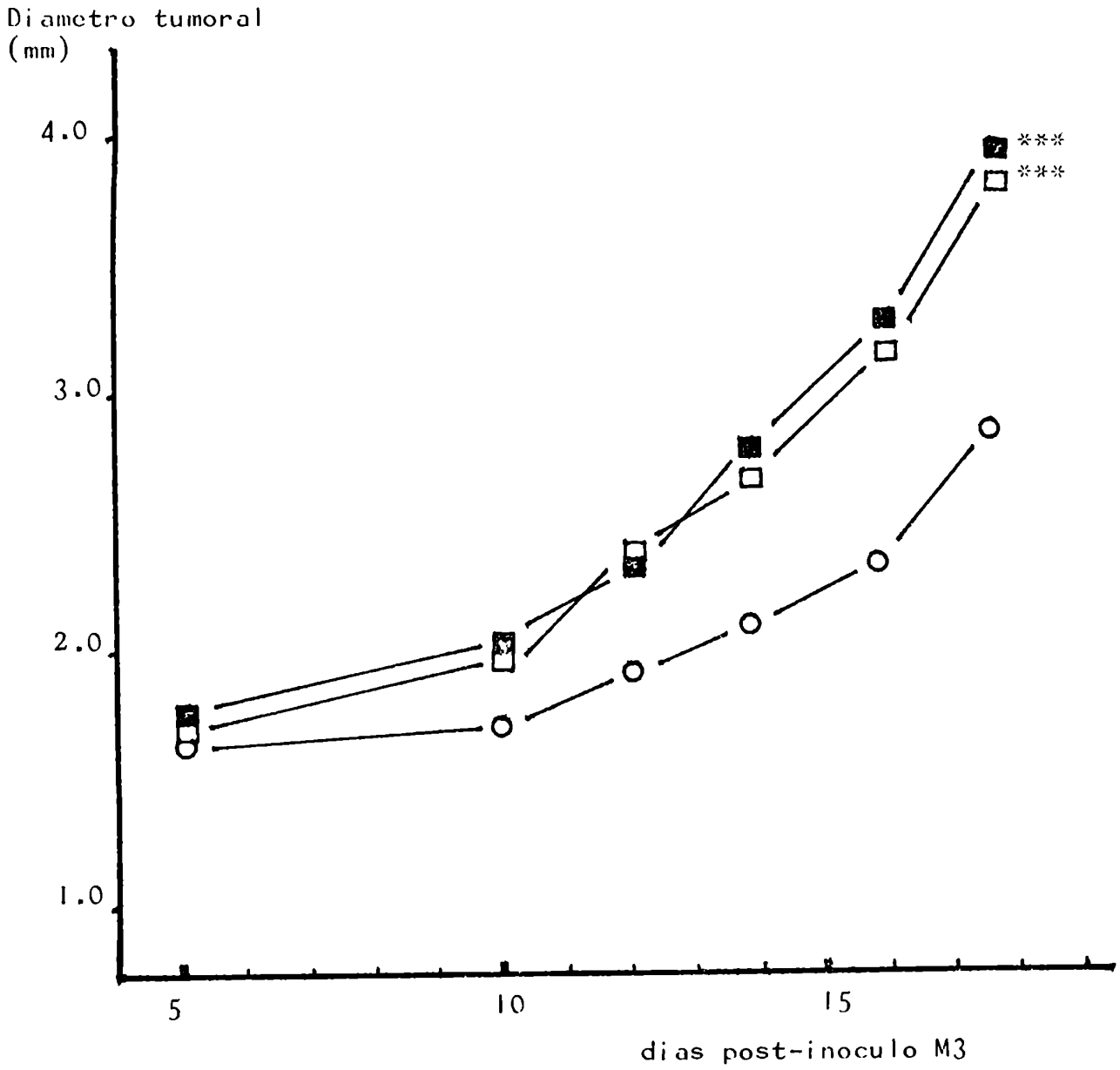
FIGURA I



- SoBN
 - SoETB
 - SoATB
 - control
- p < 0.001

Especificidad de la actividad exacerbadora tumoral

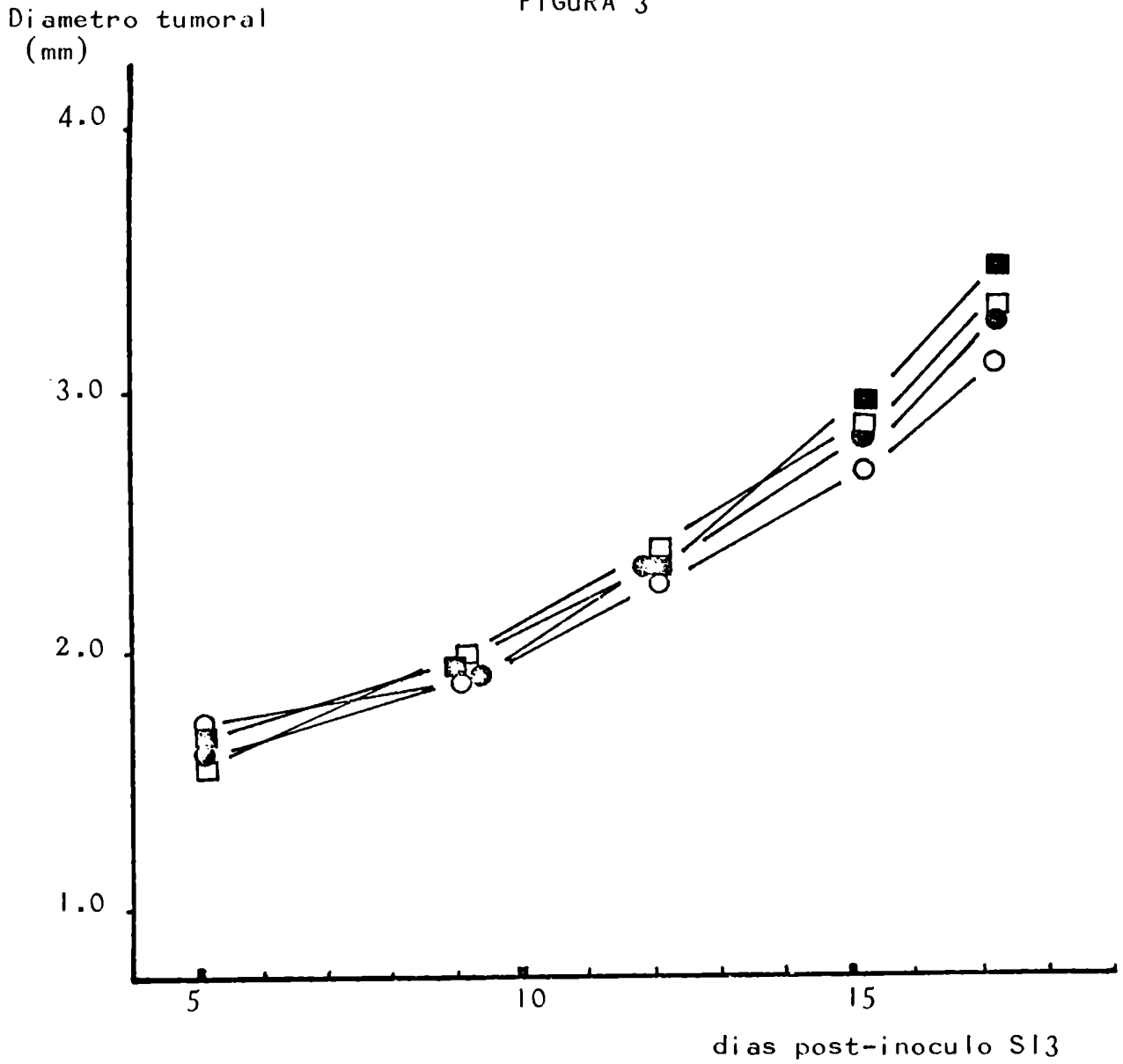
FIGURA 2



■ SoETB
□ SoATB
○ control
p < 0.001

Desaparición de la actividad exacerbadora tumoral luego de la cirugía de un tumor chico

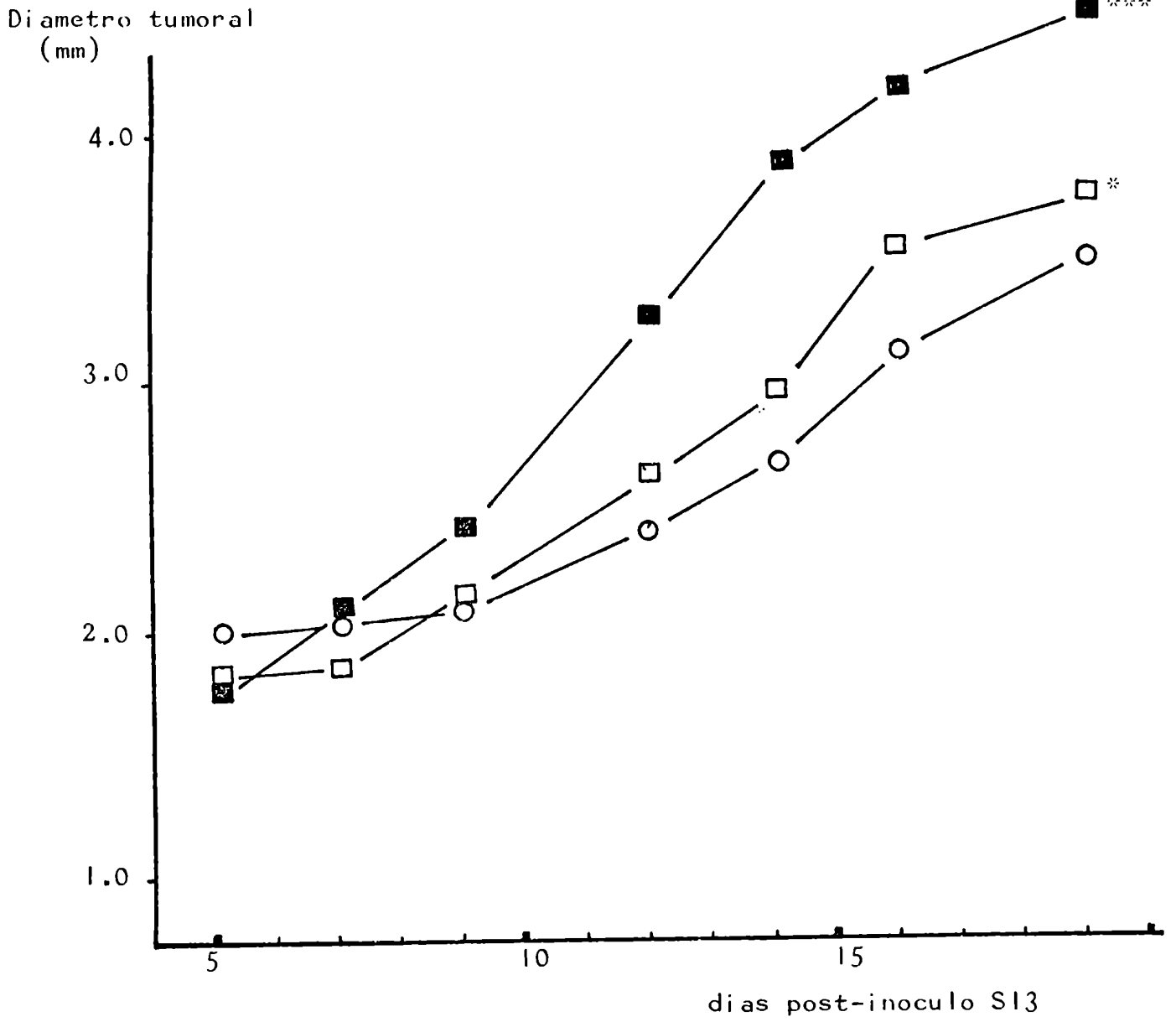
FIGURA 3



- control
- SoETR 13 días post-cirugía tumoral
- SoETR 9 días post-cirugía tumoral
- SoETR 1 día post-cirugía tumoral
- * no significativo

Actividad exacerbadora tumoral.Efecto de la recidiva

FIGURA 4



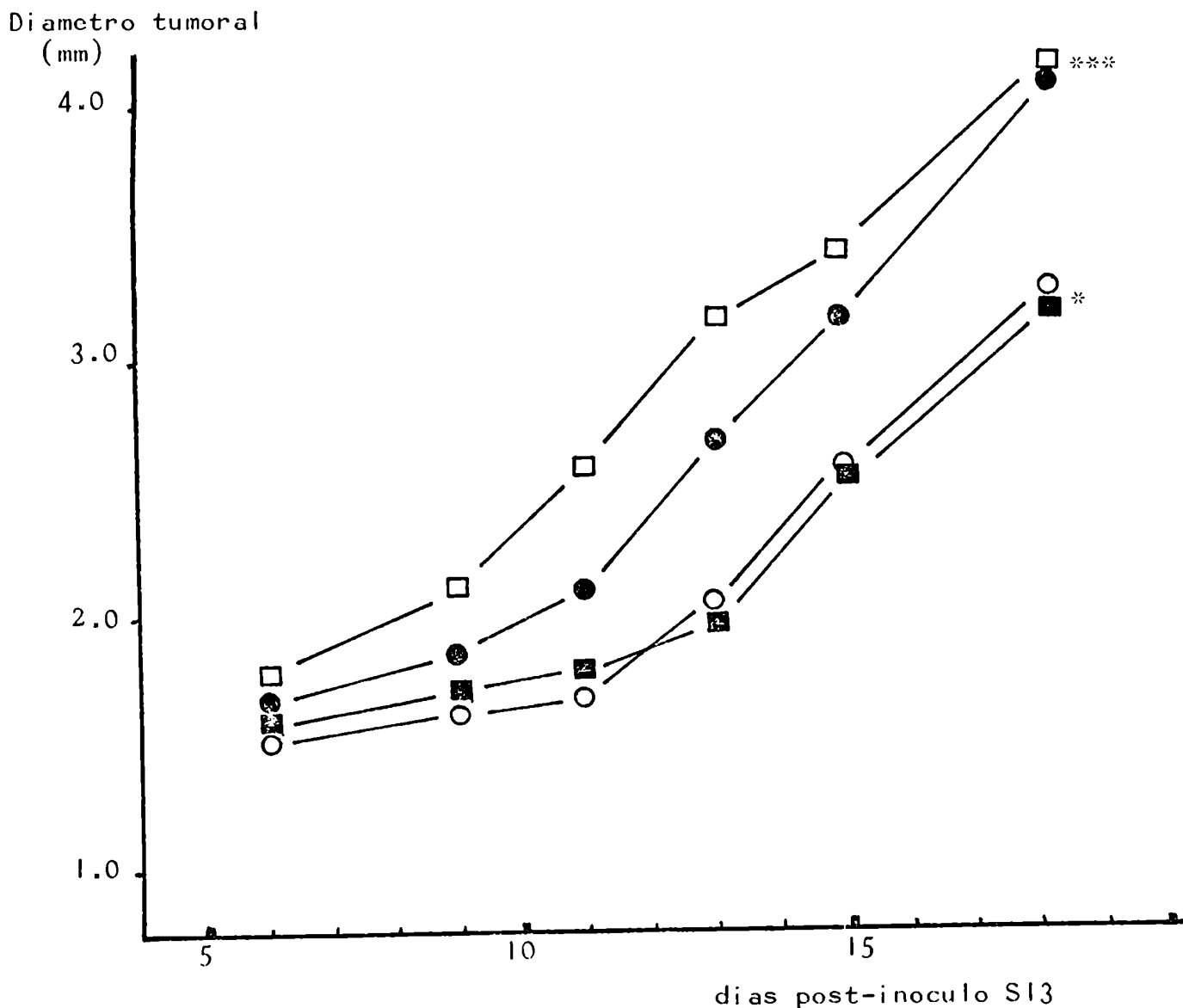
- control
- SoETR 20 dias post-cirugía tumoral sin recidiva
- SoETR 20 dias post-cirugía tumoral con recidiva

*** p < 0.001

no significativo

Desaparición de la actividad exacerbadora tumoral luego de la cirugía de un tumor grande

FIGURA 5



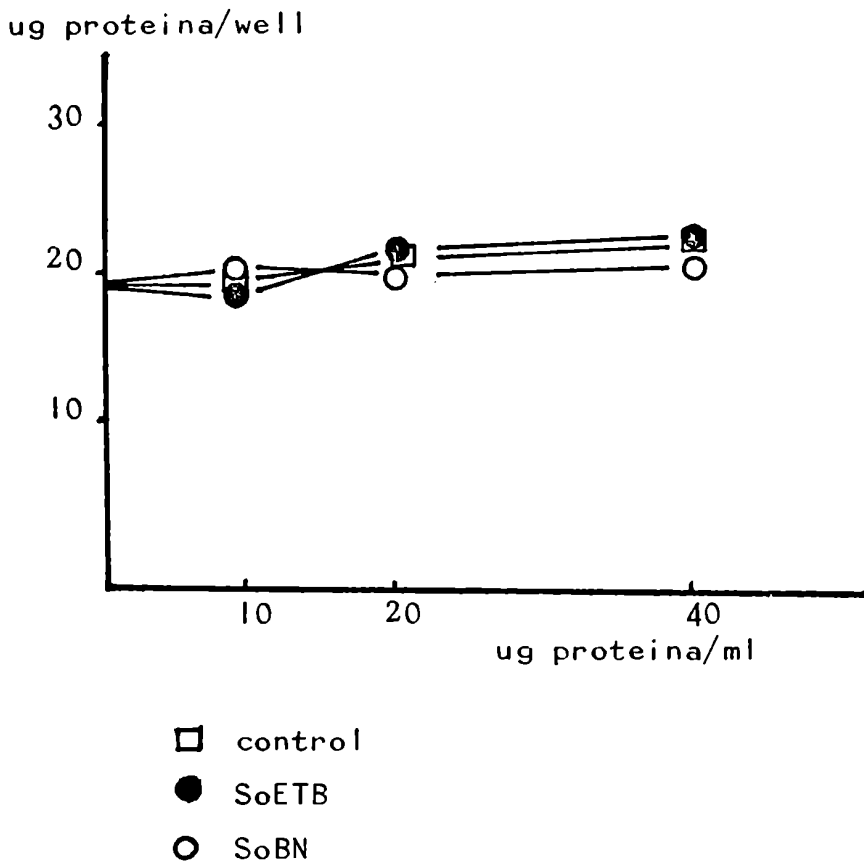
- control
- SoATR 17 días post-cirugía tumoral
- SoATR 14 días post-cirugía tumoral
- SoATR 4 días post-cirugía tumoral

$p < 0.001$

no significativo

Efecto del SoETB y SoBN sobre el crecimiento in vitro del tumor S13
luego de 3 dias de tratamiento

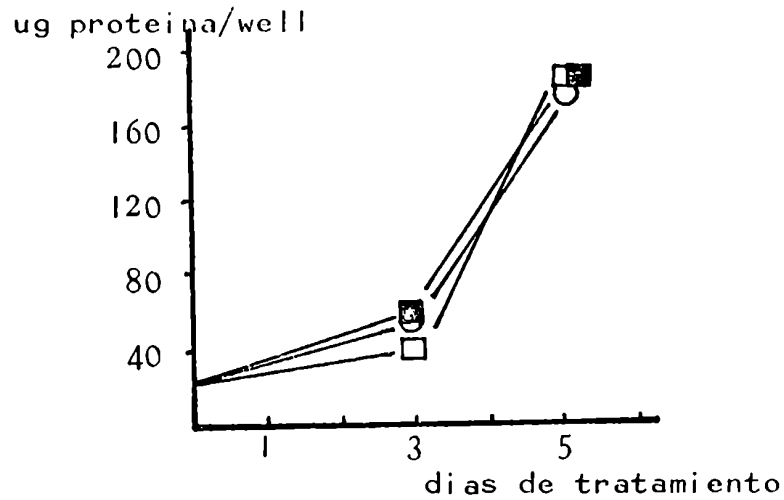
FIGURA 6



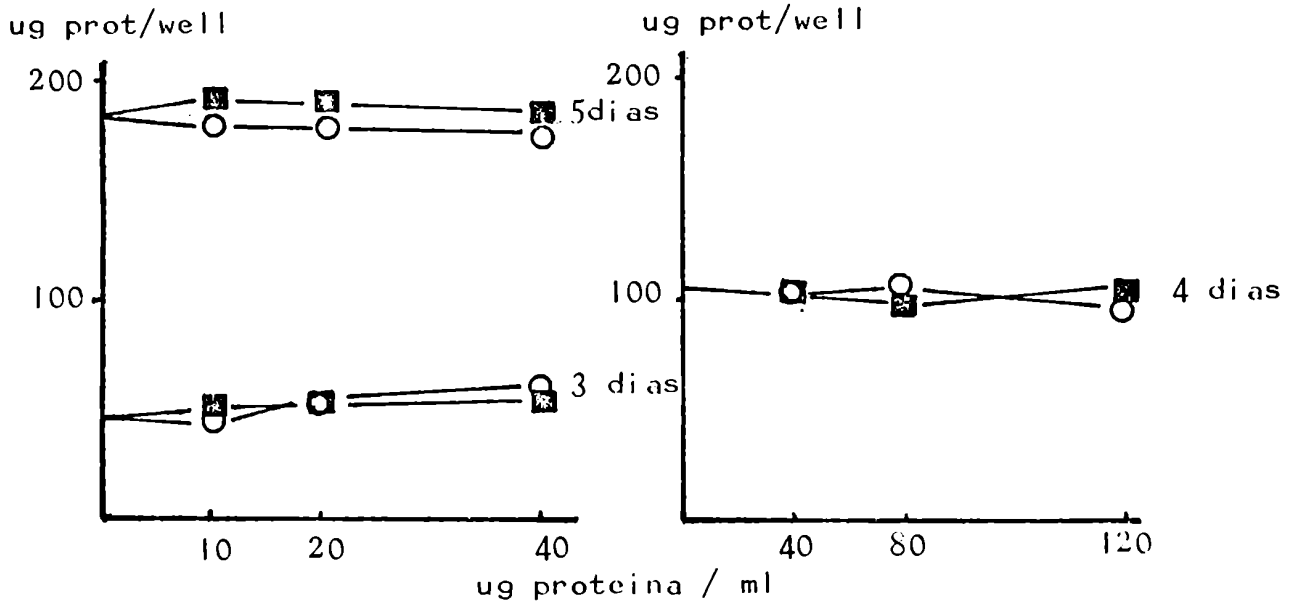
n=3 ; DS < 15%

Efecto de SoETB vSoBN sobre el crecimiento in vitro del tumor M3

FIGURA 7



dosis fija 40 ug/ml
n=3; DS < 10% de \bar{X}



- SoETB
- SoBN
- control

n=3 ; DS < 15% de \bar{X}

Efecto de F1 y F2 sobre el crecimiento del tumor M3
(4 días de tratamiento)

TABLA I

| | ug/ml | SoETB | SoBN |
|----|-------|------------|------------|
| F1 | 40 | 76.0 ± 8.4 | 75.9 ± 5.5 |
| | 40 | 95.8 ± 2.7 | 95.0 ± 0.8 |
| F2 | 80 | 82.2 ± 1.3 | 80.6 ± 6.0 |

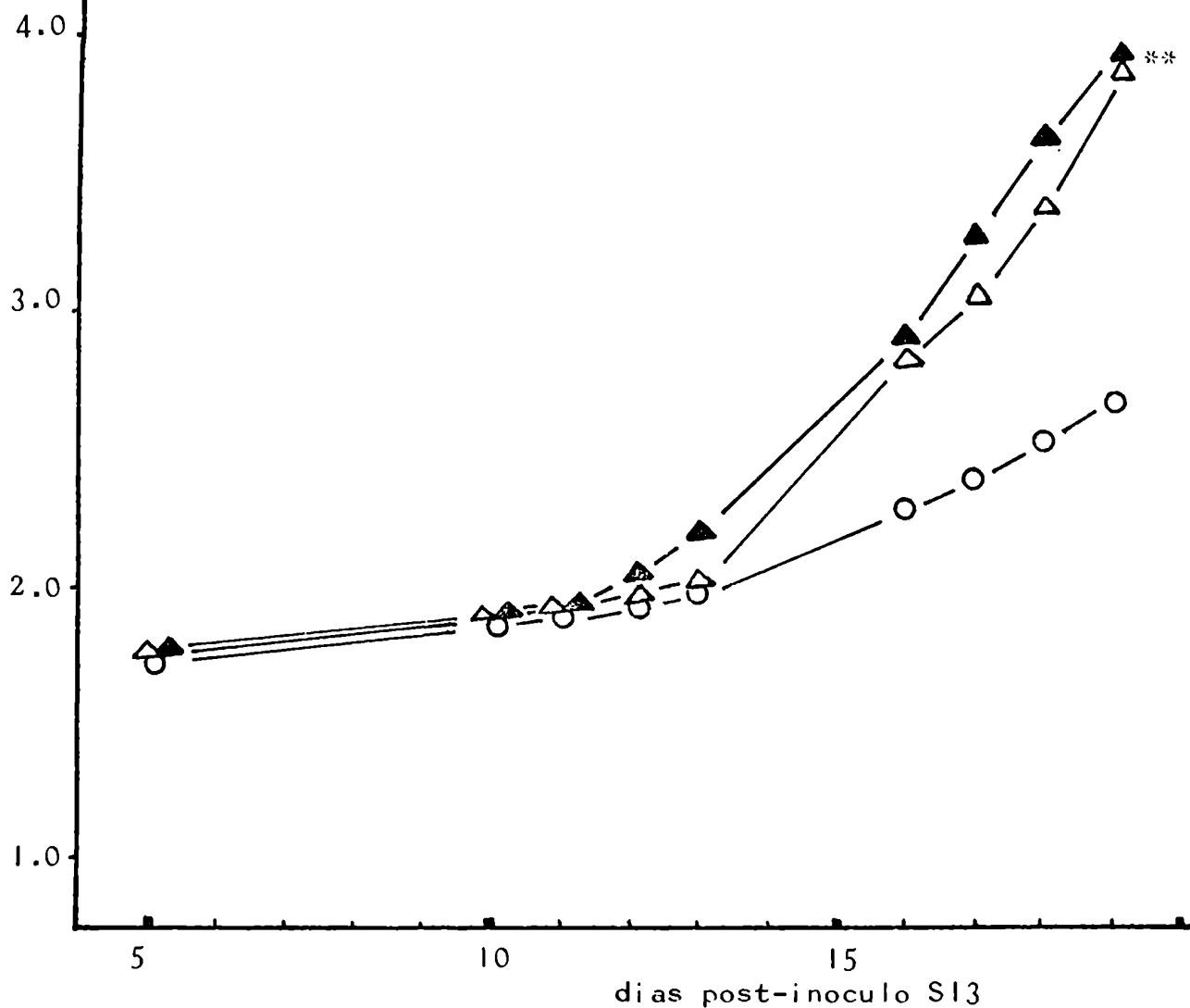
* $X \pm DS$; n=3 ;ug proteína/ well
control: 106.0 ± 5.0 ug proteína /well

Transferencia de la actividad exacerbadora tumoral a ratones normales

FIGURA 8

Diametro tumoral

(mm)



○ control

△ So bazo de ratones inoculados 3 hs antes con SoETB s.c.

▲ So bazo de ratones inoculados 3 hs antes con SoETB i.p.

** $p < 0.01$

2.1.2. Mecanismo de liberación de factores exacerbadores.

En el punto 2.1.1. demostramos la presencia de factor (es) exacerbador tumoral (FE) en medios condicionados por es plenocitos de portador de tumor. El FE no se detecta luego de la cirugía del tumor precoz (Jasnís, 1987) por lo tanto pa rece ser necesaria la presencia del tumor para generar FE.

En otros modelos experimentales Kumar y Young han informado que los productores de actividad exacerbadora tumora l son las células tumorales (Kumar, 1981; Nelson, 1978; Young, 1982) mientras que otros autores atribuyen dicha exacerbación a células esplénicas (Ting, 1982; Yamagishi, 1980)

Frente a estas opiniones contradictorias nos propusi mos, en nuestro modelo, establecer si son los esplenocitos o es la célula tumoral la responsable de la síntesis y secreci ón del FE. También analizamos si es necesaria la presencia de un tumor metabólicamente activo o si este puede ser sustiti tuido por sus productos solubles liberados en cultivo o por extractos de tejido tumoral.

2.1.2.1. Materiales y Métodos

Animales

Ratones BALB/c de 8 a 12 semanas (ver sección 2.1.1.1.).

Tumor

Adenocarcinoma mamario S13 (ver sección 2.1.1.1.).

Obtención de los sobrenadantes de células S13 (SoS13): Las células se cultivan a la densidad requerida ($1.5; 3.2$ o 4.5×10^6 cel/ml) en medio 199 suplementado con 10 mM HEPES, 50 unidades por ml de Penicilina y 50 ug de Streptomycin, en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante 24 hs.;

Al cabo de 24 hs se obtienen los sobrenadantes libres de células por centrifugación a 1500 Xg durante 15 min.

Transferencia de SoS13 a ratones normales: Para establecer si los SoS13 tienen efecto a través del huésped se transfirieron a ratones normales. SoS13 de 4×10^6 cel/ml se transfirieron a ratones normales (0.1 ml, ip). 24, 48 y 84 hs luego de la transferencia se procesaron los bazo de dichos animales para obtener los correspondientes sobrenadantes. Estos sobrenadantes fueron probados "in vivo" para medir su actividad biológica.

Preparación de Extractos de Tejidos.

Extracto de órgano normal (ExON): Tejido normal, que incluye corazón, hígado, riñón, ovario, músculo, glándulas salivares, y piel, fueron homogeneizadas con solución fisiológica pH:7.2 en potter. Se dejó con agitación constante a $4^\circ C$ durante 24 hs. Luego se centrifugó a 2000 Xg durante 15min. El sobrenadante

dante (Sol). Se guarda y el precipitado se trata con buffer Tris 0.1 M pH: 8.6 durante 24 hs a 4°C. Nuevamente se guarda el sobrenadante (SolI) y al precipitado se le hace una tercera extracción con Desoxicolato de Na (0.5% concentración final) durante 3 hs a 4°C. Se obtiene el sobrenadante (SolIII). Los sobrendantes correspondientes a los tres pasos de extracción (Sol, SolI y SolIII) se juntan y se dializan contra buffer carbonato pH: 8.2 durante 72 hs a 4°C con cambios diarios. Luego se conserva liofilizado.

Cada mg de liofilizado tiene 0.8 mg de proteína, medida por el método de Lowry.

Extracto de tumor S13 (ExS13): Para obtener extracto tumoral se realiza igual procedimiento que para la obtención del ExON.

Partiendo de 5 g de tumor, se obtuvo 825 mg de liofilizado. 1 mg de liofilizado contiene 0.55 mg de proteína determinado por el método de Lowry.

Transferencia de ExON y ExS13: Se prepara una solución de 1 mg/ml de ExON y ExS13.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos:

- a) Recibieron 0.1 ml de ExON los días 1 y 2 (2 dosis)
- b) Recibieron 0.1 ml de ExS13 los días 1 y 2 (2 dosis)
- c) Recibieron 0.1 ml de ExON el día 2 (1 dosis)
- d) Recibieron 0.1 ml de ExS13 el día 2 (1 dosis)

Al día 3 todos los animales fueron sacrificados. Se extirparon sus bazos y se procesaron para obtener los corres

pondientes sobrenadantes. Se midió la actividad exacerbadora.

Sobrenadantes de cultivos de esplenocitos: Los So se prepararon como se indicó en 2.1.1.1. partiendo de cinco ratones de cada grupo detallado a continuación:

- a) ratones transferidos 24, 48 y 84 horas antes con SoS13.
- b) ratones transferidos con Ex0N o ExS13.
- c) ratones portadores de tumor S13 como control.

Tripsinización de linfocitos de portador de tumor: La técnica es la descrita por Hollander (1978). Brevemente: los esplenocitos se resuspenden en medio conteniendo 3% de tripsina y EDTA, se los incuban 8 min a 37°C. Se inactiva rápidamente con SFB5%. Las células así tratadas se lavan dos veces con medio y se cuentan. La viabilidad celular osciló entre el 75 y 85%, no se modificó por el tratamiento con tripsina.

Los linfocitos se cultivaron en paralelo con un control sin tratar. Luego se cosecharon los sobrenadantes y se ensayaron para su actividad exacerbadora in vivo.

Ensayo de la actividad exacerbadora sobre el crecimiento tumoral: Todos los sobrenadantes de esplenocitos de los grupos de ratones descritos anteriormente se ensayaron sobre el crecimiento tumoral in vivo como se indica en 2.1.1.1.

Análisis estadístico: Los resultados fueron evaluados por el test de Student. Las figuras muestran un experimento representativo, ya que todos fueron repetidos tres veces con resul

tados compatibles. La desviación estadar osciló entre el 10 y 15 % de la media.

2.1.2.2. Resultados

Actividad de sobrenadantes de células tumorales (SoS13) sobre el crecimiento tumoral in vivo.

Demostramos anteriormente que los sobrenadantes de esplenocitos de portador de tumor liberan al medio de cultivo factores exacerbadores del crecimiento tumoral. Para comprobar si la célula tumoral por sí secreta dichos factores, realizamos cultivos de células tumorales a distintas concentraciones, cosechamos luego los sobrenadantes y probamos su actividad in vivo, sobre el crecimiento tumoral. Las concentraciones celulares usadas fueron: a) 1.5×10^6 cel/ml, b) 3.2×10^6 cel/ml y c) 4.5×10^6 cel/ml. En ningún caso se detectó actividad exacerbadora del crecimiento tumoral. (Figura 1).

Esto indica que, en las condiciones empleadas, la célula tumoral no libera factores exacerbadores. Pero como sabemos que la portación del tumor modifica inmunológicamente al huésped, transferimos SoS13 a animales normales, para estudiar luego el comportamiento de sus bazos. De esta forma podremos establecer si en los SoS13 hay factores inductores de exacerbación tumoral.

Transferencia de SoS13 a ratones normales

Se cultivaron 4×10^6 células S13/ml durante 24 hs luego se centrifugó y se recolectaron los sobrenadantes. Estos fueron transferidos a ratones normales (0.1 ml ip) que fueron divididos en tres grupos. El primer grupo fue sacrificado a las 24 hs y sus bazos procesados para obtener sobrenadante. El segundo y tercer grupo fue sacrificado a las 48 y 84 hs respectivamente y procesados igualmente. Como puede verse en la figura 2 no existen diferencias significativas entre los sobrenadantes de animales transferidos 24, 48 ó 84 hs y los respectivos controles. Esto indica que la transferencia de SoS13 no induce factores exacerbadores en esplenocitos de animales normales, por lo menos en las condiciones aquí empleadas.

Pensamos entonces que, ya que la célula tumoral no libera factores exacerbadores, estos podrían encontrarse intracelularmente. Preparamos entonces los correspondientes extractos y los transferimos a animales normales.

Transferencia de extractos de tumor S13 (ExS13) y órganos normal (ExON) a ratones normales.

Los extractos normales y tumorales fueron transferidos a animales normales en diferentes dosis. Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4. Se observa claramente que

el ExS13 no es capaz de inducir factores de exaltación tumoral en el bazo de animales normales a ninguna de las dosis usadas.

Tratamiento con tripsina de esplenocitos de portador de tumor

Los esplenocitos de ETB se trataron con tripsina para remover de su superficie componentes con actividad exacerbadora tumoral. Luego de este tratamiento las células de bazo se cultivaron por 24 hs para ver si aún liberaban EF.

El tratamiento con tripsina no afectó la producción de EF por las células esplénicas de ETB. Tanto los sobrenadantes de esplenocitos tripsinados como los no tripsinados exacerbaron el crecimiento tumoral (Fig. 5) respecto del control.

2.1.2.3. Conclusión

Sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor exacerban el crecimiento del propio tumor (Hollander, 1978). Este efecto depende de la presencia del tumor ya que desaparece luego de la cirugía (Jasnis, 1987).

Algunos autores demostraron que células tumorales sin tetizan y secretan factores inmunosupresores que indirectamente exacerban el crecimiento tumoral (Medoff, 1986; Putman, 1985). En nuestro modelo observamos que las células S13 no liberan FE en el medio de cultivo. Sin embargo, no se puede descartar la

posibilidad de que las células liberen inductores de exacerbación. Como previamente demostramos que el FE podía ser transferido a ratones normales por inoculación s.c. o i.p., decidimos de la misma forma inocular SoS13 a ratones normales para ver si ellos inducen alguna facilitación tumoral. Nuestros resultados muestran que los sobrenadantes de esplenocitos de animales transferidos con SoS13 no exacerbaban el crecimiento tumoral a ninguno de los tiempos ensayados. Estos resultados en conjunto indican que las células S13 no producen ni FE ni inductores de FE.

Otros trabajos han demostrado que extractos tumorales inducen aumento de la metástasis (Diament, 1985; Watanabe 1978), por lo tanto en nuestro modelo podría ocurrir que las células S13 produzcan tales sustancias, pero no sean capaces de liberarlas en condiciones de cultivo y se puedan encontrar en extractos tumorales. En este caso no encontramos diferencias estadísticamente significativas aunque se observó una tendencia a la exacerbación con ExS13 y a la inhibición con ExON. Estas tendencias fueron reproducibles, por lo cual pensamos que en los extractos tumorales puede existir algún tipo de sustancia que actúa sobre los esplenocitos de los ratones inyectados. Estas sustancias son probablemente diferentes de las encontradas en ExON, y no suficientes para dar un neto fenómeno de exacerbación.

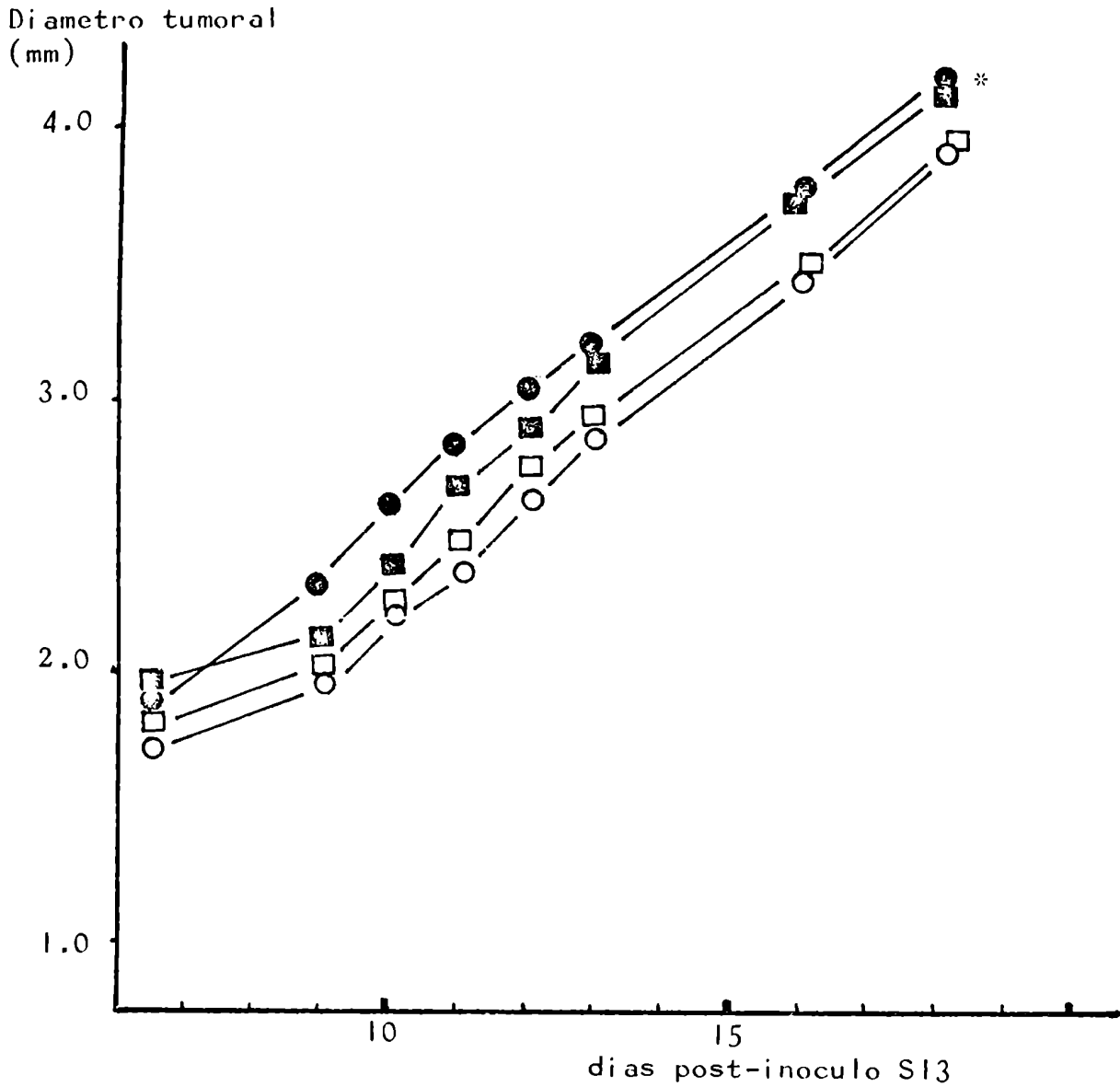
Hollander y colaboradores (Hollander, 1978) demostraron que el tratamiento con tripsina de esplenocitos con

actividad exacerbadora anulaba la liberación de dicha actividad. Ellos concluyeron que el FE es producido por el tumor y luego absorbido en las células de bazo.

Otros grupos de trabajo (Millerioux, 1981; Koppi, 1983) se oponen a estos resultados, ya que consideran que los esplenocitos son los principales responsables de la producción de FE. Nuestros resultados concuerdan con estos últimos, ya que demostramos que son los esplenocitos y no el tumor los productores del FE

Actividad de sobrenadantes de células tumorales S13 sobre el crecimiento tumoral in vivo

FIGURA I



● SoS13 (1.5×10^6 células S13/ml)

□ SoS13 (3.2×10^6 células S13/ml)

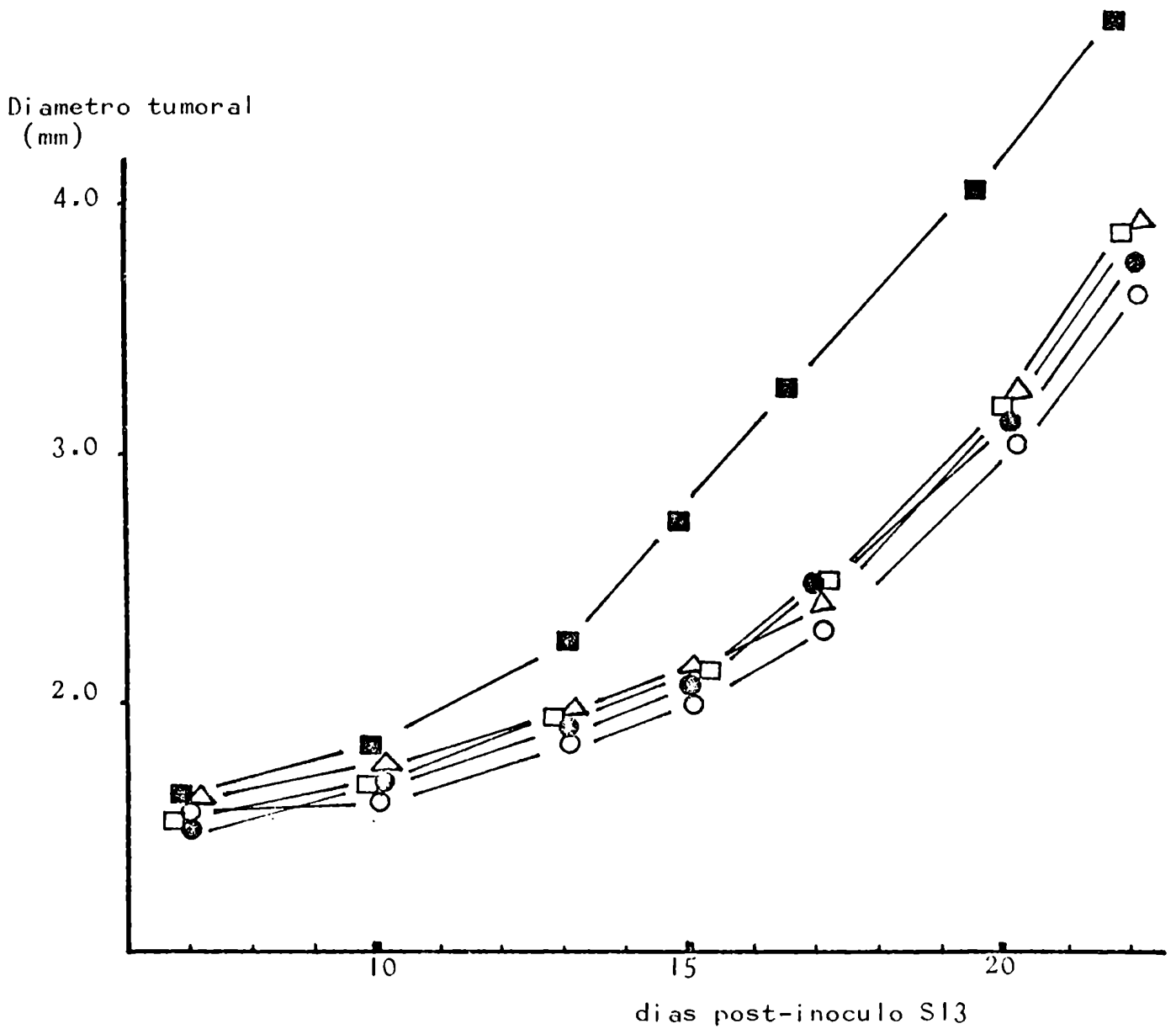
■ SoS13 (4.5×10^6 células S13/ml)

○ control

no significativo

Transferencia de sobrenadante de células S13 a ratones normales

FIGURA 2



△ control

□ transferencia 24 hs antes de la esplenectomia

○ transferencia 48 hs antes de la esplenectomia

● transferencia 84 hs antes de la esplenectomia

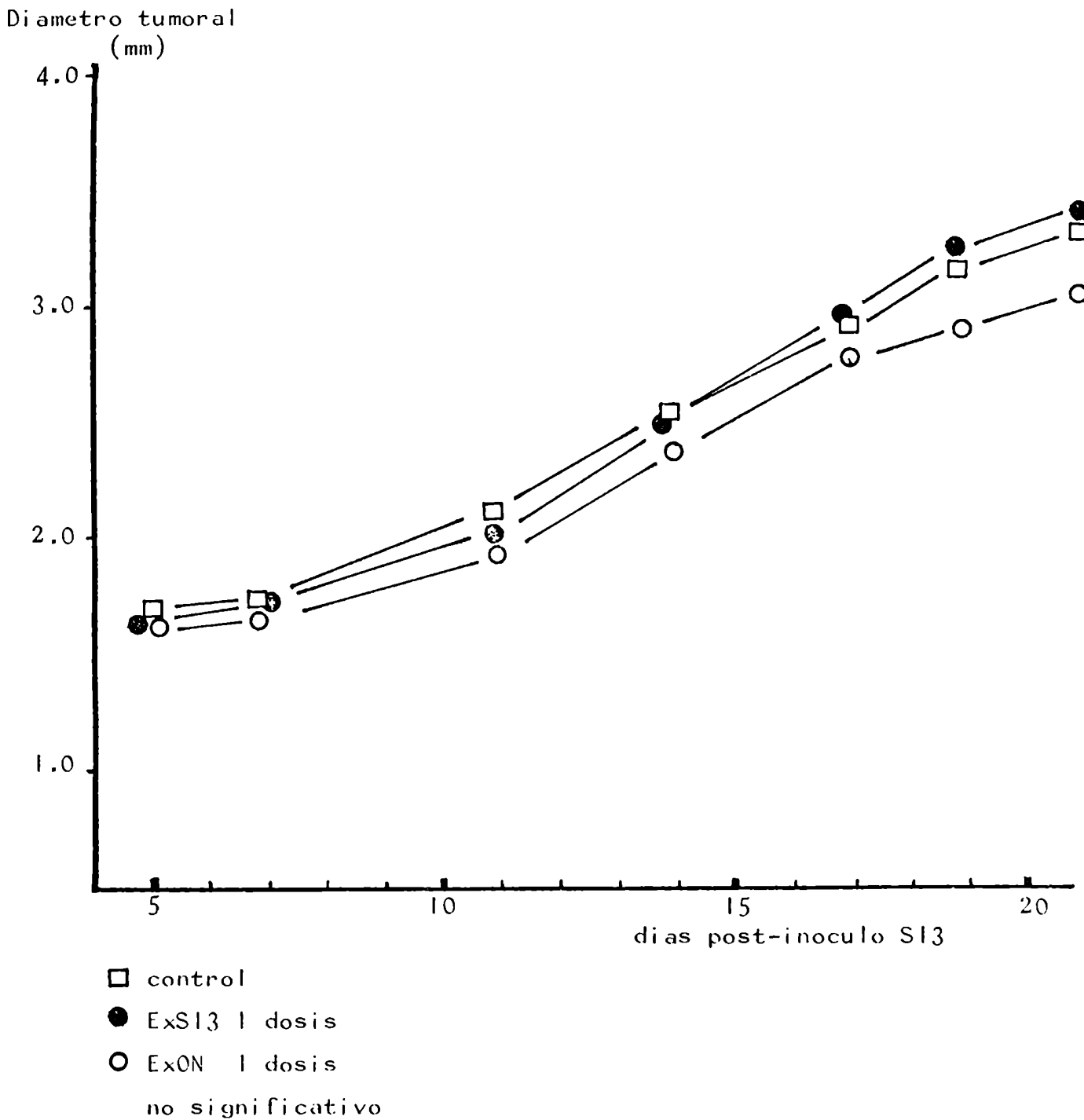
■ SoETB transferido 24 hs antes de la esplenectomia

p < 0.001

no significativo

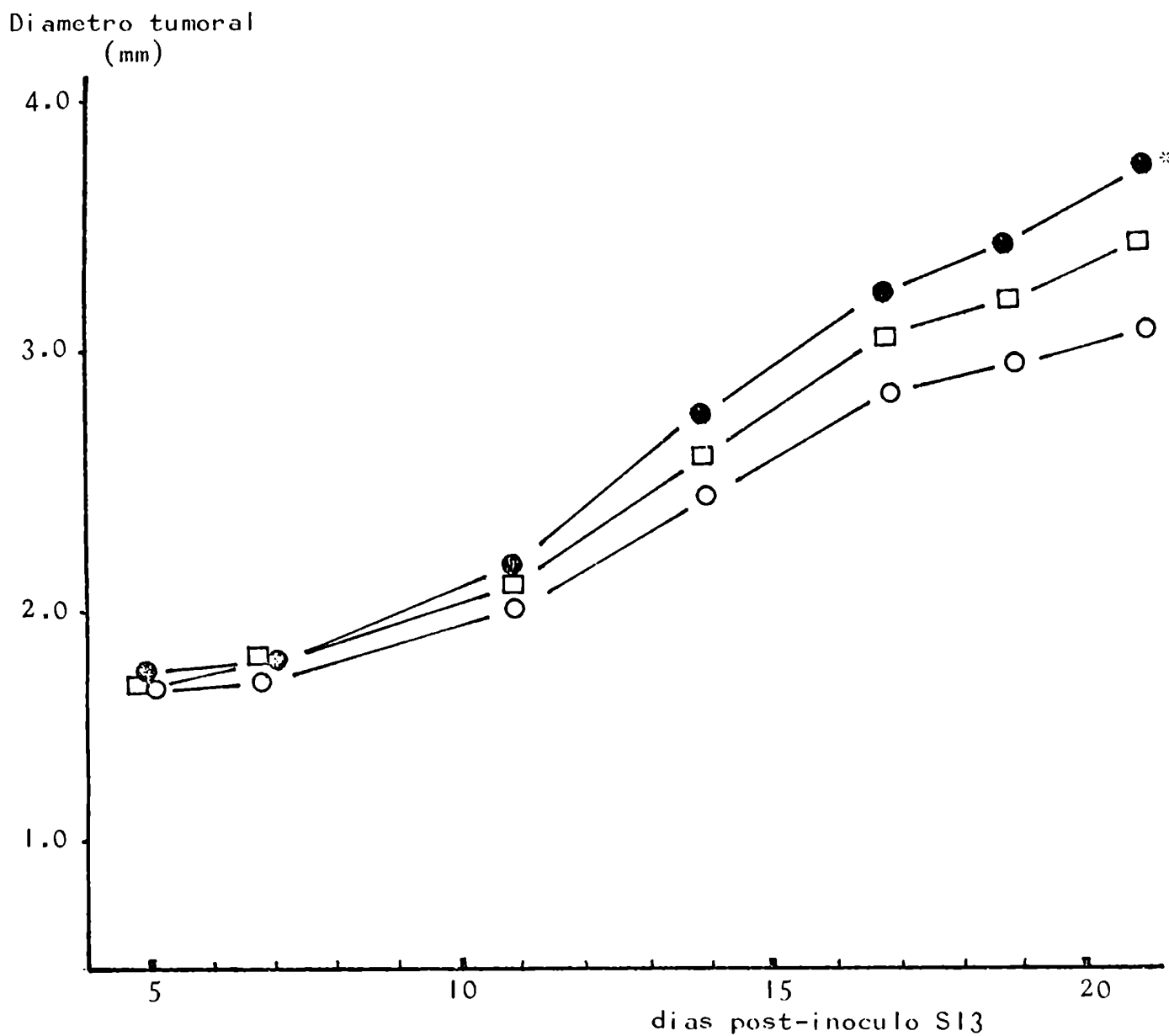
Transferecia de extractos tumoral y normal a ratones normales

FIGURA 3



Transferencia de extractos tumoral y normal a ratones normales

FIGURA 4

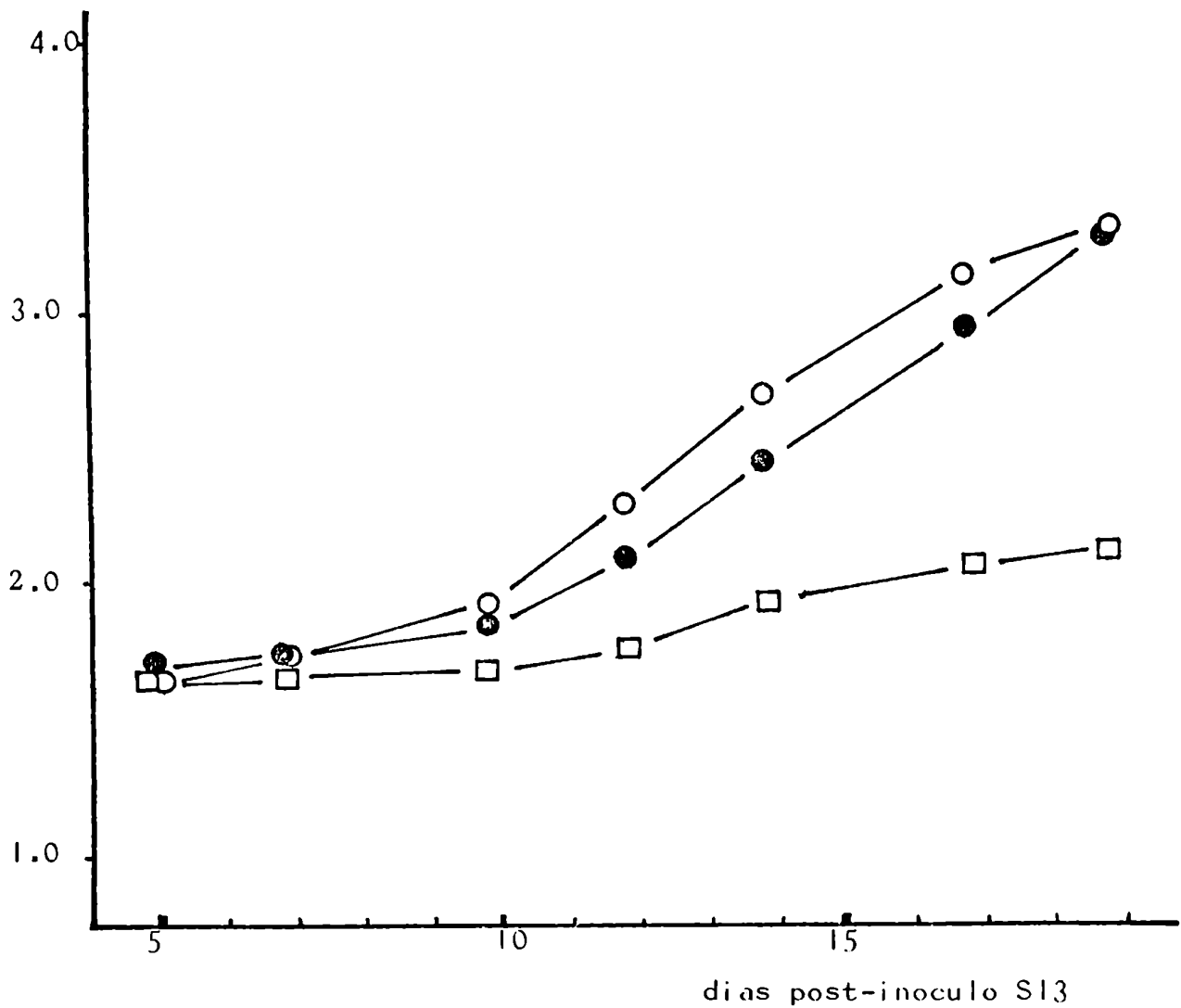


- control
- ExS13 2 dosis
- ExON 2 dosis
- no significativo

Tratamiento con tripsina de esplenocitos de portador de tumor

FIGURA 5

diametro tumoral
(mm)



□ control

○ SoETB luego del tratamiento con tripsina

● SoETB antes del tratamiento con tripsina

*** $p < 0.001$

2.1.3. Población esplénica celular liberadora de factores exacerbadores tumorales.

Ting y colaboradores (Ting, 1982; Fujimoto, 1976b; Isakov, 1978; Padarathsingh, 1979; Kennard, 1980; Manor, 1976) demostraron que en portadores de tumor hay distintas poblaciones responsables de la liberación de factores exacerbadores.

En estudios secuenciales Buessow y colaboradores (1984) y Wang y colaboradores (1980) han observado cambios dinámicos en la actividad de células linfoides que pueden explicar la presencia de factores exacerbadores del tumor.

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos investigar si la actividad exacerbadora presente en los sobrenadantes de esplenocitos puede ser atribuido a células T o noT y si la población exacerbadora es la misma a lo largo del crecimiento tumoral.

2.1.3.1. Materiales y Métodos

Animales

Se usaron ratones endocriados BALB/c normales y portadores de tumor que fueron divididos en grupos según el tamaño tumoral en a) portadores de tumor chico (ETB) y b) portadores de tumor avanzado (ATB) como se explicó en el punto 2.1.1.1.

Tumor

Se usó un adenocarcinoma mamario S13 (sección 2.1.1.1.)

Suspensión de células tumorales.

Las suspensión tumoral se realizó mecánicamente como se detalla en 2.1.1.1.

Sobrenadantes de cultivos de esplenocitos

Los bazo de ETB y ATB se extirparon esterilmente y se realizó la suspensión celular y el cultivo como se describió en el punto 2.1.1.1. Luego de 24 hs de cultivo se cosecharon los sobrenadantes y se ensayaron sobre el desarrollo tumoral in vivo.

Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo de los siguientes grupos.

- a) esplenocitos pretratados con suero antithy1.2+0' antes del cultivo.
- b) esplenocitos fraccionados por columna de lana de nylon previo al cultivo.

Depleción de células T con anti-Thy 1.2

El suero inmune anti-Thy 1.2 fue preparado en nuestro

laboratorio por inmunización de ratones AKR/j con células de timo de ratones CBA/j. Este antisuero en una dilución 1:10 en presencia de complemento mata el 95% de las células de timo de ratones CBA/j.

Las células de bazo de ETB y ATB (10×10^6 células/ml) fueron incubadas a 4°C por 60 minutos con anti-Thy 1.2 a una dilución final de 1:10 en medio TC 199 suplementado con 5% de SFB. Luego, las células fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en su volumen original en medio conteniendo complemento de cobayo diluido 1:4. La mezcla fue incubada a 37°C, 60 minutos. La viabilidad de las células fue determinada por el test de exclusión del Tripan blue y el porcentaje de células Thy 1.2 fue determinado por el índice de citotoxicidad de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CI = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{células muertas} \\ \text{por anti-Thy 1.2} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{células muertas} \\ \text{por C'} \end{array} \right)}{100 - \text{células muertas por C'}} \times 100$$

El CI fue del 20% cuando se trataron células de bazo de ETB o ATB.

Las células muertas fueron eliminadas resuspendiéndolas en PBS (1 volumen) con solución glucosa (19 volúmenes), buffer de baja fuerza iónica; esta suspensión fue pasada por una pipeta Pasteur que contiene un tapón de algodón. Las cé-

lulas así obtenidas se centrifugan y se resuspenden en medio TC 199 a una densidad de 25×10^6 células/ml y se cultivan como se indica arriba para obtener el correspondiente sobrenadante (Hudson, 1980).

Separación de células de bazo por columna de lana de nailon.

Partidas de 1,5 g de lana de nailon fueron empaquetadas en jeringas de 30 ml y esterilizadas. Se siembran en la parte superior de la columna 5×10^8 células en 2 ml de medio de cultivo, se incuban 45 minutos a 37°C (Julius, 1973).

Las células no adherentes a la lana de nailon se recogen lavando suavemente con 30 ml de medio suplementado con 5% de SFB. Para reducir la contaminación con células adherentes, las células efluentes se pasan por una segunda columna de lana de nailon. Las células no adherentes a la lana de nailon serán llamadas células T. Estas células fueron centrifugadas y cultivadas 24 horas para obtener los sobrenadantes.

El rendimiento de células T luego de dos pasajes por columna de lana de nailon fue del 20%. La pureza de las células T fue del 50-55% luego del pasaje por la primer columna y del 80% luego de la segunda.

Determinación de la actividad exacerbadora del crecimiento tumoral.

Los sobrenadantes de cultivo de poblaciones esplénicas (T y no-T) se probaron in vivo para medir su actividad exacerbadora con el diseño experimental descrito en 2.1.1.1. Análisis estadístico: test de Student.

2.1.3.2. Resultados

Células de bazo de portadores de tumor tratadas con Anti-Thy 1.2

Luego del tratamiento con suero anti-Thy 1.2 y complemento, la población celular remanente (no-T) se cultivó para estudiar su capacidad de secretar factores exacerbadores.

La figura 1 muestra que sobrenadantes de células no-T de un ETB tienen actividad exacerbadora tumoral. Por el contrario esta misma población en un bazo de portador avanzado no tiene actividad exacerbadora tumoral (Fig. 2).

Células de bazo de portador de tumor fraccionadas por columna de lana de nailon

Luego del fraccionamiento de las células por columna de lana de nailon obtenemos la población efluente que contiene

un 80% de células T. Estas células fueron cultivadas y sus sobrenadantes cosechados. En las figuras 3 y 4 puede observarse que tanto en sobrenadante provenientes de ETB como ATB encontramos actividad exacerbadora tumoral.

2.1.3.3. Conclusiones

Existen evidencias acerca de la importancia de los distintos tipos celulares en la regulación de la respuesta inmune (Kwong, 1984; Owens, 1985; Patel, 1982; Santos, 1985; Jurin, 1978; Mikulski, 1978).

La portación del tumor ocasiona ciertas modificaciones en las funciones de diferentes poblaciones celulares (Manor, 1976; Buesow, 1984; Wang, 1980).

Como podemos deducir de los resultados en nuestro modelo experimental también ocurren cambios en las funciones celulares durante el crecimiento tumoral.

Observamos que en un portador de tumor precoz tanto la población T como no-T es responsable de la actividad exacerbadora. Cuando estudiamos sobrenadantes de cultivo de ambas poblaciones en un estadio avanzado observamos que sólo la población T libera factores exacerbadores.

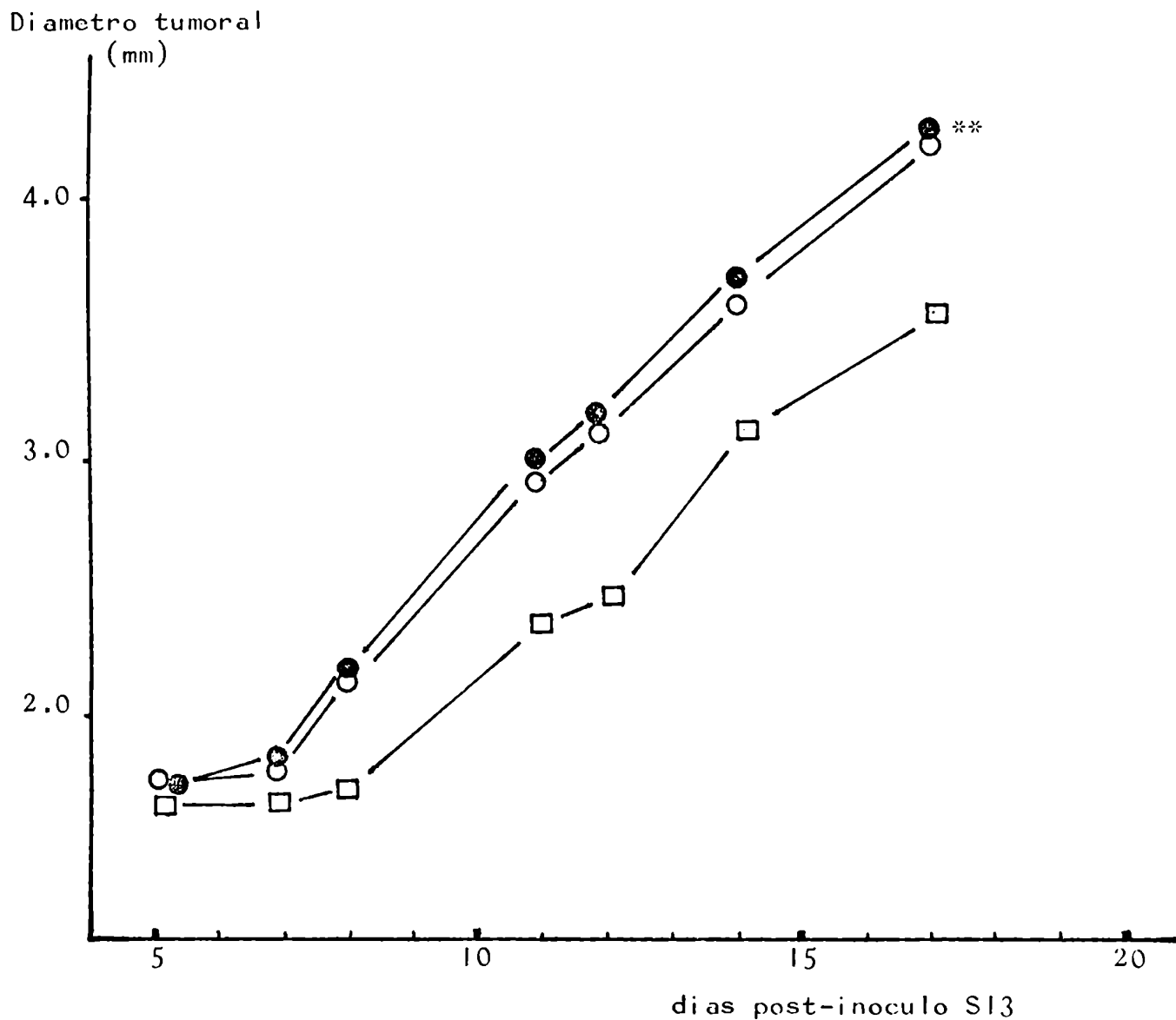
Estos resultados están de acuerdo con hallazgos de otros investigadores que indican que las actividades de células T y no-T no siempre requieren el contacto célula-célula (Kontiainen, 1982), sino que los efectos pueden ser obtenidos

por mediadores solubles derivados de diferentes poblaciones esplénicas.

Estos mediadores tienen la capacidad de exacerbar el crecimiento tumoral por diferentes mecanismos que podrían involucrar aparición de células supresoras o anulación de funciones helper o citotóxicas (Subramanian, 1978; Tada, 1980).

Población esplénica responsable de la liberación de factores
exacerbadores. Tratamiento con suero anti-thy 1,2

FIGURA 1



□ control

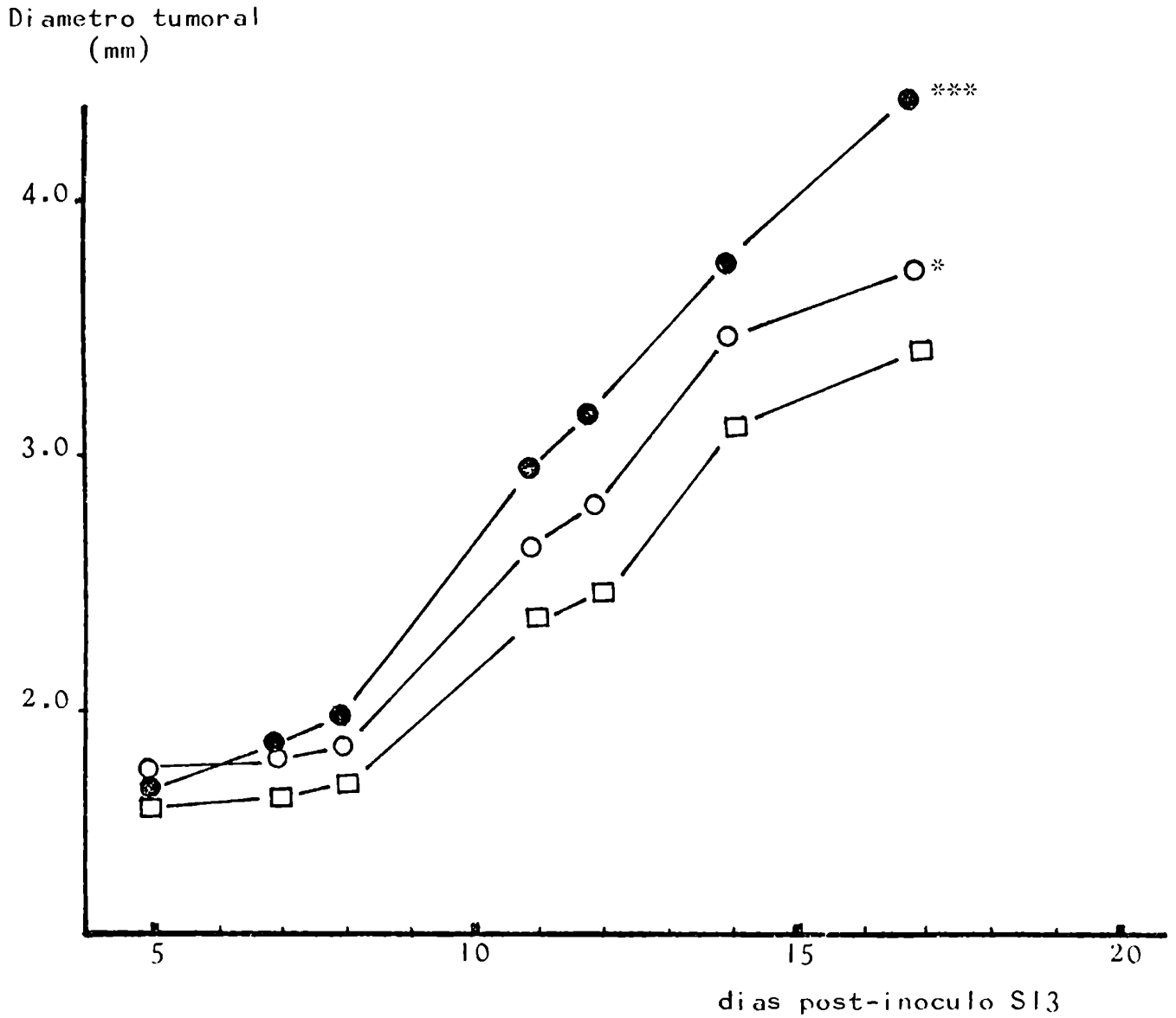
⊕ SoETB post-tratamiento con anti-thy 1,2 + C

○ SoETB sin tratamiento

** $p < 0.01$

Población esplénica responsable de la liberación de factores
exacerbadores. Tratamiento con suero anti-thy 1,2

FIGURA 2



□ control

● SoATB sin tratamiento

○ SoATB post-tratamiento con anti-thy 1,2

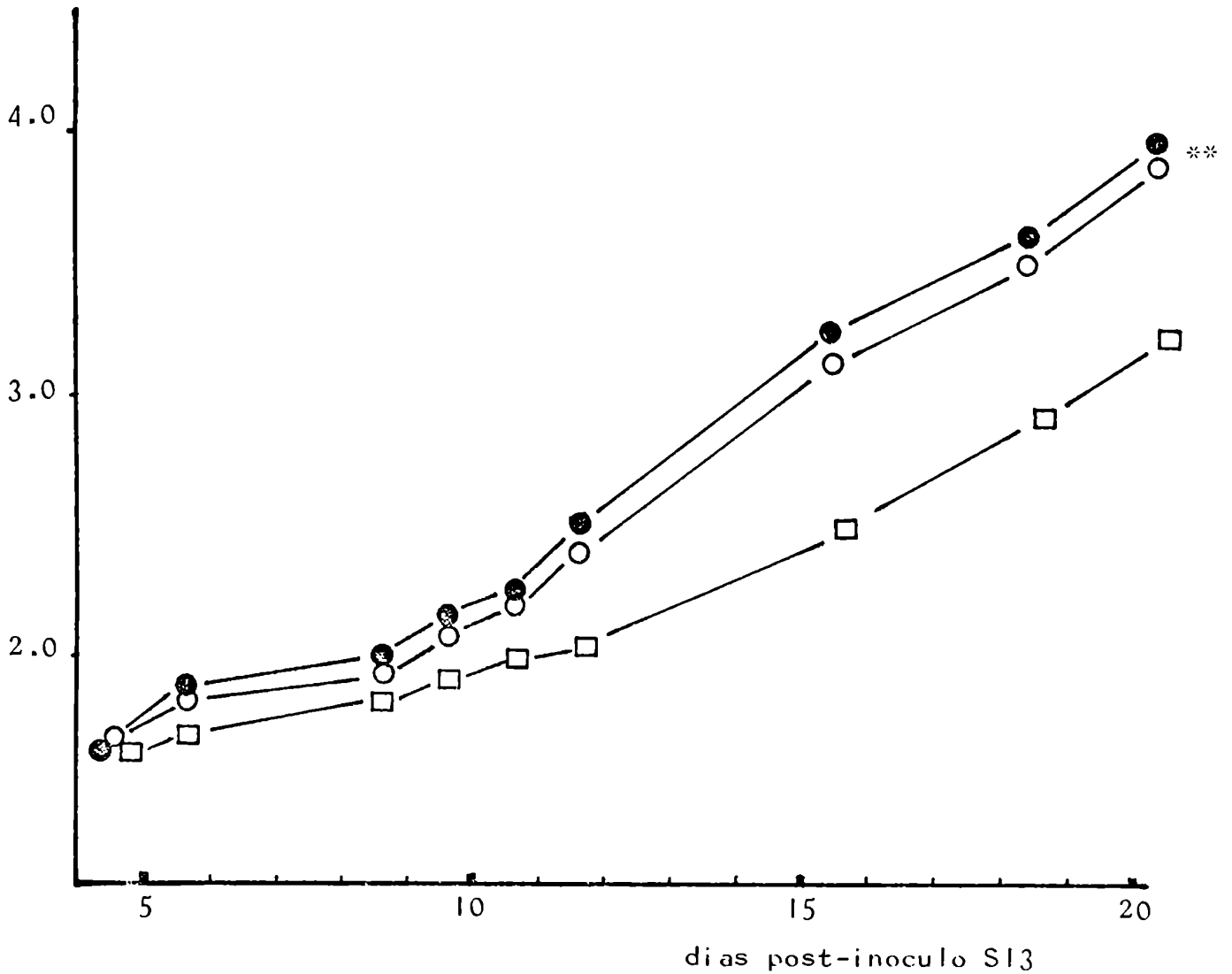
p < 0.01

no significativo

Población esplénica responsable de la liberación de factores
exacerbadores. Tratamiento con lana de nailon

FIGURA 3

Diametro tumoral
(mm)



□ control

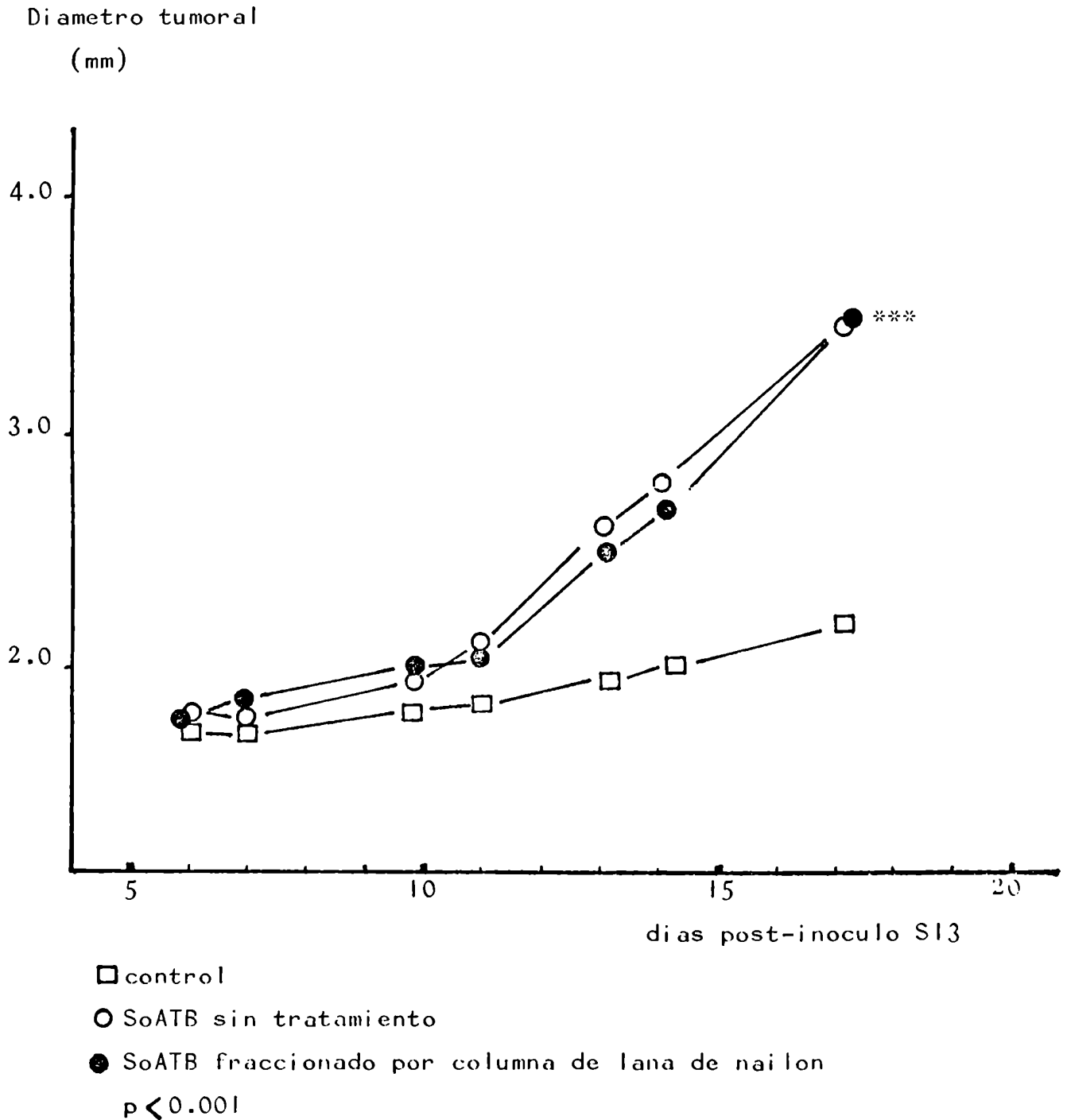
● SoETB sin tratamiento

○ SoETB fraccionado por columna de lana de nailon

p < 0.01

Población esplénica responsable de la liberación de factores
exacerbadores. Tratamiento con lana de nailon

FIGURA 4



2.1.4. Caracterización parcial de los factores esplénicos que exacerbaban el tumor.

En los puntos anteriores demostramos que los esplenocitos de portador de tumor liberan factores con capacidad exacerbadora tumoral (Oisgold-Dagá, 1981; Jasnís, 1982) y que estos factores desaparecen luego de la cirugía tumoral pero con una cinética diferente, dependiendo del tamaño del tumor al momento de realizar la cirugía (Jasnís, 1987). Estudiamos además el mecanismo que desencadena esta exacerbación (Eiján, 1989b) y la población esplénica responsable de la liberación del factor(es) exacerbador (Eiján, 1987b).

En un segundo tiempo, caracterizamos parcialmente los factores exacerbadores tumorales, correlacionándolos con el tamaño tumoral.

2.1.4.1. Materiales y Métodos

Animales

Se usaron ratones BALB/c de dos meses como se indica en el punto 2.1.1.1. se prepararon animales portadores de tumor chico (ETB), de tumor grande (ATB) y exportadores de tumor grande (ATR).

Tumor

Se usó el tumor S13, descrito en detalle en el punto 2.1.1.1.

Suspensión de células tumorales.

La suspensión de células tumorales S13 se realizó por dispersión mecánica como fue descrito en el punto 2.1.1.1.

Sobrenadantes de esplenocitos

Se prepararon So de diferentes grupos ETB, ATB y ATR. Como grupo control se preparó sobrenadante de esplenocitos normales (SoBN).

El procesamiento de los bazos, realización del cultivo y obtención de los sobrenadantes se describió extensamente en el punto 2.1.1.1.

Filtración por geles

Los sobrenadantes de esplenocitos se liofilizaron y concentraron 10 veces de modo tal que la concentración proteica quede 10 mg/ml. Se sembraron en una columna de Sephadex 6-10 (Pharmacia, Uppsala-Sweden).

El efluente de la columna se midió con un monitor UV

LKB 8300 A UVICOR 11) a 280 nm.

La columna se desarrolló a 22°C con buffer fosfato (PBS pH: 7.2) a una velocidad de flujo de 1.5 ml/hs.

El volumen total de la columna fue de 36 ml ($=r^2 h \pi$). El volumen muerto ($V_0=15.5$ ml) se determinó con Blue Dextran (2×10^6 KD). Para calibrar la columna se usaron proteínas de peso molecular (PM) conocido, tales como: Albúmina bovina (66 KD, Sigma), Quimotripsinógeno (25.7 KD, Sigma): Insulina (6 KD, Lilly).

Se recogieron fracciones de 3 ml que fueron juntadas en tres grupos basado en la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones se liofilizaron a sequedad y se conservaron a -20°C hasta ser usadas.

Para determinar el peso molecular (PM) de la fracción que fue excluida de la columna (F1), esta fue cromatografiada por Sepharosa 4B (Pharmacia).

El volumen muerto se determinó nuevamente con Blue Dextran ($V_0=12$ ml) y como marcadores de PM se usó: ferritina (450 KD, Serva), aldolosa (160 KD, Serva) y mioglobina (17.8 KD, Serva).

Caracterización parcial

Se ensayó la estabilidad de F1 de SoETB, SoATB y SoATR en soluciones de baja fuerza iónico (0.005 u) a 4°C y 22°C por 24 hs.

El fue también sometida a procesos de congelación y descongelación (tres ciclos en un mes).

Se midió proteína por el método de Lowry e hidratos de carbono por el método de Debois.

El método de Debois se usa para determinar bajas concentraciones de hidratos de carbono con respecto a la concentración de proteínas.

La curva de calibración se realizó usando soluciones que contenían de 5 a 70 ug de carbohidrato más 0.05 ml de fenol (80%p/p) y 5 ml de H_2SO_4 c. Luego de 30 minutos se determina la densidad óptica a 490 nm. Las muestras incógnitas se trataron de la misma forma y la cantidad de carbohidrato se determinó mediante la curva de calibración.

Determinación de la actividad exacerbadora del crecimiento tumoral in vivo.

Las fracciones obtenidas por cromatografía en Sephadex G-100 de SoETB, SoATB y SoATR, se ajustaron a la concentración original y se ensayaron in vivo, para comprobar cual de ellas conservaba la actividad exacerbadora tumoral.

Cada fracción se inoculó en un volumen de 50 ul en la almohadilla plantar de ratones singéneos BALB/c. 24 hs después se inocularon 20×10^3 células S13 en la misma almohadilla. El crecimiento tumoral se registra día por medio como se explicó detalladamente en 2.1.1.1.

Los grupos experimentales se compararon con el correspondiente control por el test de Student.

2.1.4.2. Resultados

Fraccionamiento de los sobrenadantes de esplenocitos

Se fraccionaron por Sephadex G-100 los SoBN, SoETB, SoATB, SoETR y ATR.

En todos los casos se encontró un perfil de elución similar, esto es un pico proteico que se excluye totalmente (mayor de 100 KD) al que llamamos F1, una zona donde no se detectan proteínas (entre 100 y 10 KD) al que denominamos valle (F2) y una tercera zona que muestra un pico de proteínas de peso molecular 10 KD al que llamamos F3. Estos resultados se muestran en la Figura 1. Ya que la fracción F1 se excluye totalmente de la columna se pasó por una columna de Sepharosa 4B a fin de determinar su peso molecular de F1 en todos los casos resultó ser de 220-250KD.

Caracterización parcial de la actividad exacerbadora Tumoral

La activiada exacerbadora tumoral presente en los sobrenadantes esplénicos fue estable en soluciones de ClNa a baja fuerza iónica (0.05u por 24 horas tanto a 4°C como a 22°C).

Los procesos de congelación y descongelación tampoco afectaron la actividad exacerbadora la cual fue conservada en un 100%.

En cuanto al contenido proteico observamos que F1 tiene 0.2 mg/ml, F2: 0.01 mg/ml y F3 tiene 0.74 mg/ml.

El contenido de hidratos de carbono se determinó solamente en las fracciones con actividad exacerbadora. Encontramos que F1 de SoETB, SoATB y SoATR tiene 9 ug de hidrato de carbono/ml. Teniendo en cuenta el contenido proteico para F1 tenemos 4.5% de carbohidrato/proteína (p/p). En la F2 no medimos hidratos de carbono debido a la escasez de material.

Prueba de la actividad biológica de los sobrenadantes fraccionados por cromatografía.

Las fracciones de Sephadex G-100 F1, F2 y F3 son ajustadas a su volumen original por liofilización.

Cuando se estudió la actividad biológica de las 3 fracciones provenientes de SoETB, pudo verse claramente que la fracción responsable de la exaltación fue la de mayor PM (F1) (Figura 2). Cuando se estudió lo mismo en el SoATB se vio que tanto la F1 como la F2 tenían capacidad de exacerbar el crecimiento tumoral (Figura 3).

En el So de ATR se ve nuevamente que la fracción responsable de la exacerbación tumoral es la F1 de 220-250 KD de PM (Figura 4)

En resumen, la fracción de mayor PM es la responsable de la exacerbación tumoral en los sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor en estadios precoces. En estadios avanzados encontramos también otra fracción responsable de dicha exacerbación que se encuentra en la zona de 100 a 10 KD que desaparece rápidamente cuando se extirpa un tumor avanzado.

2.1.4.3. Conclusión

Anteriormente demostramos que sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor tienen actividad exacerbadora del crecimiento tumoral. Esta actividad desaparece a diferentes tiempos luego de la cirugía tumoral dependiendo de cual es el estadio tumoral en el momento de la cirugía. El factor/s exacerbador (EF) en ETB desaparece dentro de las 24 hs de la cirugía tumoral. En el caso de un tumor avanzado la actividad esplénica persiste por dos semanas luego de la extirpación tumoral (Jasnis, 1987).

Ahora fraccionamos por Sephadex-G100 los sobrenadantes esplénicos de ETB, ATB, ATR, y BN.

Los ensayos "in vivo" sobre el crecimiento tumoral, demostraron que la F1 proveniente de SoETB o SoATR tiene actividad exacerbadora.

Cuando probamos las fracciones de SoATB encontramos que tanto F1 como F2 tienen actividad exacerbadora tumoral.

Así, mientras en los sobrenadantes de esplenocitos de un portador precoz encontramos sólo una fracción con actividad exacerbadora, en un portador avanzado encontramos dos fracciones con la misma actividad (F1 y F2). Es interesante observar que la cirugía del tumor avanzado induce la rápida desaparición de la actividad en F2.

Otros investigadores (Ptak, 1982) informaron que un factor biológicamente activo estaba formado por dos subfactores, pero estos por separado no tienen actividad. En nuestro caso observamos que tanto F1 como F2 son activos separadamente. De todos modos no podemos descartar la posibilidad de que ambos actúen en forma conjunta en el sobrenadante sin fraccionar. Alternativamente F2 podría ser un fragmento de F1 que conserve intacto el sitio activo.

La caracterización parcial mostró que F1 es una glicoproteína estable a varios ciclos de congelación y descongelación y a baja fuerza iónica.

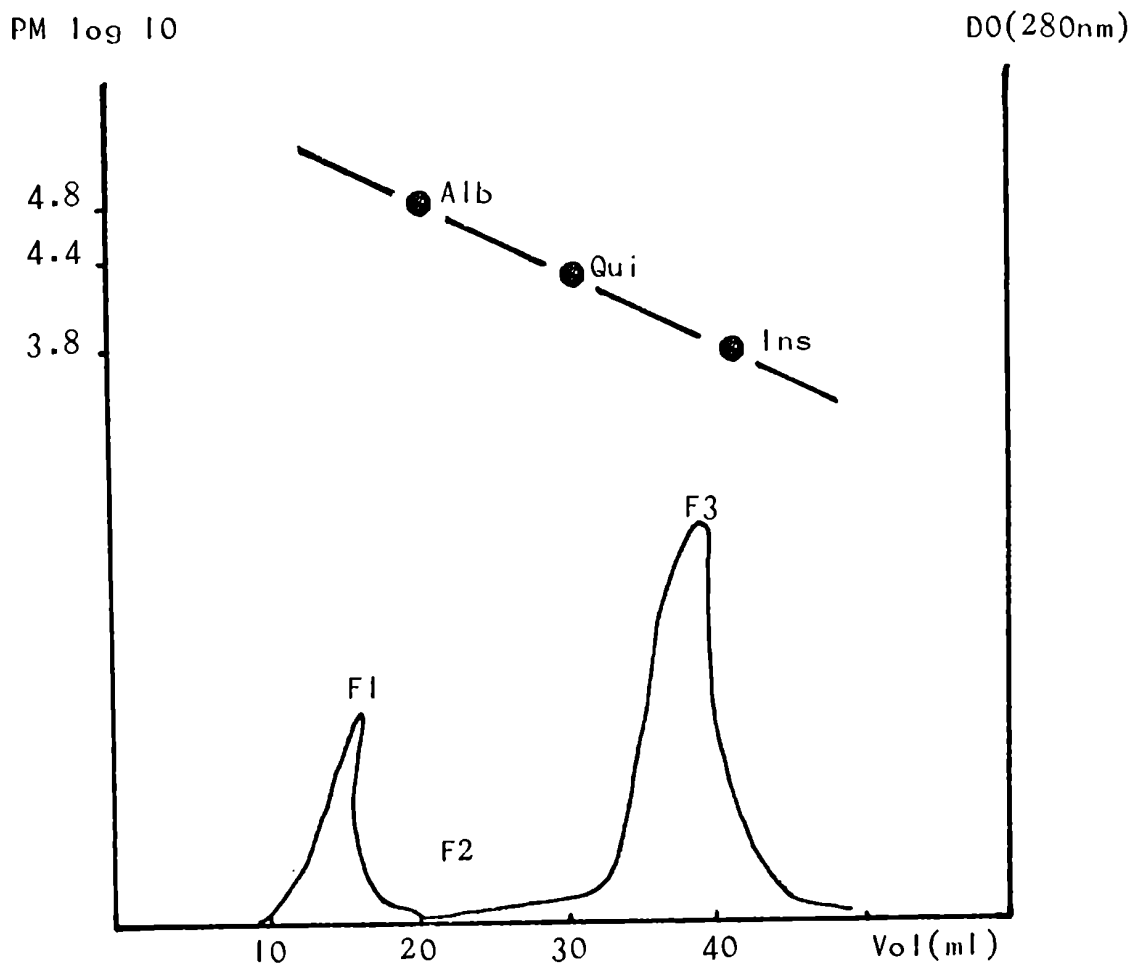
Watanabe y colaboradores (Watanabe, 1978) aislaron un factor inmunosupresor que tenía bajo PM en medios libres de SFB, pero de alto PM en medios con SFB. Ellos pudieron comprobar que este factor de bajo PM se une a una α -globulina en medios con suero y muestra así un mayor PM. En nuestro modelo esto no ocurre ya que todos los cultivos se realizaron en medios libres de suero por lo tanto la F1 misma tiene un PM alto.

Previamente encontramos que los linfocitos B eran

responsables de la exacerbación tumoral en estadios precoces (Eiján, 1987b). Relacionando esto con el peso molecular elevado de la primer fracción podemos pensar que anticuerpos o complejos inmunes pueden estar involucrados en dicha exacerbación tumoral, como sugieren otros autores (Havemann, 1980; Esparza, 1983, Doan, 1980).

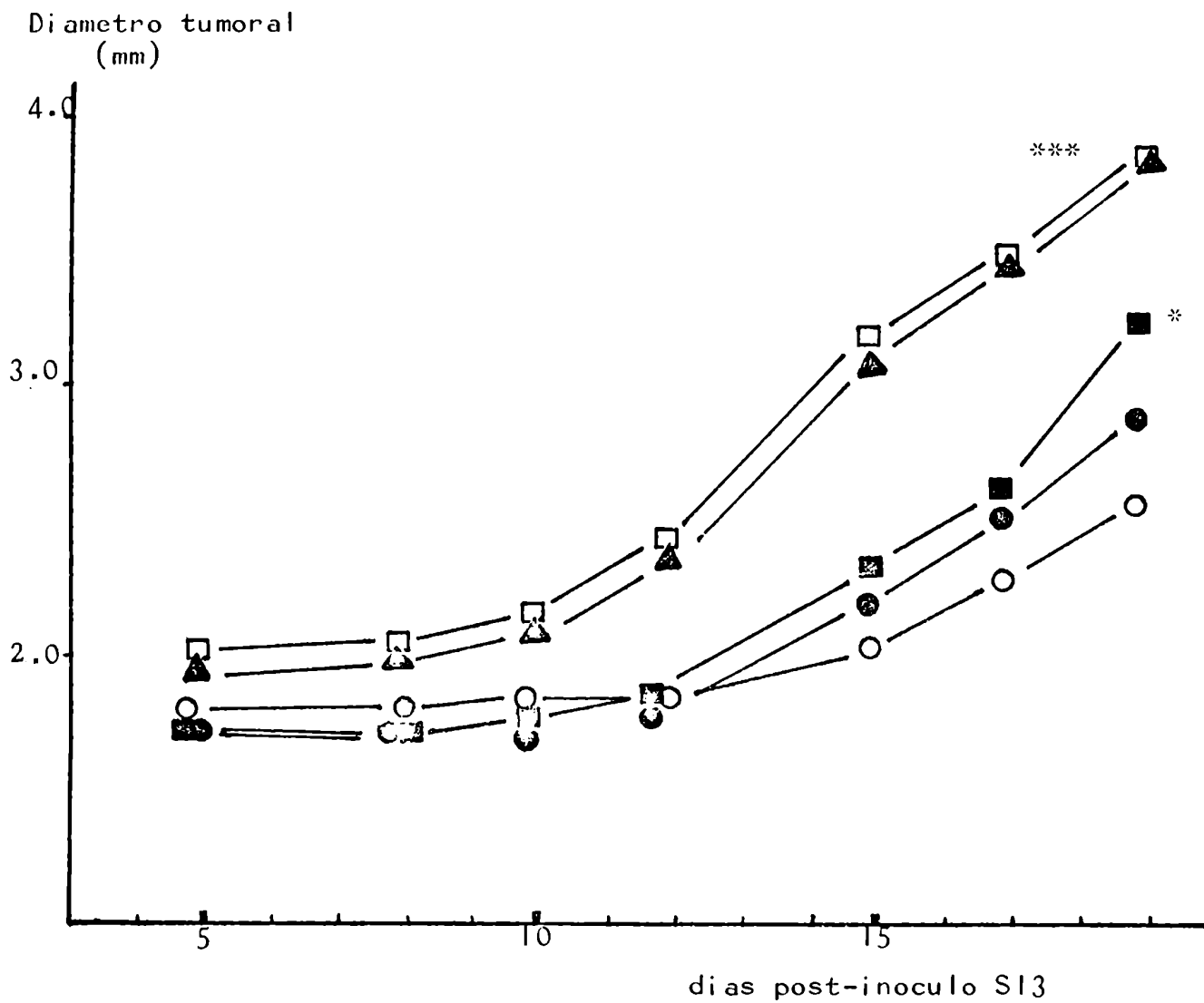
Esquema de elusion de un sobrenadante de cultivo de esplenocitos
fraccionado por Sephadex G100

FIGURA 1



Efecto del SoETB y sus fracciones sobre el crecimiento tumoral in vivo

FIGURA 2

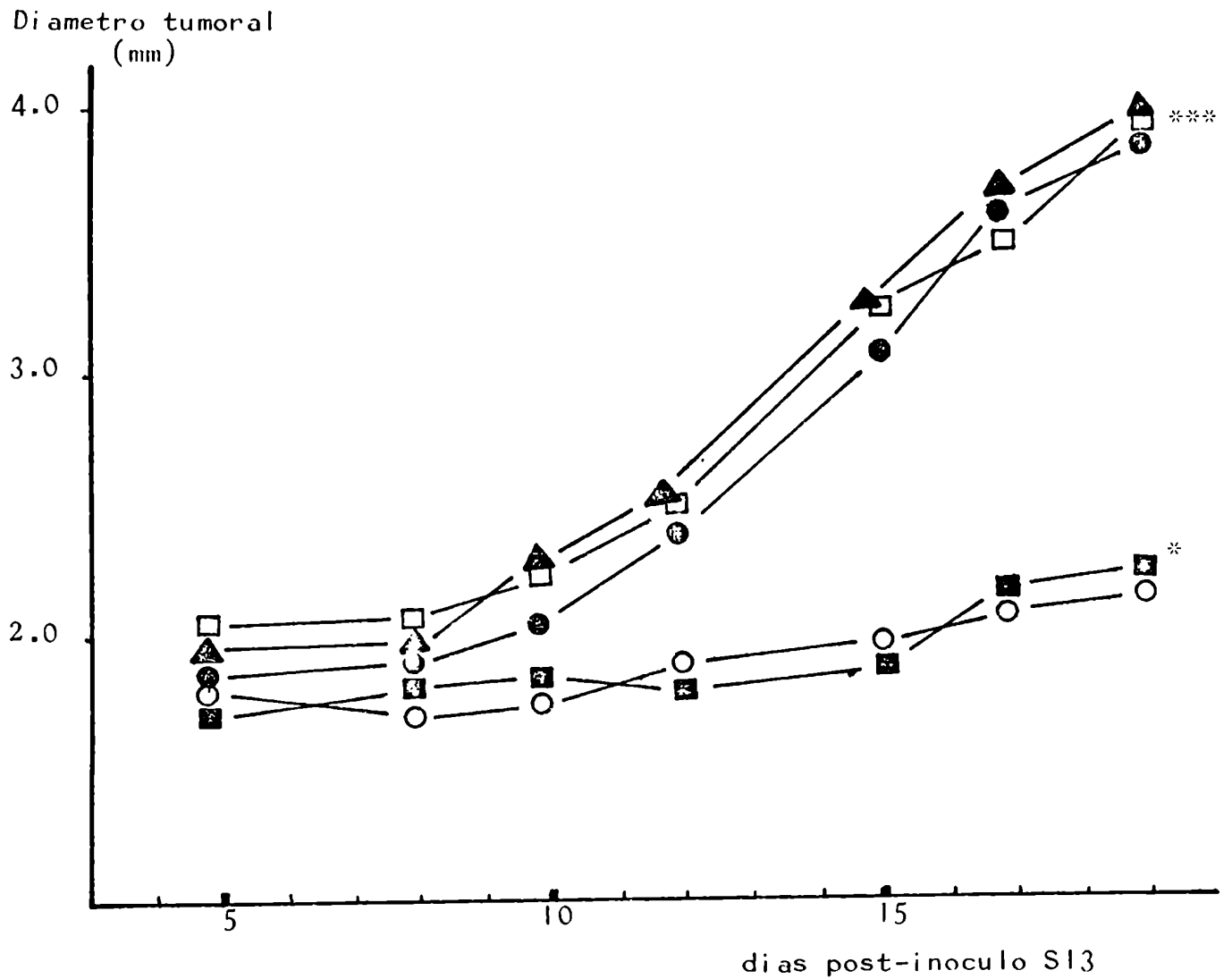


- control
- ▲ SoETB sin fraccionar
- F1-SoETB
- F2-SoETB
- F3-SoETB

p < 0.001 ; no significativo

Efecto del SoATB y sus fracciones sobre el crecimiento tumoral in vivo

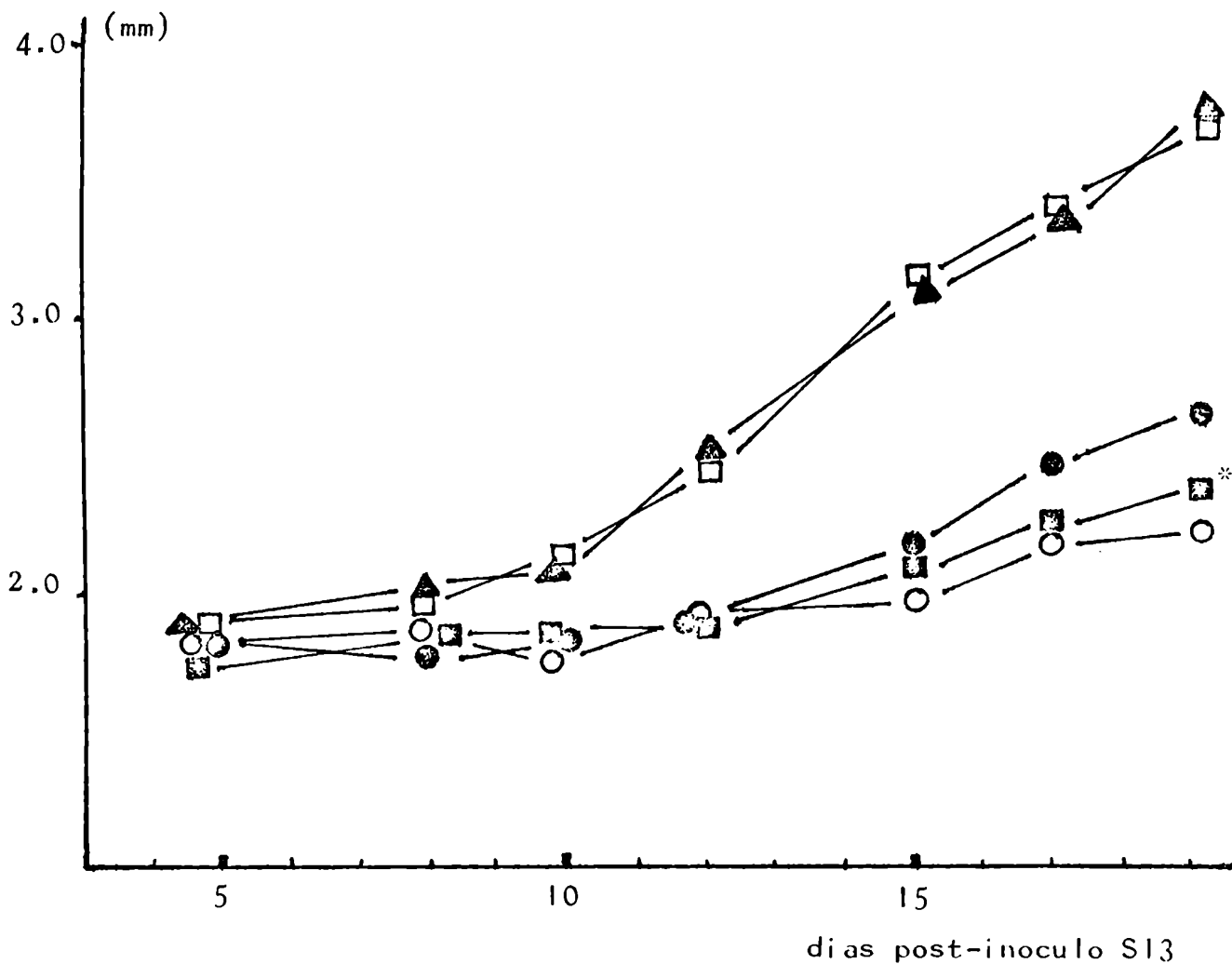
FIGURA 3



Efecto del SoATR y sus fracciones sobre el crecimiento tumoral in vivo

FIGURA 4

diametro tumoral



2.1.5. Neutralización de la actividad exacerbadora tumoral con antisueros xenogéneos

Diversos estudios tanto in vivo como in vitro han demostrado que, bajo ciertas condiciones, las células linfocíticas pueden comportarse estimulando el crecimiento tumoral (Chen, 1988; Ting, 1982).

La exaltación tumoral es atribuida a la presencia de factores que suprimen la respuesta inmune, liberados por linfocitos o por las mismas células tumorales (Koppi, 1983; Cheung, 1979; Medoff, 1986).

Se ha encontrado factores exacerbadores del tumor (EF) en medios condicionados por esplenocitos provenientes de portadores de tumor (Gabizon, 1976; Subramanian, 1978; Isakov, 1978, Maier, 1981). En nuestro modelo hemos encontrado dichos factores en sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor precoz y avanzado. La actividad facilitadora tumoral no fue detectada en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos normales (Jasnis, 1987).

Esplenocitos de un ETB liberan al medio de cultivo un FE de alto peso molecular (230 Kd). En estadios avanzados del crecimiento tumoral, la actividad exacerbadora se encontró en dos zonas (230 Kd y 100-10 Kd) (Eiján, 1989a).

En vista de estas diferencias preparamos sueros inmunes xenogéneos dirigidos contra SoETB, SoATB y SoBN con el objetivo de conocer algo más acerca de la naturaleza del

FE y en un intento de modular la actividad exacerbadora tumoral.

2.1.5.1. Materiales y Métodos

Tumor

Se usó el adenocarcinoma mamario S13 ya descrito en el punto 2.1.1.1.

Animales

Se usaron ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad apareados por sexo. Los animales fueron randomizados transplantados con tumor S13 para obtener los siguientes grupos: a) ETB, b) ATB y c) BN como grupo control.

La obtención de estos grupos se explicó en detalle en 2.1.1.1.

Suspensión de células tumorales: fue preparada como se describe en 2.1.1.1.

Sobrenadantes de cultivos de esplenocitos: Se preparan los sobrenadantes de esplenocitos de ETB, ATB, BN de la misma forma que se explicó en 2.1.1.1.

Preparación de los antisueros: Los sobrenadantes de esplenocitos que fueron conservados en forma liofilizada, se disol-

vieron en agua tal que quedaron concentrados cinco veces (5 mg de proteína/ml).

Para cualquiera de los tres antígenos se usó el mismo esquema de inmunización.

Los conejos se inocularon por vía i.m. con 1 ml de Ag emulsionado con 1 ml de CFA (Difco) una vez por semana durante un mes. Diez días luego de la última inoculación se tomó una pequeña muestra de sangre y se ensayó por el método de Ouchterlony (Ouchterlony, 1958) la aparición de bandas de precipitación Ag-Ab. Entonces los conejos recibieron tres inyecciones adicionales con volúmenes de 1.5 a 2.0 ml cada vez sin adyuvante espaciadas 3 días por vía i.p. e i.m. alternativamente.

Diez días luego de la última inyección los conejos se sangraron y el suero fue conservado liofilizado hasta su uso.

Un pool de suero de conejo normal (SCN) se usó como control.

Ensayo de actividad biológica

Ensayo de la actividad de los antisueros sobre el crecimiento tumoral

Los animales reciben 2 inyecciones (2.0 ml ip) de los diferentes sueros inmunes a los días -1 y 6. En el día ce

ro los ratones reciben 20×10^3 células S13 en la almohadilla plantar. Se registra el crecimiento tumoral, cada dos días.

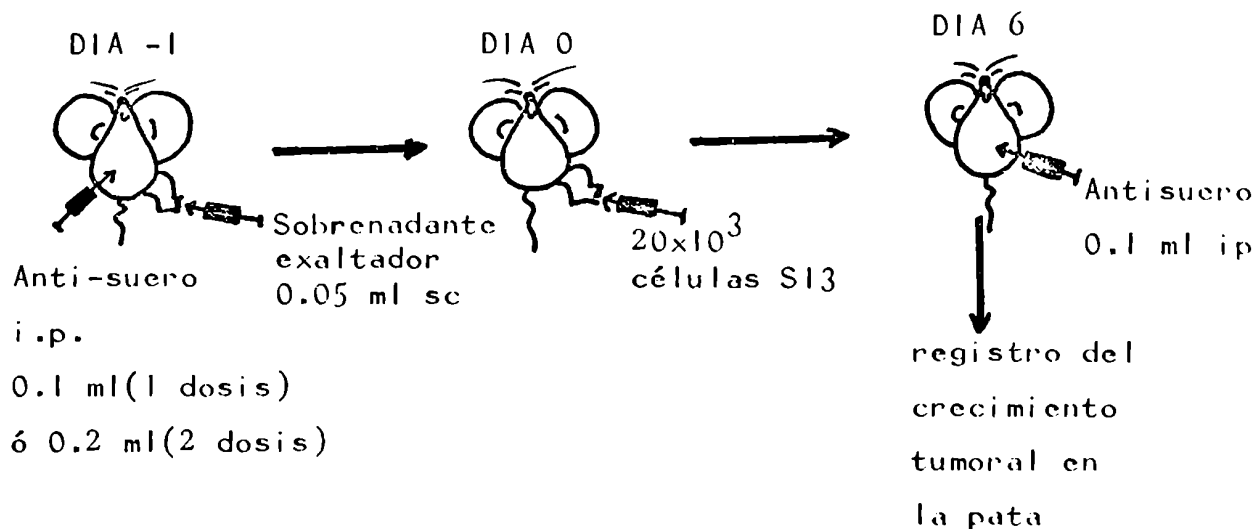
Los sueros fueron los siguientes:

- a) suero de conejo normal. (SCN).
- b) suero de conejo inmunizado con SoBN (Anti-SoBN).
- c) suero de conejo inmunizado con SoETB (Anti-SoETB).
- d) suero de conejo inmunizado con SoATB (Anti-SoATB).

Todos los experimentos fueron repetidos por lo menos tres veces y cada grupo experimental consta de 10 animales. Las comparaciones estadísticas fueron hechas con el test de Student.

Ensayo de la neutralización de la actividad exacerbadora: por los antisueros: Dado que los antisueros por sí solos no modifican el crecimiento tumoral in vivo, procedimos a estudiar su efecto sobre la actividad exacerbadora.

Los antisueros se inocularon en ratones que recibieron sobrenadantes exacerbadores según el protocolo que se muestra a continuación.



Se realizaron 3 series de experimentos.

El primero de ellos para estudiar la neutralización del SoETB por el Anti-SoETB. Por lo tanto todos los animales recibieron en el día -1, 0.05 ml de SoETB en la almohadilla plantal (sc). Los antisuero fueron administrados por via i.p. en los dias -1 y 6. Los grupos que constan de 10 ratones cada uno son los siguientes:

- a) Control exaltador: 0.05 ml SoETB + Suero de Conejo Normal (SCN) (día -1 y 6).
- b) Anti-SoETB (1 dosis): 0.05 ml SoETB (día -1) + 0.1 ml. Anti-SoETB (Día -1 y 6).
- c) Anti SoETB (2 dosis): 0.05 ml SoETB (día -1) + 0.2 ml Anti-SoETB (día -1) + 0.1 ml Anti-SoETB (día 6).
- d) Control del crecimiento tumoral: 0.05 ml medio 199 + 0.2 ml SCN (día -1) + 0.1 ml SCN (día 6).

Se incluyó un control adicional; con sobrenadante de esplenocitos de ratón normal (SoBN) para mostrar que no induce exacerbación tumoral (Fig. 1).

La segunda serie de experimentos se realizó según el mismo protocolo para estudiar la neutralización del SoATB con Anti-SoATB (Fig. 2).

La última serie de experimentos se realizó con el objeto de estudiar si existe neutralización cruzada. Por lo tanto se estudió la neutralización del SoETB con Anti-SoATB

y con Anti-SoBN y la neutralización del SoATB con Anti-SoETB y Anti-SoBN (Fig. 3 y 4)

Ensayos in vitro

Ensayo de citotoxicidad mediada por anticuerpo complemento dependiente: 10^6 esplenocitos provenientes de bazo de ratón normal (L-BN); de ratón portador de tumor precoz (L-ETB) y de ratón portador de tumor avanzado (L-ATB) se incubaron a 4°C durante 60 min con 0.1 ml de los antisueros xenogéneos inactivados (56°C 30 min) y diluidos 1:10 en medio TC199. Se usó la dilución 1:10 para los antisueros dado que a esta dilución no tenían citotoxicidad inespecífica.

Luego la suspensión de células fue centrifugada y re-suspendida en su volumen original con complemento de cobayo de baja toxicidad diluido 1:4. La mezcla fue incubada a 37°C por 60 min. La viabilidad celular se determinó por Tripan blue. El índice de citotoxicidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\% \text{ células muertas con Ab+C} - \% \text{ cel. muertas con C'}}{100 - \% \text{ cel. muertas con C'}} \times 100$$

La experiencia se realizó por duplicado y se repitió 3 veces con iguales conclusiones la tabla I muestra los resultados de una experiencia representativa.

Los resultados fueron evaluados por un ANOVA (test

de Tukey) y test de Student.

2.1.5.2. Resultados

Neutralización de la actividad exacerbadora por sueros inmunes Anti-sobrenadantes.

La figura 1 muestra que el Anti-SoETB es capaz de neutralizar in vivo la actividad exacerbadora del SoETB sólo cuando se emplea la dosis mayor del antisuero.

La figura 2 muestra que el Anti-SoATB neutraliza al SoATB tanto cuando se emplea la menor como la mayor dosis. Nosotros demostramos que los SoBN no exaltan el crecimiento tumoral, por lo tanto lo incluimos como control negativo. El suero de conejo normal no modifica ni el crecimiento tumoral ni la actividad exaltadora tumoral (Fig. 1 y 2).

Neutralización cruzada de la actividad exacerbadora tumoral por los inmuno sueros.

Dado que ambos antisueros fueron capaces de neutralizar la actividad exacerbadora de su propio antígeno, decidimos estudiar si neutralizan en forma cruzada. En este caso se usaron para todos los antisueros la dosis mayor. La figura 3 y 4 muestra que ambos antisueros dan reacción de

neutralización cruzada. También se ve que el antisuero dirigido contra SoBN neutraliza la actividad exacerbadora del SoETB y SoATB.

Citotoxicidad in vitro mediada por anticuerpos dependiente de complemento.

La tabla I muestra los resultados de una experiencia representativa de citotoxicidad con Ab.

Se puede observar que en principio el Anti-SoETB es más tóxico que el Anti-SoBN o Anti-SoATB ($p < 0.05$). Esto podría ser una característica intrínseca del antisuero, pero dado que no ocurren en ausencia del complemento, se descarta. Así, puede deberse a la presencia de mayor cantidad de Ab citotóxicos pero dependientes de complemento.

Es muy importante observar los resultados obtenidos con el Anti-SoETB sobre los linfocitos provenientes de diferentes fuentes. Se ve que el Anti-SoETB mata significativamente más linfocitos de BN que de ETB y ATB respectivamente. Esto podría estar indicando que en la superficie de los L-BN se encuentran ciertos factores que son liberados al medio de cultivo cuando los linfocitos provienen de un portador de tumor en estadio precoz. Entre las sustancias liberadas se encuentra el factor exaltador, ya que este antisuero in vivo es capaz de neutralizar esta actividad. Así el paso siguiente de este estudio es la purificación del Ab específica para

el factor exaltador.

2.1.5.3. Conclusión

Previamente demostramos que sobrenadantes de esplenocitos de portadores de tumor tienen actividad facilitadora del crecimiento tumoral. Esta actividad desaparece con diferente velocidad luego de la cirugía tumoral dependiendo del tamaño que el tumor tiene en ese momento (Jasnis, 1982; Oisgold-Dagá, 1981).

El objetivo de este estudio fue intentar una neutralización inmunológica de la actividad exacerbadora tumoral, así como también profundizar el mecanismo acerca del FE. Por lo tanto preparamos sueros inmunes xenogéneos contra los sobrenadantes exacerbadores y los ensayamos in vivo.

Cuando se inocularon los antisueros junto con las células tumorales observamos que no tienen efecto tóxico sobre los animales y que no afectan el crecimiento tumoral.

El paso siguiente fue la inoculación de los antisueros junto con los sobrenadantes con actividad exacerbadora. Observamos que el Anti-SoATB neutraliza la actividad exacerbadora del SoATB tanto con la dosis menor como con la mayor. Por el contrario el Anti-SoETB sólo neutraliza la actividad del SoETB cuando se emplea la dosis mayor. Estas diferencias entre ambos antisueros puede ser atribuida simplemente a una respuesta diferente de los conejos que sirvieron para la pre

paración de ambos antisueros. Alternativamente el SoATB puede ser más antigénico que SoETB y en consecuencia generar más anticuerpos en el conejo.

Cuando se realizaron estudios de neutralización en forma cruzada se observó que ambos antisueros son capaces de neutralizar tanto al SoETB como SoATB. Estos resultados sugieren que el FE/s presenta en ambos sobrenadantes es una misma entidad molecular o por lo menos tiene los mismos determinantes antigénicos. En vista de esto, podemos decir que la fracción de menor peso molecular presente en el SoATB con actividad exacerbadora (Eiján, 1989a) es un fragmento de la de mayor peso molecular.

Observamos, además, que el Anti-SoBN es capaz de neutralizar la actividad exacerbadora del SoETB y del SoATB. Por lo tanto el FE podría ser un componente normal que sólo se libera en las condiciones de cultivo cuando los esplenocitos provienen de un portador de tumor, ya que el SoBN no exagera el crecimiento tumoral. Alternativamente, dicho factor podría encontrarse en los SoBN, pero en tan pequeñas cantidades que no es suficiente para exagerar el tumor, pero se puede desencadenar un respuesta de anticuerpos en un conejo.

Varios investigadores (Putnam, 1985; Klein, 1985; Diament, 1985), informaron que el factor exacerbador es secretado y producido por la propias células tumorales. En nuestro modelo el FE es producido por los esplenocitos (Eiján,

1987a). Por lo tanto podríamos especular que el FE está presente en la superficie de linfocitos normales pero que se liberan en cultivo cuando los esplencitos son activados in vivo por la presencia del tumor, (Maier; 1982).

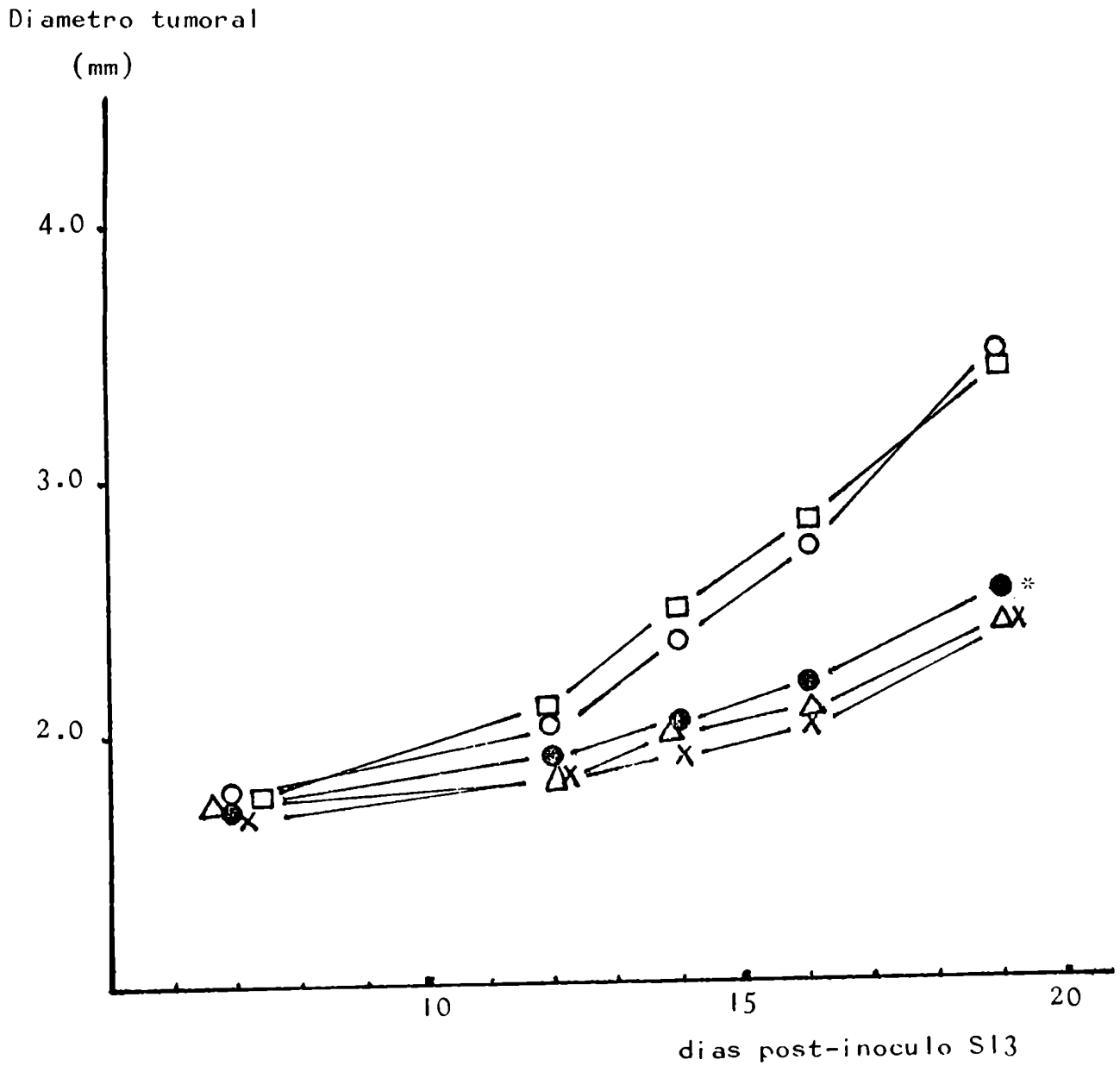
Esta hipótesis está en parte apoyada, por el ensayo de citotoxicidad que demuestra que el Anti-SoETB actúa más sobre linfocitos normales que sobre los de portadores de tumor. De todos modos esto es indicativo ya que es necesario un ensayo con anticuerpos purificados específicos para el FE.

Anteriormente demostramos que el FE no tiene un efecto directo sobre las células tumorales en cultivo (Kier Joffé, 1987). Por lo tanto se podría pensar que el FE actuaría como un regulador inmunológico.

Koppi (1984a), demostró que tales reguladores inmunológicos poseen determinantes antigénicos codificados por la región I de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad. Sería interesante estudiar esta posibilidad en nuestro modelo.

Neutralización in vivo del SoETB con Anti-SoETB

FIGURA I



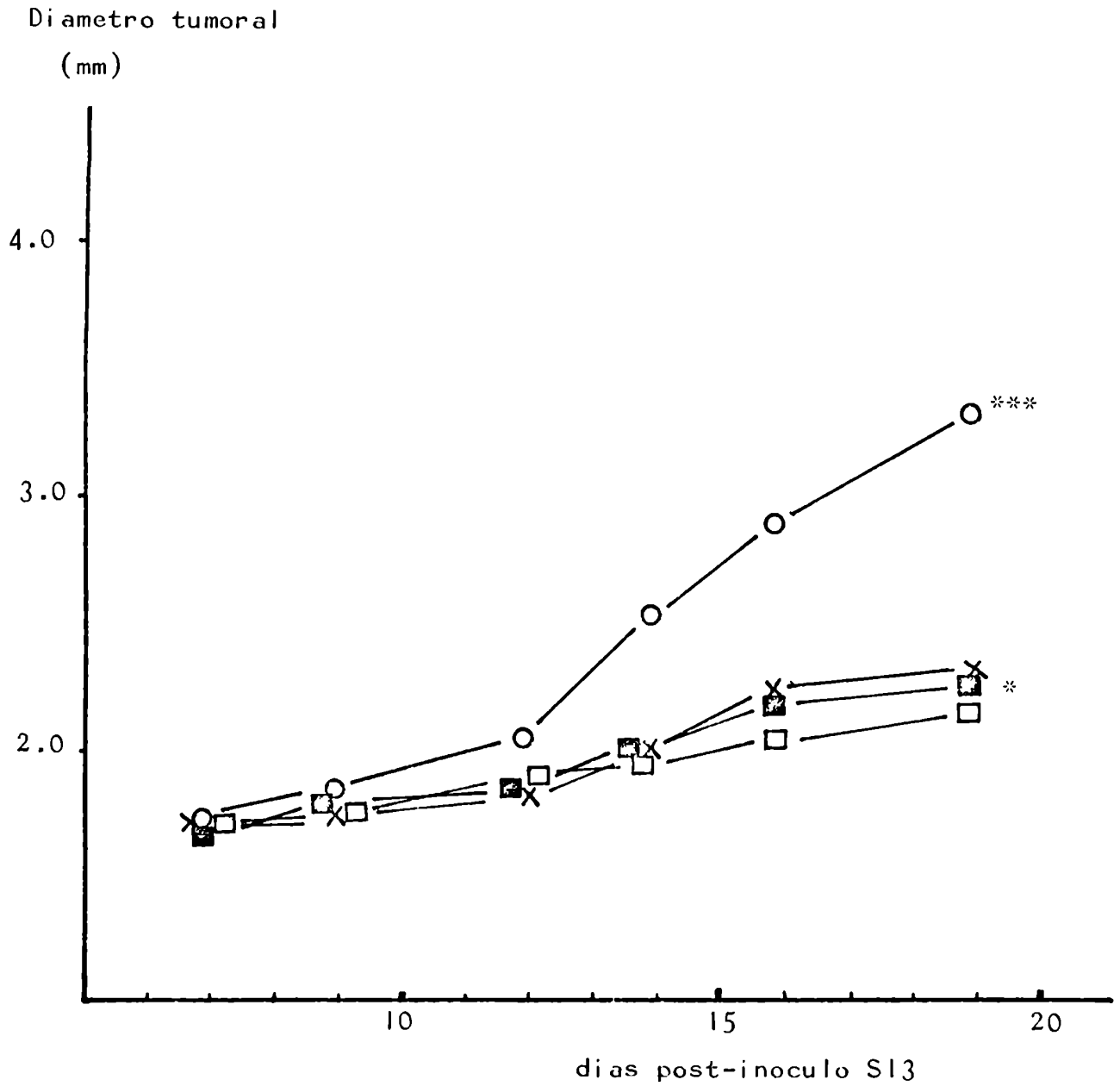
- X control
- SoETB
- SoETB + Anti-SoETB (1 dosis)
- SoETB + Anti-SoETB (2 dosis)
- △ SoBN

p < 0.001

no significativo

Neutralización in vivo del SoATB con Anti-SoATB

FIGURA 2



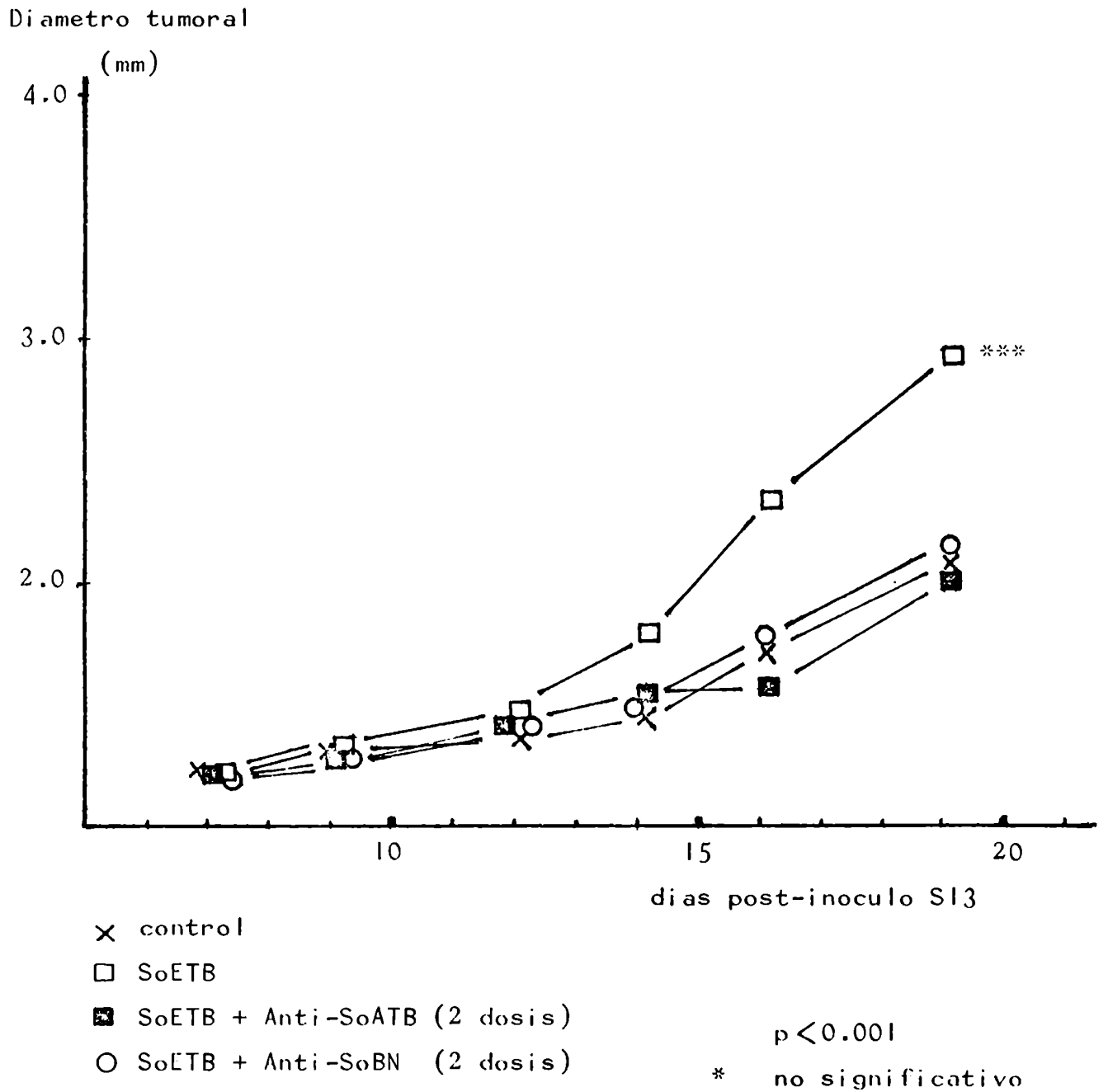
- X control
- O SoATB
- SoATB + AntiSoATB (1 dosis)
- SoATB + AntiSoATB (2 dosis)

*** p < 0.001

no significativo

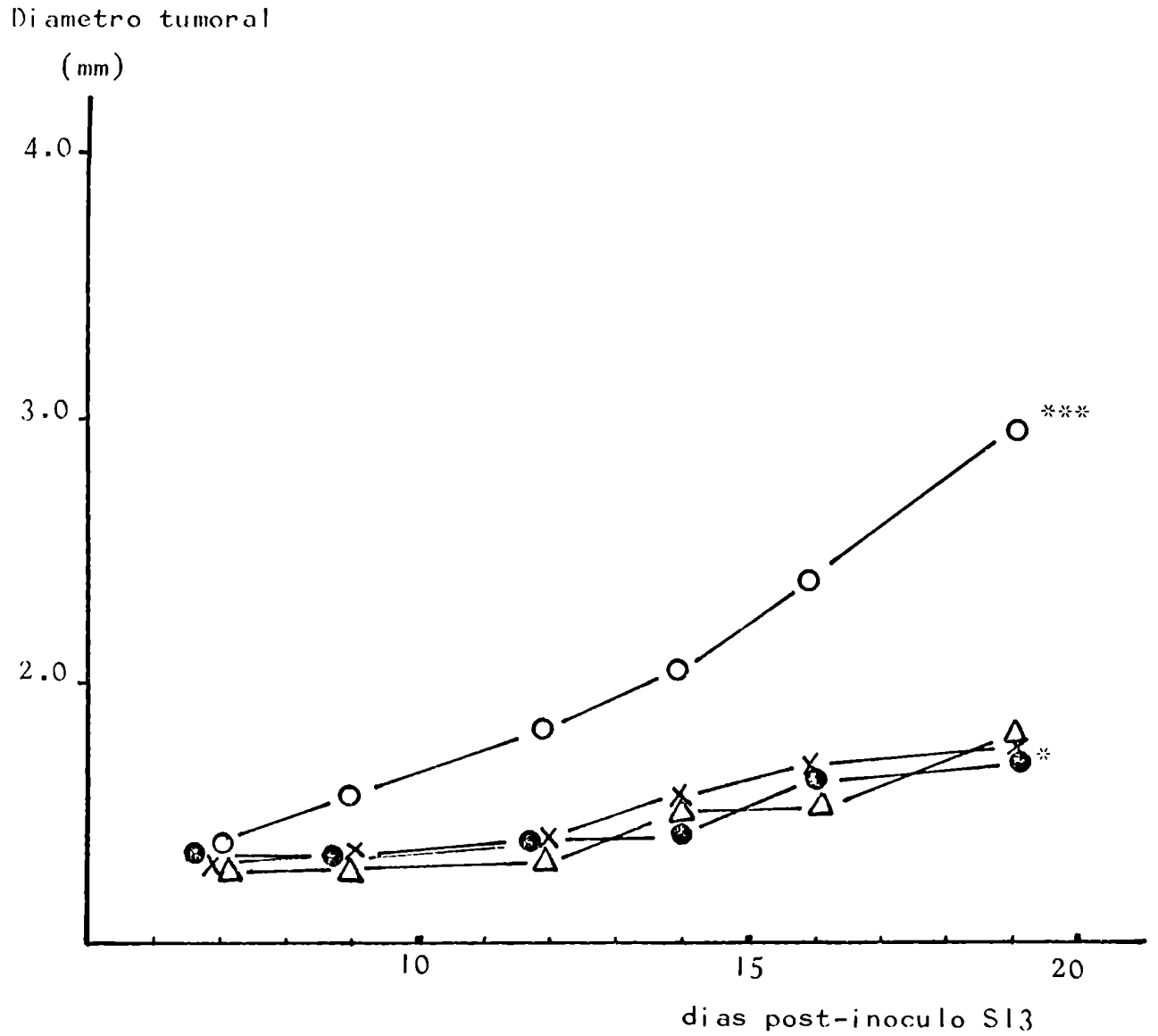
Neutralización in vivo del SoETB con Anti-SoATB y Anti-SoBN

FIGURA 3



Neutralización in vivo del SoATB con Anti-SoETB y Anti-SoBN

FIGURA 4



- x control
- o SoATB
- SoATB + Anti-SoETB (2 dosis)
- Δ SoATB + Anti-SoBN (2 dosis)

$p < 0.001$

no significativo

Ensayo de la citotoxicidad mediada por anticuerpos
dependiente de complemento

TABLA I

| | | ANTISUEROS | | |
|------------|-----|----------------|-----------------|----------------|
| | | Anti-BN | Anti-ETB | Anti-ATB |
| LINFOCITOS | BN | 13.5 \pm 6.5 | 73.0 \pm 4.0 | 20.0 \pm 1.0 |
| | ETB | 7.0 \pm 3.0 | 47.0 \pm 12.0 | 5.5 \pm 0.5 |
| | ATB | 12.5 \pm 5.5 | 37.5 \pm 8.5 | 7.5 \pm 0.5 |

$\bar{x} \pm DS$; n=2 ; * p < 0.05

2.1.6. Angiogénesis inducida por linfocitos (LIA)

La angiogénesis es un proceso que involucra no sólo el crecimiento de vasos preexistentes sino también la formación de nuevos vasos (Zawicki, 1981). Este es un fenómeno normal en tejidos en regeneración (Glaser, 1980; Gospodarowicz, 1978), en procesos inflamatorios y de hipersensibilidad tardía (Thakral, 1979). Por lo tanto muchos tejidos normales producen factores angiogénicos (Folkman, 1986; Federman, 1980; D'Amore, 1981).

El fenómeno de angiogénesis se observa también en condiciones patológicas como inflamaciones crónicas o patologías tumorales (Folkman, 1975b).

La capacidad de estimular el crecimiento de nuevos vasos es una propiedad fundamental de los tejidos tumorales frente a los normales que le dieron origen (Algire, 1945). Esto se debe a que la vascularización es indispensable para el crecimiento tumoral. Las células tumorales además de tener una acción directa sobre los vasos del huésped son capaces de activar a células del sistema inmune, quienes a su vez pueden inducir respuesta neovascular (Kaminsky, 1981; Polverini, 1977; Polverini, 1984).

Esplenocitos inyectados intradermicamente en combinaciones alogénicas o semialogénicas evocó una compleja respuesta neovascular llamada angiogénesis inducida por linfocitos (LIA) (Auerbach, 1976). Además, células de baso de

ratones portadores de tumor, también inducen una fuerte respuesta neovascular aún en combinaciones singeneicas. Esta respuesta se denomina Angiogénesis inducida por linfocitos singeneicos (SLIA) y aparece muy tempranamente durante el desarrollo tumoral (Davel, 1984; Davel, 1985; Miguez, 1986).

A continuación discutiremos brevemente los pasos de la angiogénesis inducida por linfocitos y en particular, en patologías tumorales. Finalmente relacionaremos el SLIA con factores que intervienen en la exacerbación tumoral mediada por el sistema inmune.

Proceso angiogénico

El proceso angiogénico sigue una serie de pasos que son los mismos aunque el agente desencadenante sea diferente (Zetter, 1981). Los nuevos vasos sanguíneos crecen a partir de vénulas o de capilares, nunca lo hacen a partir de vasos mayores.

Los pasos son los siguientes:

- a) Las células endoteliales reciben el estímulo angiogénico y segregan altas concentraciones de colagenasa y activador de plasminógeno (Ausprunk, 1977; Moscatelli, 1981), produciendo así la degradación de la membrana basal del endotelio capilar.
- b) Migración de las células endoteliales hacia la zona del estímulo angiogénico y alineación de estas en forma bipolar

(Gross, 1983).

c- Formación del lumen (Nicosia, 1983).

d- Comienzan a dividirse las células de la parte media, mientras que las apicales siguen migrando.

e- Los brotes vasculares se anastomosan formando rulos y lentamente comienza el flujo sanguíneo en el interior de los rulos.

f- Aparecen pericitos a lo largo de todo el capilar y se sintetiza nueva membrana basal.

Sistemas empleados para estudiar la angiogénesis.

a) Cámaras transparentes: fueron utilizadas tanto para estudios de angiogénesis por procesos inflamatorios (Sandison, 1924; Clark, 1930) como para estudios de angiogénesis tumoral (Algire, 1943; Algire, 1945).

Se diseñaron distintos tipos de cámaras que podían ser implantadas en diferentes lugares anatómicos de animales de experimentación, con la gran ventaja de que el tumor permanece separado del animal por una membrana (Sanders, 1964; Greenblat, 1968).

b) Membrana corioalantoidea de embrión de pollo (MCA): es un sistema ampliamente usado para el estudio de la angiogénesis. Para exponer la MCA es necesario formar una cámara de aire artificial en el diámetro mayor del huevo y luego se realiza una abertura en la cáscara (Ausprunk, 1975; Auerbach, 1974)

y se apoya el tumor sobre la MCA y se cierra la cáscara. La respuesta vascular es visible entre las 48 y 72 horas.

Esta técnica se usa para el estudio de muestras sólidas o en solución. Tiene la ventaja de ser sencilla y poco costosa y la desventaja de que no puede usarse para cuantificar sino que la respuesta es positiva o negativa (Folkman, 1975a), la técnica es más confiable cuando se realiza como titulación de punto final.

Esta técnica también puede ser usada para ensayos de inhibición de la angiogénesis (Barnhill, 1983; Castellot, 1982; Pliskin, 1980; Burgos, 1983; Sariola, 1983; Luty, 1983; Vu, 1985).

Tiene una desventaja adicional y es que puede dar falsos positivos por reacciones inflamatorias inespecíficas de la MCA (Jakob, 1978; Einsenstein, 1973).

c) Ensayo sobre córnea de conejo en una región ocular avascular. En estos casos se usan polímeros de liberación lenta especialmente para el estudio de angiogénesis con extractos acelulares.

Los polimeros usados son: poli-(2-hidroximetil-metacrilato) y etilen-vinil-acetato, que permite la difusión lenta aún de macromoléculas. (Langer, 1976).

d) Ensayos con células endoteliales: se han desarrollado cultivos de células endoteliales para determinar primero su emigración y luego la proliferación frente a estímulos angiogénicos.

Los estudios de migración se pueden realizar en las conocidas cámaras de Boyden o por fagocitosis de oro coloidal (Zetter, 1980) o por migración en geles de agarosa (Alessandri, 1983). Los ensayos de proliferación frente al estímulo de diferentes extractos se realizan por la incorporación de precursores marcados (Ness, 1981; Bowman, 1981; Davison, 1983; Olander, 1982).

e) Ensayos para medir angiogenesis inducida por linfocitos: existen dos ensayos de angiogénesis inducida por linfocitos. Estos son, el ensayo alogeneico (Auerbach, 1979) que se realiza en ratones irradiados y el ensayo singeneico (Davel, 1984) que se realiza en animales sin irradiar. El ensayo se realiza inoculando linfocitos inmunocompetentes intradermicamente en la piel del ratón. Luego de un tiempo se sacrifican los animales y se cuantifican la densidad de nuevos vasos bajo lupa.

Inductores de la actividad angiogénica.

La iniciación del proceso angiogénico es el resultado de varios factores que interactúan a diferentes niveles un factor quimiotáxico y un factor de multiplicación celular endotelial, para desencadenar la proliferación de los vasos sanguíneos. Por lo tanto muchos de los factores de crecimiento celular tienen en alguna medida actividad angiogénica ya que en general son mitogénicos, pero los más específicos

son una familia de factores que tienen afinidad por la heparina, como el FGF (fibroblasto growth factor), (Lobb, 1986; Thomas, 1986; Thomas, 1984; Baird, 1985; Gospodarowicz, 1985; Presta, 1986; Schreiber, 1985; Jaye, 1986; Mergia, 1986).

b) factores de crecimiento de células endoteliales (ECGF) se presentan bajo dos formas α y β , tienen alguna homología con el FGF (Burgess, 1986).

c) Factores de crecimiento epidérmico (EGF) es producido por la glándula salival del ratón macho. Tiene capacidad mitogénica y es potenciado por la insulina (Rall, 1985; Oka, 1983; Weissman, 1983).

d) Factores de crecimiento transformantes (TGF) son una gran variedad de factores con diferentes características y con distintos receptores celulares. Tienen en común su capacidad de inducir transformación celular. Se han descrito muchos TGFs siendo los más comunes el α y el β (Hirai, 1983; Yamahok, 1984).

e) Factor de crecimiento aislado de plaquetas (PDGF) es uno de los mitógenos más potentes que se encuentra en el plasma sanguíneo. Tiene actividad quimiotáctica para diferentes células (Seppa, 1982).

f) Factor necrótico tumoral (TNF), es una linfoquina, que existe bajo dos formas TNF- α producido por macrófagos activados, y TNF- β liberado por linfocitos. El TNF- α induce la formación de vasos in vivo y la quimotaxis in vitro. Esta linfoquina tiene además efecto citotóxico sobre células neoplásicas (Stolpen, 1986; Sato, 1986; Leibovich, 1987).

Factor angiogénico tumoral

Folkman aisló en 1971 a partir de extractos tumorales un producto que denominó factor angiogénico tumoral (TAF). Este compuesto también estimula células endoteliales y activa procollagenasas promoviendo la degradación de membranas basales (Folkman, 1971; Weiss, 1979; Weiss, 1983).

Otras proteínas que intervienen en procesos de coagulación y regeneración de tejidos son potenciales reguladores de la angiogénesis. Podemos nombrar al activador de plasminógeno, fibrina, fibronectina, etc. (Gross, 1982; Ali, 1978; Vasalli, 1963).

Inhibidores de la angiogénesis.

La angiogénesis como cualquier evento fisiológico tiene un ciclo regulatorio. Así, los factores inductores están balanceados por factores inhibidores. Aparentemente en el plasma circulan compuestos con actividad angiostática por ejemplo han demostrado tener actividad antiangiogénica la combinación de heparina e hidrocortisona; TGF- β e IFN- γ (Folkman, 1983; Ozanne, 1982; Todaro, 1982) los dos últimos actúan inhibiendo en particular la proliferación de células endoteliales.

Angiogénesis inducida por componentes del sistema Inmune.

La angiogénesis como se explicó anteriormente es un complejo mecanismo en cascada que actúa directamente e indirectamente. En particular se analizará aquí la angiogénesis producida por células del sistema inmune.

Angiogénesis inducida por macrófagos

En tejidos dañados donde aparecen condiciones de hipoxia, como por ejemplo heridas, inflamación disminución de flujo sanguíneo o tumores, se promueve la rápida migración de macrófagos.

Estas células promueven una respuesta vascular que restaura las condiciones normales (Knighton, 1981; Thakral, 1979; Polverini, 1977). Por ejemplo el TNF- α producido por macrófagos activados estimula la respuesta angiogénica, esto se comprobó utilizando anticuerpos que anulan su acción (Leibovich, 1987).

En este proceso intervendrían también las plaquetas quienes con la liberación de TGF- β serían las responsables de la quimiotaxis sobre los monocitos

Angiogénesis inducida por mastocitos.

Los mastocitos son una de las principales células involucradas en la respuesta inflamatoria a pesar de no ser directamente angiogénicos favorecen el rápido crecimiento vascular, probablemente por la liberación de factores quimiotácticos (Azizkhan, 1980; Kessler, 1976).

Angiogénesis inducida por linfocitos.

Se ha demostrado que la transferencia de linfocitos competentes en huéspedes irradiados tanto alogeneicos como semialogeneicos, produce una respuesta de proliferación vascular. Esta reacción recibió el nombre de angiogénesis inducida por linfocitos (LIA). El LIA no se manifiesta en combinaciones singeneicas o en combinaciones semialogeneicas donde el donante es el híbrido de primera generación y el receptor es de la cepa parental (Auerbach, 1976). Esto muestra que esta reacción se obtiene cuando existen diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad entre huésped y donador. Se ha demostrado además que las células responsables de la inducción del LIA son células T productoras de linfoquinas (Rohen, 1981).

Las Dras. Davel y Miguez han extendido la técnica del LIA a un modelo singeneico. Han demostrado que aparece una respuesta angiogénica en un sistema singeneico (SLIA)

cuando el donador de linfocitos es un portador de tumor (Davel, 1984; Miguez, 1986).

Es posible que tanto el LIA como el SLIA sean mecanismos mediados por linfoquinas angiogénicas. Así, es probable que enfermedades diferentes que involucren procesos de neovascularización tengan en común la liberación de dichas linfoquinas. Por lo tanto nos concentraremos en el estudio del SLIA mediado por productos solubles liberados por los linfocitos en cultivo. Nos propusimos estudiar particularmente la relación entre la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Como demostramos anteriormente los medios condicionados por esplenocitos de portadores de tumor exacerbaban el crecimiento del mismo tumor.

Davel (Davel, 1984) demostró que los esplenocitos de ratones portadores de tumor despertaban una fuerte respuesta angiogénica. Dado que la angiogénesis es uno de los procesos que facilitan el desarrollo tumoral, investigamos si este fenómeno está mediado por productos solubles. Estudiamos además que ocurre luego de la cirugía tumoral y finalmente cual es la población responsable de la inducción del SLIA.

Por un problema técnico los medios condicionados no pueden ser directamente inoculados en el ensayo de SLIA ya que difunden. Por lo tanto los sobrenadantes fueron transferidos a ratones normales, quienes fueron luego los donores

de esplenocitos. Esta transferencia se realizó porque como mostramos anteriormente (en sección 2.1.1.2.) la actividad exacerbadora puede ser transferida a ratones normales

2.1.6.1. Materiales y Métodos

Tumor

Se usó un adenocarcinoma mamario (S13) singeneico de la cepa BALB/c con mediana capacidad metastásica en pulmón.

Animales

Los animales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto "A.H.Roffo". Se usaron ratones de 2-3 meses de la cepa BALB/c.

Los ratones recibieron el tumor S13 por transplante subcutáneo con trocar y se dividieron en cinco grupos: ETB ; ATB; ETR; ATR y normales como se detalló en el punto 2.1.1.1.

Procesamiento de los bazos: el procesamiento de los bazos y la obtención de los sobrenadantes de cada uno de los cinco grupos se realizó con la misma metodología descrita en 2.1.1.1.

Eliminación de células T por tratamiento con suero Anti-Thy1.2: Para estudiar cual es la población celular comprometida en la

inducción de SLIA, los esplenocitos fueron tratados con Anti-Thy 1.2 y complemento, previo a ser cultivados. La metodología se discute detalladamente en la sección 2.1.3.1.

Separación de células de bazo por columna de lana de nailon.

La técnica se explica en detalle en el punto 2.1.3.1. Esta técnica se emplea para enriquecer la suspensión de esplenocitos en LT, ya que LB y macrófagos quedan retenidos en la columna de lana de nailon.

El rendimiento de células T luego de dos pasajes por columna de lana de nailon fue del 20%.

La pureza de las células fue del 50-55% en el primer pasaje y del 80% luego del segundo pasaje.

Transferencia de los sobrenadantes a ratones normales.

Los sobrenadantes de bazo de cualquiera de los cinco grupos se transfirieron a ratones normales por inoculación de 0.1 ml por vía intraperitoneal 24 hs antes de extirpar los bazos.

Preparación de la suspensión de bazo de los animales transferidos.

La suspensión de esplenocitos se preparó por dispersión mecánica como se indica en el punto anterior. Las suspensiones usadas para el ensayo de SLIA tienen una densidad de 40×10^6 células/ml.

Ensayo de SLIA: Esplenocitos de ratones transferidos con los distintos sobrenadantes se ajustaron a una concentración de 40×10^6 células/ml. Se inyectaron intradermicamente en ratones normales en un volumen de 0.1 ml. Estos ratones denominados receptores, reciben dos inyecciones bilaterales de las células.

Cinco días más tarde los receptores se sacrifican, la piel se separa cuidadosamente y se observa bajo lupa con un aumento $\times 6.4$.

Un esquema del ensayo se muestra en la figura 1.

Cuantificación de la vascularización: La cuantificación se realiza midiendo la densidad de vasos. El procedimiento es el siguiente: se fotografía el sitio de inoculación. Luego de proyecta en una pantalla reticulada donde cada cuadrado representan 1 mm^2 de piel. El area total medida es de 216 mm^2 . Se cuenta el número de vasos en la pantalla por técnica de doble ciego y se calcula la densidad(d) por la siguiente fórmula:

$$d = \frac{\sum \text{número de vasos por cuadrado}}{\text{número de cuadrados}}$$

Análisis estadístico: los resultados son evaluados en todos los casos por el test de student. Los experimentos se realizaron por lo menos tres veces.

2.1.6.2. Resultados

Actividad angiogénica de los sobrenadantes de bazo de ratones portadores y exportadores de tumor

Los resultados correspondientes se encuentran en la Tabla I.

Puede verse claramente que los sobrenadantes de bazo de portadores de tumor (SoETB y SoATB) tienen factores solubles capaces de inducir angiogénesis en receptores normales.

Luego de la cirugía tumoral el fenómeno es diferente. Si la cirugía se realiza en una etapa precoz, los sobrenadantes (SoETR) ya no manifiestan actividad angiogénica, pero si la cirugía se realiza en una etapa avanzada (SoATR), si podemos encontrar la actividad angiogénica. Esto es muy sugestivo ya que podemos observar que es un fenómeno que en principio corre en forma paralela con la exacerbación tumoral.

Población celular responsable de la inducción del SLIA en sobrenadantes de bazo de portadores de tumor.

En la Tabla 2 se muestran los resultados. En este caso no se separaron en ETB y ATB debido a que tenían igual comportamiento.

Se ve claramente que la población celular responsable de la inducción del SLIA es la de linfocitos T. Las diferencia observada entre la población no tratada y la enriquecida en LT si bien no es significativa podría estar indicando que los macrófagos juegan un papel en esta respuesta.

Además comparando estos resultados con los mostrados anteriormente de exacerbación tumoral vemos que la actividad angiogénica es un factor más involucrado en la exacerbación pero no el único. Esto puede deducirse del hecho de que la actividad exacerbadora está mediada tanto por LT como por T en ETB y por LT en ATB mientras que la actividad angiogénica está mediada por LT en los dos estadios tumorales.

2.1.6.3. Conclusión

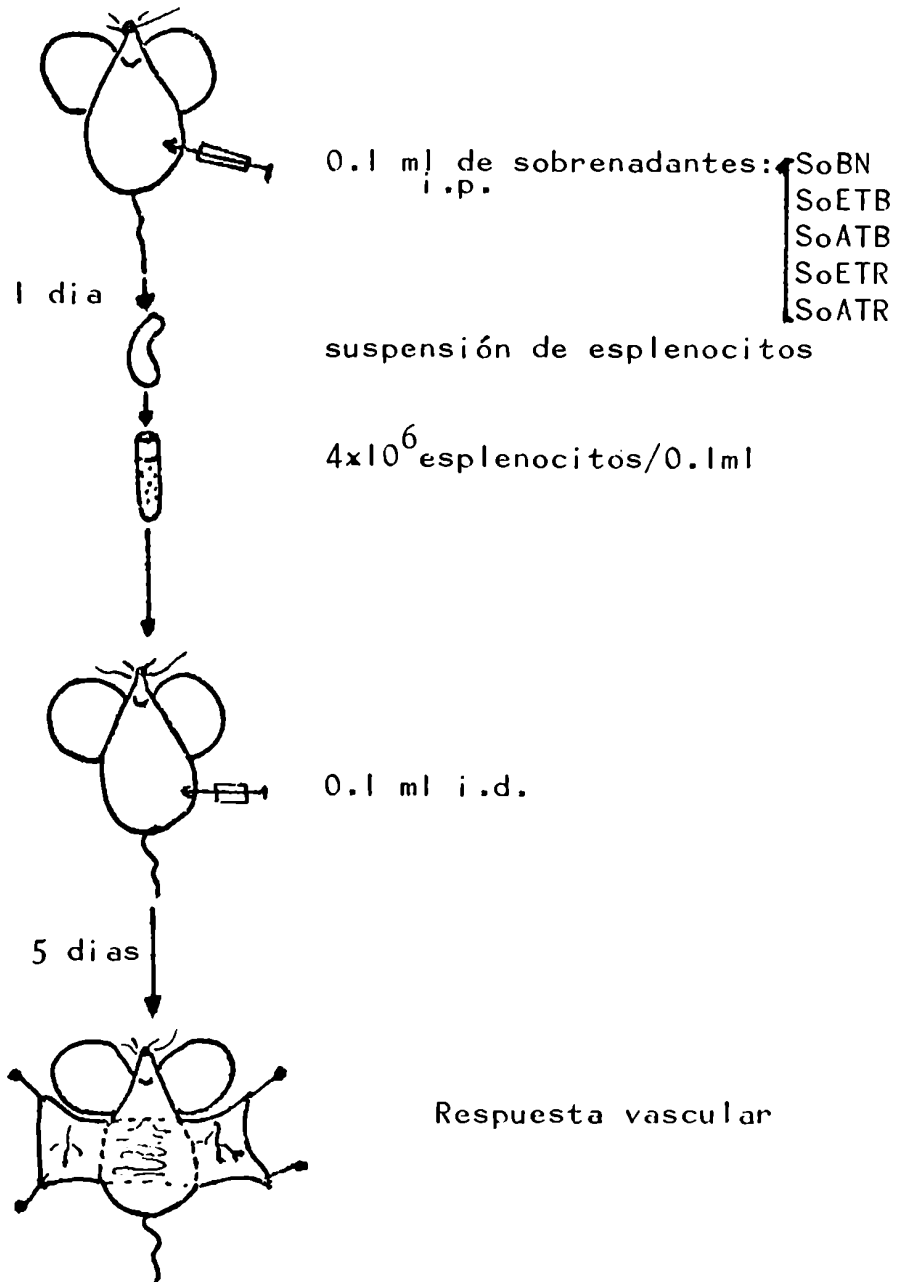
Se desprende de los resultados que la actividad angiogénica está mediada por factores solubles. Estos factores son liberados en las condiciones de cultivo por los esplenocitos de portadores de tumor y no por esplenocitos normales.

Los factores angiogénicos desaparecen de los medios condicionados luego de la cirugía de un tumor precoz, pero cuando se opera un tumor avanzado no. Este comportamiento es similar al que ocurre con la actividad exacerbadora, por lo tanto se podría inferir que entre los factores que favorecen el crecimiento tumoral se encuentran los factores angiogénicos.

Finalmente demostramos que los linfocitos T son los responsables de la liberación de dichos factores.

Esquema de la transferencia de sobrenadantes para el ensayo de S-LIA

FIGURA 1



Actividad S-LIA en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones portadores de tumor.Efecto de la cirugía tumoral

TABLA I

| Esplenocitos de ratones transferidos con: | número de sitios de inoculación (n) | Densidad de vasos/mm ² $\bar{X} \pm DS$ |
|---|-------------------------------------|---|
| SoBN | 13 | 1.76 \pm 0.09 |
| SoETB | 15 | 4.10 \pm 0.09*** |
| SoATB | 14 | 4.22 \pm 0.32*** |
| SoETR | 13 | 1.62 \pm 0.06* |
| SoATR | 11 | 3.85 \pm 0.07*** |

*** p < 0.001 ; no significativo

Población celular responsable de la liberación de factores
con actividad S-LIA

TABLA 2

| Esplenocitos de ratones transferidos con: | número de sitios de inoculación (n) | Densidad de vasos/mm ² $\bar{X} \pm DS$ |
|---|---|--|
| SoBN | 16 | 1.76 \pm 0.08 |
| SoETB ó SoATB | 16 | 4.16 \pm 0.09*** |
| SoETB ó SoATB enriquezido en LT | 11 | 3.72 \pm 0.09*** |
| SoETB ó SoATB enriquezido en LnoT | 14 | 1.87 \pm 0.05* |

*** $p < 0.001$; * no significativo

2.2. Exacerbación del crecimiento tumoral por factores séricos: Complejos inmunes circulantes.

Complejos inmunes Ag-Ab resultan de uniones no covalentes entre un Ag y su Ab específico.

La formación de complejos inmunes circulantes (CIC) representa la forma fisiológica normal para eliminar Ag foráneos. Estudios in vivo e in vitro han suministrado más información sobre mecanismos y factores involucrados en la formación, localización, depósito y fagocitosis de los CIC, así como también la participación de ellos en reacciones inflamatorias (Salinas, 1985; Salinas, 1983).

Los CIC juegan un rol importante en la modulación de la respuesta inmune humoral y celular por su interacción con subpoblaciones T, B, células "natural killer" y macrófagos (Leslie, 1986; Ptak, 1985; Theofilopoulos, 1980; Rossen, 1978; Oberbarnscheidt, 1978). La modulación de la respuesta inmune por CIC está mediada principalmente via receptores celulares para Fc o complemento y sus efectos pueden ser exaltadores o inhibidores tanto de la respuesta humoral como de la celular (Salinas, 1985).

El desarrollo de nuevas técnicas más sensibles para la detección de CIC ha permitido importantes avances en la comprensión de enfermedades mediadas por ellos, tales como artritis reumatoidea y glomerulonefritis (Zubler, 1978; Mc-Duffie, 1978). También se han determinado los niveles de

CIC en diversas patologías encontrándose correlaciones positivas (Lambert, 1978; Carpentier, 1977; Doe, 1973; Lockwood, 1977) en algunos casos. A pesar de las correlaciones encontradas, las evidencias no han sido tan contundentes como para ser empleadas como desiciones terapeuticas. (Nydegger, 1977; Pussell, 1978)

Algunos ensayos permiten la aislación y caracterización de los CIC, lográndose así la identificación del Ag en algunas patologías humanas. Esto puede permitir el diagnóstico de algunas infecciones subclínicas como por ejemplo cultivos negativos en endocarditis bacterianas subagudas o la detección e identificación de algunas patologías tumorales.

Aquí nos vamos a referir a las patologías tumorales. Los desórdenes inmunológicos en patologías tumorales que involucran CIC dependen de varios factores tales como tamaño, cantidad, volumen y composición de los mismos. Son de importancia los mecanismos involucrados en la formación, remoción y deposición de los CIC, así como también la inducción de respuesta inflamatoria y la regulación de la inmunidad humoral y celular.

Discutiremos brevemente los distintos pasos de la formación del complejo inmune Ag-Ab, para pasar luego a la descripción de las diferentes técnicas para la determinación de los complejos. Finalmente se discutirá los resultados presentados por otros investigadores en patologías tumorales, comparando con los resultados presentados por nuestro grupo de trabajo.

Inmunoquímica de los CIC.

El conocimiento de la inmunoquímica de los CIC es importante ya que su composición molecular puede afectar la detección de los mismos. Además la circulación de los CIC depende mucho de su tamaño molecular.

El tamaño y composición de los CIC depende de propiedades fisicoquímicas tanto del Ag como del Ab, así como también de las concentraciones relativas de ambos.

Antígenos y anticuerpos interactúan entre sí en circulación estableciendo un sistema dinámico de formación de CIC y eliminación por el sistema retículo endotelial o depositándose en los tejidos (Lambert, 1978).

Explicaré brevemente que factores pueden afectar el tamaño y composición de los CIC, para luego discutir las limitaciones de las técnicas de medición.

a) Valencia de Ag y Ab: La valencia tanto del Ag como del Ab es importante para determinar la composición molecular del CIC.

Cuando la valencia del Ag es un 1 o cercana a uno se formarán complejos inmunes chicos, mientras que si el Ag tiene una valencia grande tendrá posibilidad de combinarse con más de un Ab y formará redes entrecruzadas de gran tamaño.

La valencia del Ab influye de igual forma que la del Ag en el tamaño de los complejos inmunes. Así por ejemplo la IgM forma complejos de mayor tamaño que la IgG.

b) Concentración: El factor más importante que influye en la formación de CIC es la concentración relativa de Ag y Ab.

Los complejos inmunes formados en exceso de Ag son en general de tamaño pequeño, mientras que en la zona de quivalencia donde no hay exceso de ninguno de los componentes los complejos son de mayor tamaño.

En exceso de Ab el tamaño del complejo depende también de la valencia del Ag. Así, si el Ag tiene una valencia chica los CIC serán de tamaño pequeño, mientras que si el Ag es multivalente los complejos precipitarán en exceso de Ab.

c) Afinidad de los Ab: El tamaño y composición de los CIC está afectado por la afinidad del Ab.

La afinidad es la energía liberada en la unión de un solo sitio de unión del Ab con el Ag. Se mide por equilibrio de diálisis y se expresa en forma constante de equilibrio.

d) Propiedades fisicoquímicas de los Ag: Las propiedades fisicoquímicas de los Ag influyen en la formación de los CIC tanto en forma directa como indirecta. Por ejemplo diferentes Ag son catabolizados con distinta velocidad influyendo así sobre la composición de los CIC (Emlen, 1978; Chia, 1979).

La afinidad de distinto Ag por membranas basales determinan la formación de complejos inmunes precipitados en lugar de solubles (IZVI, 1976).

Ensayos para la detección de CIC.

Los ensayos usados para la detección de complejos inmunes se dividen en dos grupos basados en propiedades fisicoquímicas o inmunoquímicas.

Las técnicas fisicoquímicas son métodos de separación por tamaño, disminución de la solubilidad a 4°C y solubilidad diferencial en soluciones de polietilenglicol (PEG).

Los métodos inmunológicos están fundamentalmente basados en unión al complemento (Clq), activación de complemento, contenido de Ig y unión a receptores celulares (receptores para componentes del complemento o región Fc de la IgG).

Los ensayos más comunmente usados se esquematizan en la siguiente tabla (

Estos ensayos tienen ventajas y desventajas que explicaré brevemente.

a) Ensayo del Clq en fase líquida: se basa en la unión del CIC al Clq radio marcado así el complejo formado es precipitable por PEG.(Nydergger, 1974). En este ensayo no son detectables los CIC que no unen Clq o cuyo tamaño es tan pequeño que no es precipitable por PEG.

Esta técnica tiene también falsos positivos ya que otras macromoléculas tienen capacidad de unión al Clq (DNA, heparina, lipopolisacarido).

b) Ensayo de Clq en fase sólida (Hay, 1976), consiste en tubos de poliestireno recubiertos con Clq. El complejo inmune

| Ensayo | Propiedades de detección | Causas potenciales de: Falsos + Falsos - |
|-----------------------|--|--|
| Clq en fase líquida | habilidad para unirse al Clq | DNA, heparina lipopolisacárido y no precipitan CIC que no unen Clq |
| Clq en fase sólida | habilidad para unirse al Clq - conteniendo IgG. | CIC sin IgG que no se unan al Clq |
| Células Raji | Complejos con IgG con C3 presente en el complejo (receptor C3) | Ab anti linfocitos CIC sin IgG |
| Precipitación con PEG | gran tamaño de complejo con IgG. | Agregados espontáneos de IgG |

1
—
∞
†

unido al C1q es detectado por el agregado de anticuerpos contra IgG o proteína A del estafilococo radiomarcados. Ambas sustancias se unen a la fracción Fc de la IgG. Por lo tanto complejos que no fijan complemento no serán detectados, tampoco serán detectados aquellos complejos que no estén formados por IgG. La ventaja es que dado que la sonda sólo reconoce IgG se eliminan los falsos positivos que constituían un problema en el ensayo en fase líquida

c) Ensayo con células Raji (Theofilopoulos, 1976): Se basa en la detección de CIC que se unen al receptor de C3b de una línea linfoblastoide, los que luego se detectan por anticuerpos anti-IgG radiomarcados. El ensayo es similar al de C1q en fase sólida, pero tiene algunas desventajas adicionales. Una de ellas es que la técnica es muy costosa, ya que hay que mantener las células en cultivo. Por otro lado los Ab anti-linfocitos dan falsos positivos (estos Abs son muy comunes en pacientes con lupus eritematoso sistémico).

d) Métodos de precipitación con PEG (Rodrick, 1982; Rodrick, 1983; Krapf, 1982).

Se basa en la separación de CIC por su tamaño con la subsiguiente detección de la Ig por inmunodifusión radial. Aunque estos métodos son menos sensibles que los otros, son fáciles de realizar y pueden ser usados para aislar CIC.

Los resultados pueden expresarse como ug de Ig agregados por calor, que es usada como control positivo y detecta cantidades entre 1 y 100 ug/ml. Como los agregados de Ig no

son idénticos a los CIC y tanto variaciones en el tiempo como en la temperatura, producen variaciones en la composición del agregado, tiene poca importancia para determinar CIC en suero de pacientes. Alternativamente los CIC precipitados se pueden medir por turbidimetría (Rodrick, 1983) en cuyo caso, la técnica puede ser usada para estudios seriados

Correlación entre los diferentes ensayos.

Las correlaciones entre los resultados de las determinaciones de CIC no fueron buenas ya sea cuando los estudios se realizaron en el mismo o en diferentes laboratorios (Lambert, 1978; Herberman, 1981; Krapf, 1983). Se han encontrado correlación entre el test de Clq en fase sólida y la técnica de PEG. También existe correlación entre Clq en fase líquida y la técnica con células Raji. Los demás ensayos no tienen ninguna correlación entre sí. Esto no es sorprendente ya que los ensayos están basados en diferentes principios y por lo tanto tienen diferentes sensibilidades para CIC de distinto tamaño y composición (Yoshida, 1980). Casali y colaboradores (Casali, 1977) usando complejos formados in vitro demostraron que el ensayo del Clq en fase líquida es más sensible para detectar CIC desde la zona de eq. hasta un ligero exceso de Ag mientras que el ensayo de células Raji es más sensible para detectar CIC desde el punto de equivalencia hasta un relativo exceso de Ab. Barnett y colaboradores (Barnett, 1979)

usando CIC formados por seroalbumina bovina y antiseroalbúmina demostraron que el ensayo de Clq en fase sólida y el de células Raji detectan mejor los CIC formados en exceso de Ab.

Por lo tanto se puede deducir que la correlación entre los distintos ensayos depende de la amplia sensibilidad de los ensayos de la variedad de complejos formados en una única muestra de suero y de la variedad de complejos formados en los distintos individuos con una misma patología. Respecto a este último punto no hay que olvidar que provablemente los CIC van cambiando tanto en cantidad como en composición a medida que evoluciona la patología en cuestión.

Complejos inmunes circulantes en distintas patologías

Existen patologías humanas como Lupus Eritematoso sistémico y Artritis Reumatoidea que cursan con elevación de CIC (Lambert, 1975; Rayner, 1981; Cano, 1977). Estos complejos suelen depositarse en órganos y juegan así un rol patológico. La composición y tamaño de los CIC afecta su "clearance" de circulación y por lo tanto determina la forma en que será depositado en los distintos órganos. Complejos con grandes coeficientes de sedimentación (mayores de 19S) son rápidamente eliminados por células fagocíticas. Los CIC muy pequeños persisten en circulación por largos períodos de tiempo. Complejos intermedios con coeficientes de sedimentación entre 11S y 19S se depositan en vasos sanguíneos y en los glomerulos del riñón (Schmidt, 1974; Haakenstad, 1976; Kijlstra, 1981;

Tannenbaun ,1986). Además CIC que están formados por inmunoglobulinas cuyo Fc este modificado, no son captados por el sistema retículo endotelial y también se depositarán en el riñón.

Muchas manifestaciones clínicas asociadas con infecciones son producto del depósito de complejos inmunes. Así por ejemplo, infecciones de piel con streptococo A puede ocasionar una glomerulonefritis aguda. Se han detectado CIC en diversas infecciones causadas por virus, bacterias y parásitos (Noore, 1977; Mohammed, 1977; Koster, 1978).

Los CIC parecen estar involucrados en fenómenos de esterilidad. Así por ejemplo se ha encontrado en orquitis experimental que los CIC manifiestan actividad citotóxica contra espermatozoides (Segal-Eiras, 1984).

Con respecto a patologías tumorales que cursan con cambio en los niveles de CIC, hay hasta el momento muchas discrepancias y por lo tanto será discutido en un ítem separado.

Inmunocomplejos y cáncer.

En 1969 Hellström y Hellström (Hellström, 1969) introdujeron el término de "blocking factor" al demostrar que el suero de ratones portadores de tumores inducidos por el virus Maloney inhibía el efecto citotóxico "in vivo", de linfocitos de animales portadores del tumor, sobre células tumorales. Este efecto no fue detectado ni en suero de ratones normales ni en portadores de otro tumor inducido por Metilcalau-

treno (Oettgen, 1982). Estos factores tenían alto peso molecular y podían hidrolizarse a pH 3,1 obteniéndose por separado una fracción de mayor peso molecular que se identificó como una IgG y otra fracción que se identificó como Ag. (Sjögren, 1971, 1972).

Estos inmunocomplejos, formados por antígenos liberados del tumor y anticuerpos específicos, pueden unirse a receptores Fc de la célula T supresora provocando su activación o adherirse a la superficie de células "killer" impidiendo el acceso de las mismas a las células tumorales (Theofilopoulos, 1982). Muchos inmunocomplejos tienen la propiedad de combinarse con determinados componentes del complemento propiciando su activación (Levinsky, 1976).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios de determinación de CIC en el suero de pacientes portadores de distintos tipos de Cáncer utilizando diversas técnicas. Se midieron CIC en: cáncer de mama (Tanaka, 1979; Krieger, 1983; Hoffken, 1977), pulmón (Fekete, 1983; Gropp, 1980; Ruiz-Aguelles, 1982), melanoma maligno (Amelio Di R., 1982; Kristensen, 1980; Quay, 1983), linfomas (Akolkar, 1983), tumores ginecológicos (Mooney, 1983; Poulton, 1982), tumores óscos (Eiras, 1980), etc.

En estos estudios se muestra una buena correlación entre aumento de CIC y aumento de la masa tumoral o mal pronóstico de la enfermedad.

En estudios experimentales en ratas que portan gran

des masas tumorales, los niveles de inmunocomplejos disminuyen antes de la muerte del animal (Jennette, 1977). Los mismos autores en el mismo modelo, han encontrado elevaciones transitorias de los CIC durante fases de regresión (Jennette, 1980).

En algunos estudios clínicos sobre pacientes tumorales han llegado a las mismas conclusiones (Steel, 1978 a y b) sugiriéndose así, que el nivel de CIC, no siempre se correlaciona con un buen pronostico.

Evidentemente los resultados son muy contradictorios, debido a las diferentes técnicas usadas que hacen que los resultados no sean totalmente comparables. Otros resultados discordantes deben ser atribuidos a otros factores como, liberación del Ag y nivel de actividad del sistema retículo endotelial del huesped, así como también a la inestabilidad de los complejos frente a la manipulación de las muestras.

En vista de estas discrepancias decidimos medir los CIC en un modelo experimental con ratones endocriados, minimizando así variaciones individuales.

Se eligió una técnica inespecífica de precipitación con PEG dado que era la menos costosa más sencilla y asegura tanto la precipitación de CIC en zona de exceso de Ag como de Ab y por supuesto en el punto de equivalencia. Se extremaron las medidas para evitar disociación de CIC debido a su alta inestabilidad. Se trabajó en estrictas condiciones para evitar contaminaciones con otras proteínas plasmáticas.

Se midieron los CIC a lo largo del crecimiento del tumor subcutáneo S13 por un método inespecífico de precipitación con PEG (Rodrick, 1983).

Luego se aislaron CIC en dos etapas del desarrollo tumoral y se midió su actividad sobre el crecimiento del tumor S13 in vivo.

Finalmente se hidrolizaron los CIC para establecer si solo el complejo era responsable de la exacerbación tumoral o sus componentes por separado podían tener igual efecto.

2.2.1.1. Materiales y Métodos

Las muestras de suero pueden conservarse a -20°C , se descongelan y centrifugan a 3000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente para descartar residuos insolubles.

Se mezclan 70 μl de suero y 630 μl de buffer barato (6.18 g/l de ácido bórico 0.1 M, 4.0 g/l de hidróxido de sodio 0.1 N, pH 8.2) o Polietilenglicol (PEG) 6000 4.166% en buffer borato. Se incuba 2 horas a temperatura ambiente y luego se determina la absorbancia a 450 nm (D_{0450}).

Los niveles de CIC se determinan por diferencia de la D_{0450} del tubo que contiene PEG y la D_{0450} del tubo que no lo contiene.

Niveles de CIC a lo largo del crecimiento tumoral

Se inocularon ratones BALB/c con tumor S13 en el flanco izquierdo. Los ratones fueron sangrados por punción retroorbital a los días 3, 7, 10, 14, 24 y 30 post-implante tumoral. Simultáneamente se determinó la curva placebo, donde los animales fueron "sham" transplantados.

Cada determinación fue realizada por triplicado, en cinco experimentos separados.

Actividad in vivo de los CIC

CIC de portador precoz (CIC-ETB)

Los CIC de animales de 7 días de portación de tumor fueron precipitados por el método del PEG 6000, resuspendidos en el volumen original de buffer borato pH 8.2 e inoculados en la almohadilla plantar de ratones singeneicos 24 hs antes de inocular células tumorales para medir su actividad biológica. Simultáneamente se precipitaron CIC de suero de ratón normal. El control fue buffer borato (ver ensayo de la actividad biológica).

CIC de portador avanzado (CIC-ATB)

Los CIC de animales en estadios avanzados de porta-

ción del tumor fueron precipitados con PEG 6000 y luego ajustados a distintas concentraciones de proteína (2 - 7 y 15 ug) e inoculados en la almohadilla plantar de ratones sin geneicos de igual forma que se describió anteriormente. Simultáneamente se precipitaron CIC-ETB como control positivo (7 ug de proteína). Como control negativo se usaron CIC de ratones normales.

Ensayo de especificidad.

Para determinar si la actividad biológica de los CIC-ETB sobre el crecimiento tumoral era específica, se ensayó la actividad de los mismos sobre dos tumores singeneicos no relacionados antigénicamente (M2 y M3).

Ensayo de la actividad biológica.

Determinación de la actividad exacerbadora tumoral.

Los CIC precipitados y redisueltos como se indicó antes, son inoculados en la almohadilla plantar de ratones BALB/c singeneicos, en un volumen de 5 ul. 24 hs después, se inoculan 20×10^3 células tumorales en la misma almohadilla en un volumen de 50 ul. Luego se registra el crecimiento tumoral durante 25 días con un calibre de precisión.

Los datos se comparan con los correspondientes controles por el test de Student't.

Histología tumoral.

Se realizaron cortes histológicos de los tumores que crecían en la almohadilla plantar de ratones que fueron tratados con CIC-ETB; CIC-NM o buffer borato. Los preparados se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se contaron metafases en campos elegidos al azar por la técnica de doble ciego.

El índice mitótico fue determinado por la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Metafases}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

Como test estadístico se usó el análisis de la variancia (F).

Purificación de los CIC.

Los CIC fueron precipitados del suero de ratones portadores de tumor chico por la técnica detallada anteriormente.

Como primer paso se realizó la purificación de los mismos por cromatografía sobre Sephadex G 200 (Pharmacia) con buffer fosfato (pH 7.2) como eluyente.

Hidrolisis de los CIC

La técnica fue primeramente descrita por Lahey (Lahey, 1984) y modificada por nosotros. Los CIC precipitados lavados y purificados se disuelven en 0.5 ml HONa IN e inmediatamente se agrega igual volumen de buffer glicina-CIH (0.1 M), CINA (1 M), pH: 2.8. Las muestras se siembran en una columna de Sephadex 6.200 (1.5 x 25 cm, límite de exclusión 200 KDa).

El $V_0=13$ ml y el $V_t=44$ ml. La velocidad de flujo es de 1 ml/cm²/h.

Se recogen muestras de 1 ml que se leen automáticamente a 280 nm.

Las muestras se dializan contra PBS (pH 7.4) y se concentran al volumen original por liofilización.

Las distintas fracciones fueron luego ensayadas sobre el crecimiento tumoral.

2.2.1.2 Resultados

Niveles de CIC a lo largo del crecimiento tumoral

Como se observa en la Figura 1 los niveles de CIC aumentan luego del implante tumoral, alcanzan un máximo en un estadio precoz del crecimiento tumoral (7-10 días post transplante) -ETB- ($220 \pm 10 \Delta D0450$) que es significativamente

te mayor ($p < 0.01$) que el valor del control ($140 \pm 22 \Delta D0450$) al mismo día.

Luego del máximo alcanzado, los niveles de CIC disminuyen en estadios avanzados (ATB) a los valores iniciales.

En la curva control se observan fluctuaciones que no son estadísticamente significativas.

Actividad in vivo de los CIC-ETB

Los CIC-ETB fueron inoculados in vivo para medir su efecto sobre el crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en la figura 2. Los CIC-ETB exacerbaban significativamente el crecimiento del tumor S13 ($p < 0.001$) comparado con el grupo que recibió CIC de ratón normal o el grupo sin tratamiento.

Actividad in vivo de los CIC-ATB

Como muestra la figura 3 los CIC-ATB no modifican el crecimiento tumoral ni aún usando concentraciones iguales o superiores a las encontradas en ETB (Figura 3).

Es importante notar que con la técnica de precipitación con PEG pueden coprecipitar otras proteínas como inmunoglobulinas, fibronectina o factores del complemento. Nosotros ajustamos la técnica tal que las contaminaciones sean mínimas. Igualmente luego de la purificación de los CIC

(ver más adelante) se observa que conservan la actividad exacerbadora, de modo que se hace improbable pensar que se deba a un efecto de las impurezas.

Ensayo de especificidad

Cuando los CIC-ETB se inocularon en ratones normales que luego recibieron células tumorales M2 ó M3 no se observó actividad exacerbadora (Fig. 4). Esto indica que la actividad exacerbadora de los CIC-ETB es específica para el tumor S13.

Histología tumoral

Debido a que los CIC median reacciones inflamatorias (Hood, 1984) y como observamos que los CIC-ETB exacerbaban el crecimiento tumoral, decidimos estudiar si este efecto era debido a una reacción inflamatoria o a un efecto proliferativo sobre las células. Se realizaron entonces cortes histológicos de tumor S13 que habían sido tratados con CIC-ETB o con CIC de suero normal. Como control se usaron tumores que no recibieron tratamiento.

En ninguno de los casos se observaron infiltrados de neutrofilos o linfocitos (Fig. 5). Los resultados indican que el efecto exacerbador de los CIC sobre el tumor no fue debido a un fenómeno inflamatorio "in situ" sino a una acción directa sobre el tumor. El número de mitosis en los tumores

de animales tratados con CIC-ETB estaba significativamente elevado comparado con los que recibieron CIC de suero normal o los sin tratamiento ($P < 0.005$). La tabla I muestra los correspondientes índices mitóticos.

Purificación de los CIC

Los CIC-ETB fueron purificados por cromatografía en Sephadex G-200. En todas las experiencias realizadas el complejo salió dentro del volumen muerto de la columna y siempre conservó la actividad exacerbadora.

Hidrólisis de los CIC

Los CIC-ETB luego de ser purificados por G-200 fueron hidrolizados como se indica en Materiales y Métodos.

En algunos experimentos se obtuvo una hidrólisis parcial del complejo, no encontrándose actividad exacerbadora en ninguna fracción salvo en el complejo sin hidrolizar.

Cuando se consiguió un hidrólisis completa del complejo, no se pudo recuperar la actividad exacerbadora en ninguna fracción cromatográfica (Figura 6).

Esto indicaría que es necesaria la integridad del complejo para ejercer un efecto exacerbador tumoral.

2.2.1.3 Conclusión

Nuestros resultados estan de acuerdo con los trabajos de Jennette (1977, 1980) respecto a que hay un aumento de los niveles de CIC en un período del crecimiento tumoral y luego una disminución.

Otros investigadores han encontrado un comportamiento similar en algunos tumores humanos (Steel, 1978 a yb). Esto estaría indicando que no siempre la disminución de CIC está asociada con un buen pronóstico. Nosotros pensamos que esto es así ya que cuando ensayamos el efecto de los CIC sobre el crecimiento del tumor in vivo, encontramos que los CIC exacerbaban el crecimiento tumoral, con un dramático aumento de las mitosis.

En nuestro modelo encontramos que en estadios avanzados del crecimiento tumoral los CIC disminuyen. Esta disminución no es debido a problemas técnicos por el exceso de Ag ya que la técnica que empleamos puede ser usada tanto en exceso de Ag como de Ab. Cuando ensayamos los CIC aislados de portadores avanzados y los probamos sobre el crecimiento tumoral en diferentes concentraciones, encontramos que no exacerbaban el crecimiento tumoral. Esto es muy interesante ya que está indicando que estos CIC tienen una composición diferente de la que tienen los CIC aislados de estadios precoces.

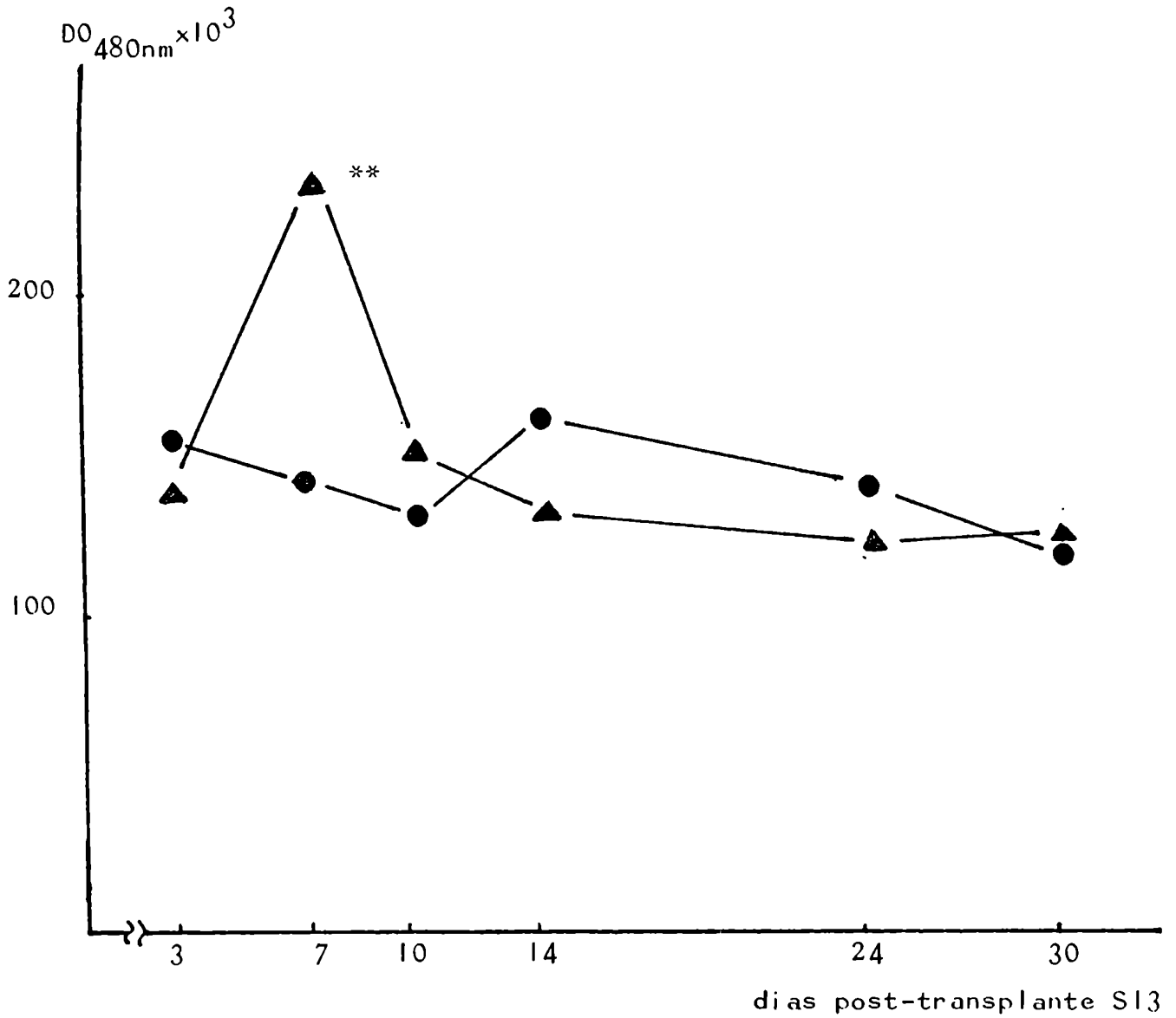
Theofilopoulos (1982) propone que los CIC se unen al receptor para FC de células T supresoras provocando así su activación. En nuestro modelo es posible que ocurra algo

similar, o más posiblemente que se active alguna población celular que libere factores que activen las mitosis de las células tumorales. Dado que los CIC intervienen en fenómenos inflamatorios (Levinsky, 1982), podría ser que el efecto facilitador tumoral que observamos fuera simplemente por un mecanismo inflamatorio. Comprovamos que esto no es así ya que no encontramos infiltrado linfocitario en los tumores. Es importante además destacar que el fenómeno de exacerbación fue específico ya que los CIC de un portador de tumor S13 no exacerbaban el crecimiento del tumor M3 ni M2.

Por último hidrolizamos los complejos y comprobamos que los componentes por separado no exacerbaban el crecimiento tumoral, o sea que es necesaria la integridad del complejo.

Determinación de los complejos inmunes circulantes a lo largo del crecimiento tumoral

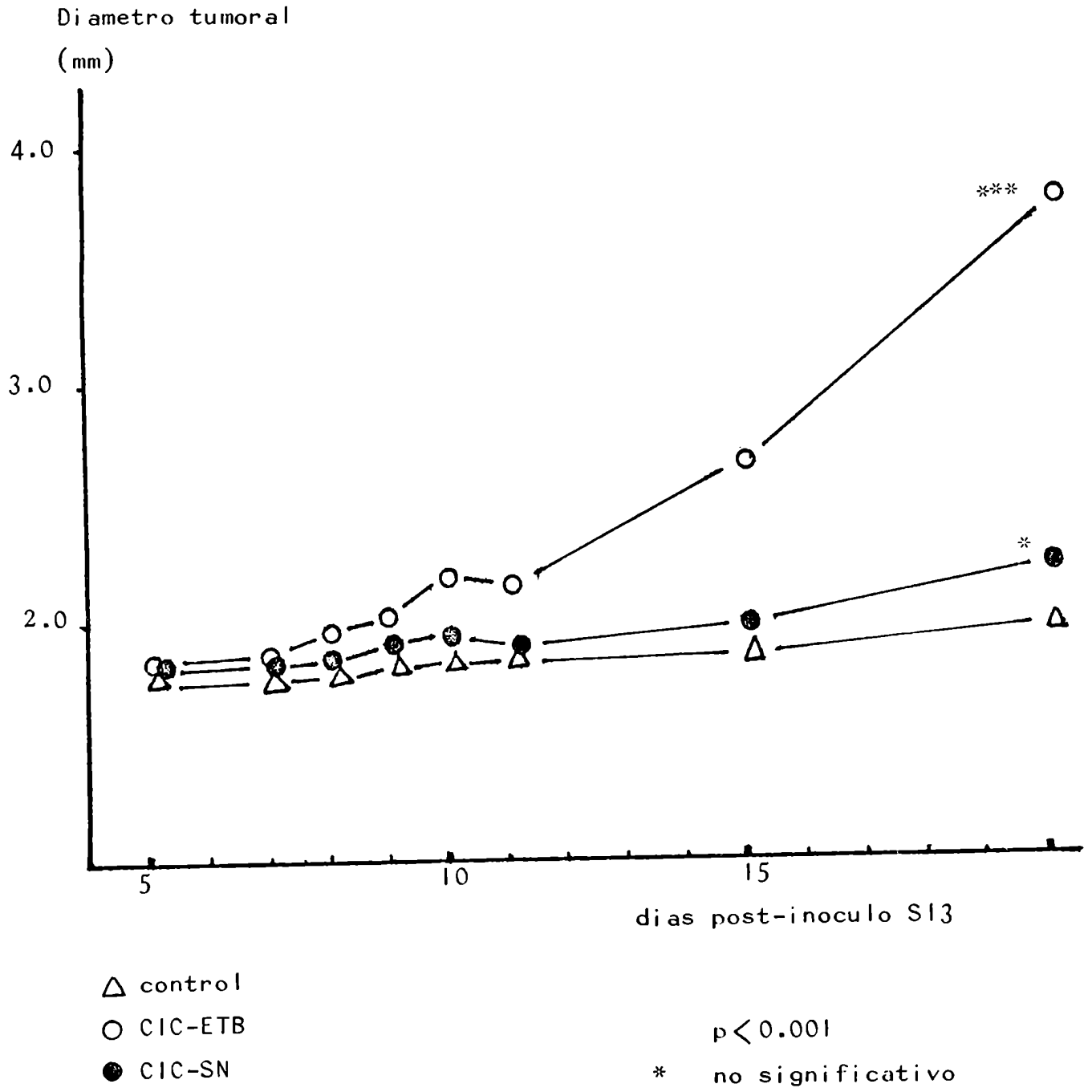
FIGURA I



● control
▲ portador de tumor S13
** p < 0.01

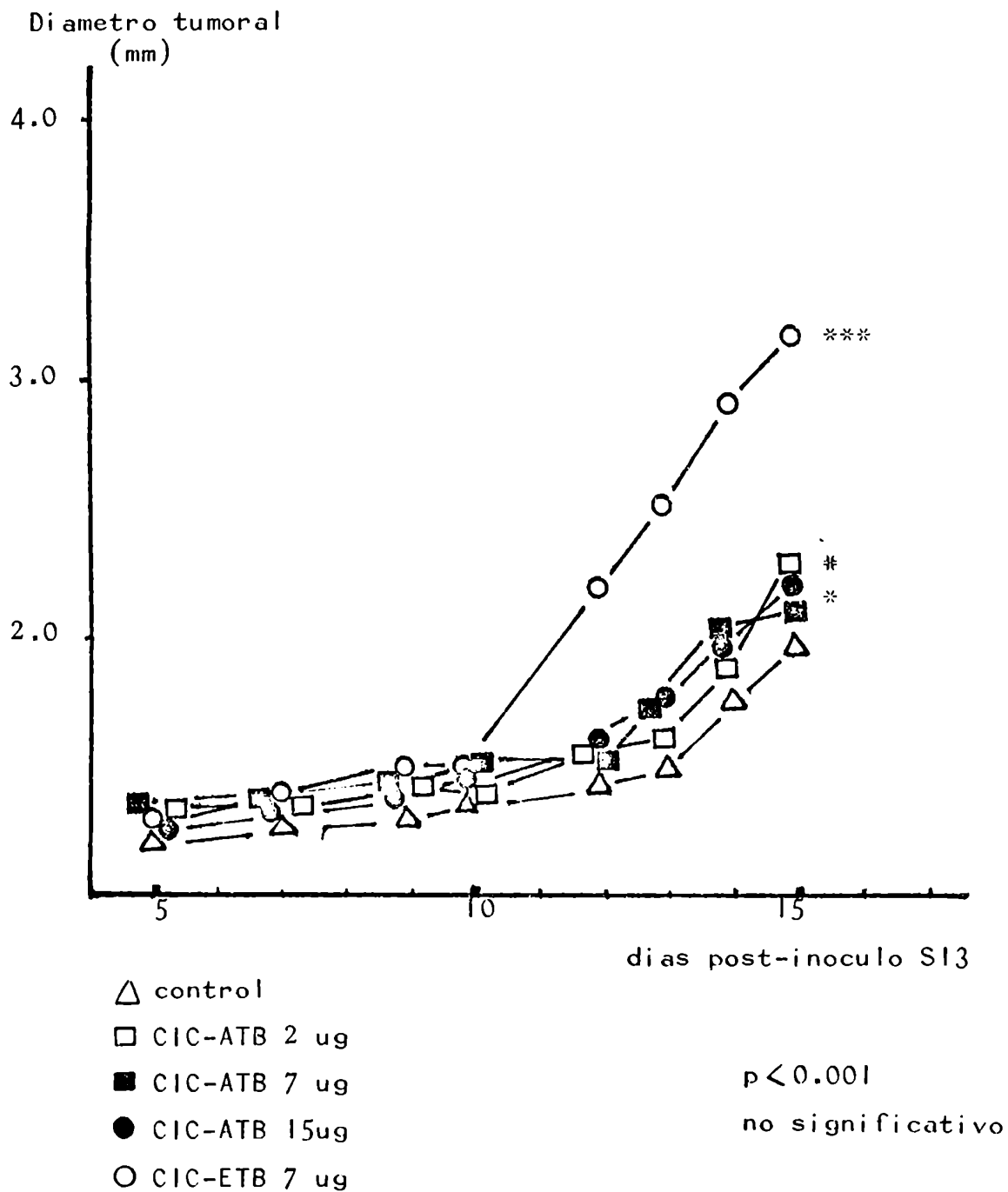
Actividad biológica de los CIC de portador de tumor chico

FIGURA 2

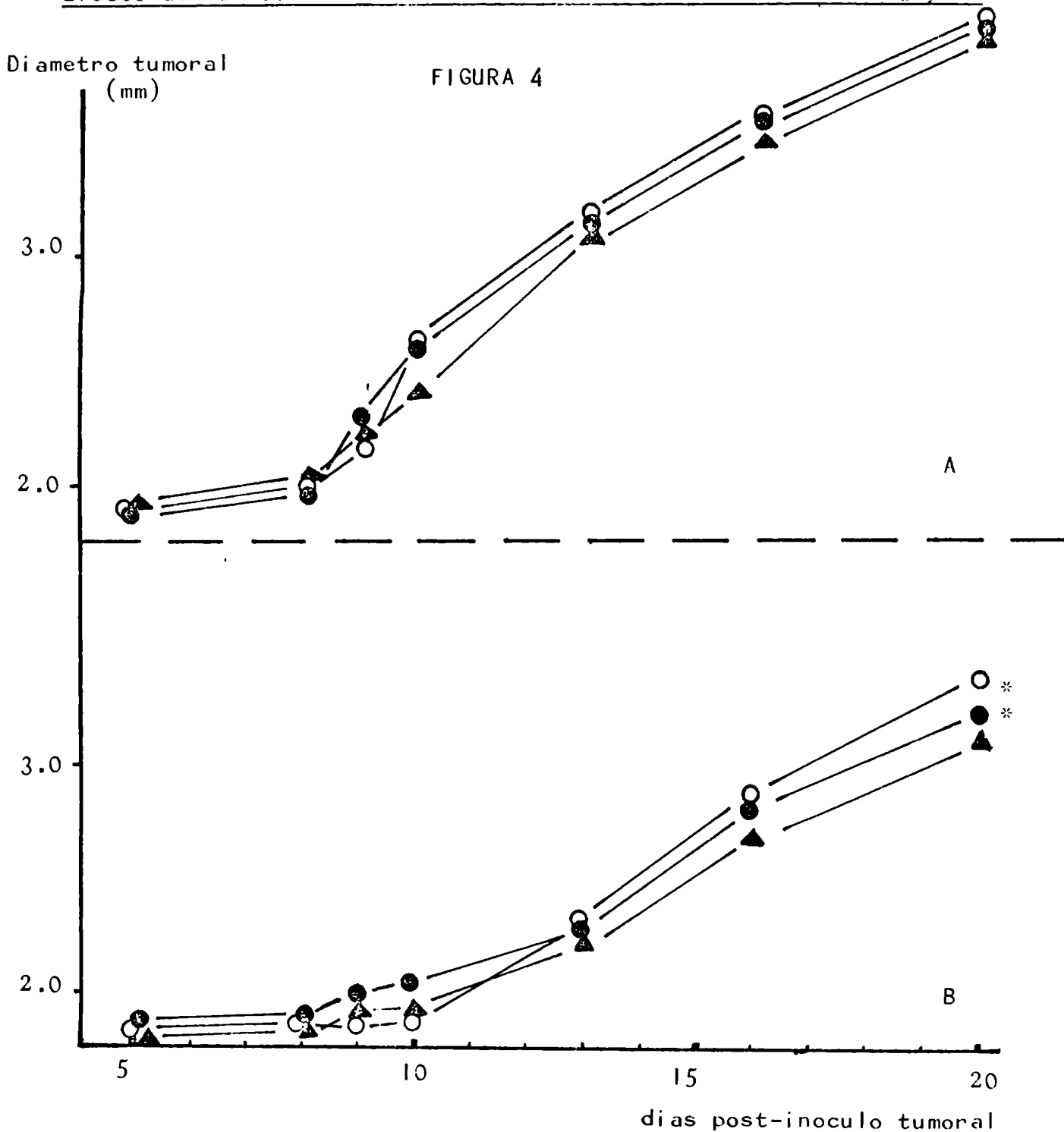


Actividad biológica de los CIC de portador de tumor grande

FIGURA 3



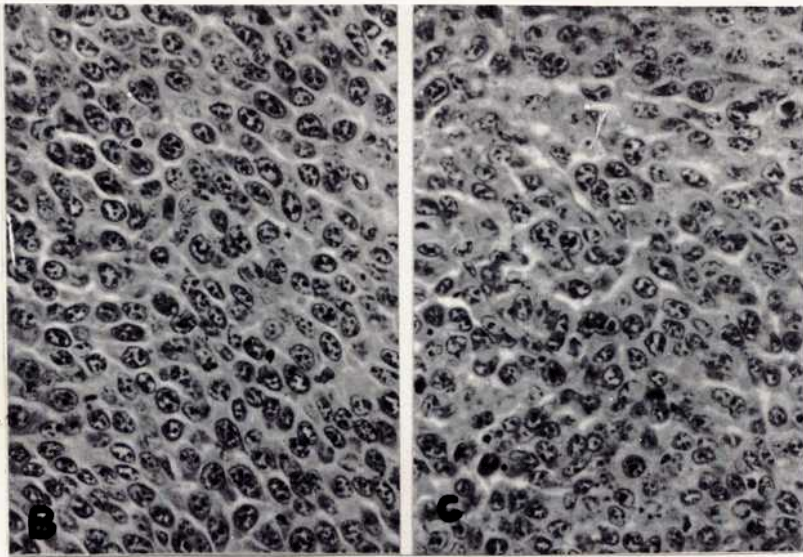
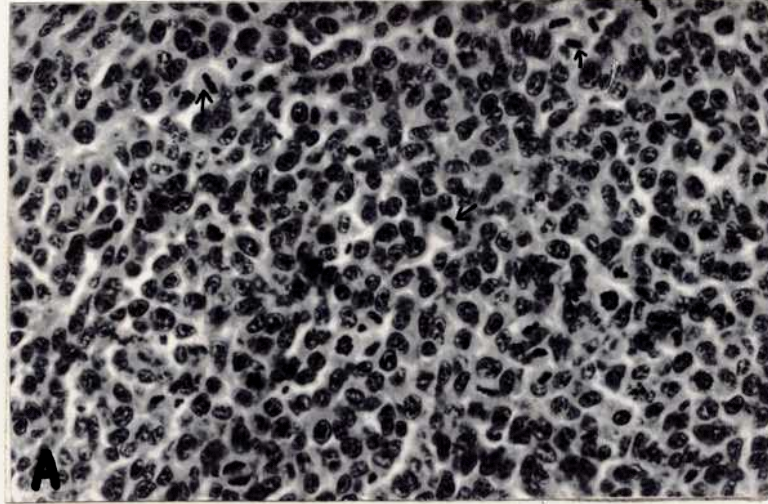
Efecto de los CIC-ETB sobre el crecimiento de los tumores M3 y M2



- CIC-ETB (S13)
- buffer borato
- △ control células tumorales: A=M2 ; B=M3
- * no significativo

Efecto de los CIC-ETB-S13 sobre el crecimiento del tumor S13

FIGURA 5



Secciones de tumor teñidas con hematoxilina-eosina. 500 cel/campo
Mag. X400. Histología de los tumores que crecen en la almohadilla
plantar de ratones inoculados con: A-CIC-ETB-S13 ; B-CIC-SN ; C-buffer-
borato.

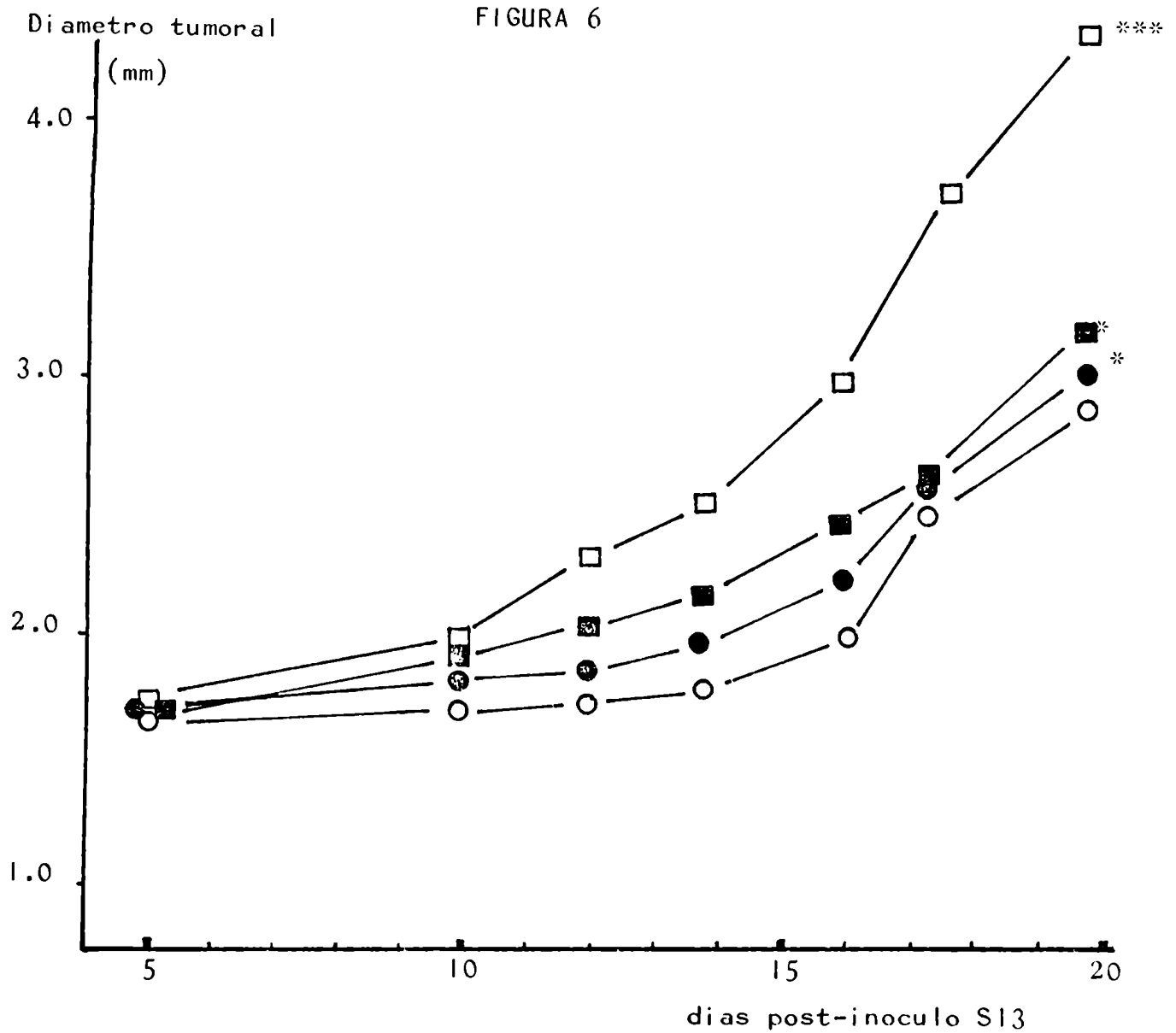
Efecto de los CIC-ETB-S13 sobre el crecimiento del tumor S13

TABLA I

| Grupos | Número de campos (n) | Indice mitotico ($\bar{X} \pm DS$) |
|---------------|-------------------------|---|
| CIC-ETB-S13 | 71 | 1.21 \pm 0.42 |
| CIC-SN | 61 | 0.33 \pm 0.24 |
| buffer borato | 71 | 0.34 \pm 0.22 |

** $p < 0.005$ respecto de CIC-SN y de buffer borato

Efecto de productos de hidrolisis de CIC-ETB sobre el crecimiento del tumor S13 in vivo



- control
 - CIC-hidrolizado ,fracción de bajo PM
 - CIC-hidrolizado ,fracción de alto PM
 - CIC-ETB sin hidrolizar
- p < 0.001 * no significativo

2.3. Relación huesped tumor

Las células malignas, cuando invaden y dan metástasis a través de componentes de la matriz extracelular. La degradación enzimática de la matriz está involucrada en este fenómeno. Entre las proteínas potencialmente degradables se ha encontrado que la fibronectina (FN) es específicamente susceptible a las proteasas. La FN es una glicoproteína adhesiva y opsónica que se presenta en forma soluble en plasma y otros fluidos y en forma tisular en el tejido conectivo y membranas basales.

Otra característica de la FN es su múltiple interacción que involucra anclaje y unión a matrices, quimiotaxis, opsonización y estados finales de coagulación y reparación de tejido (Yamada, 1978; Vaher, 1980; Mosher, 1980 a y b; Rouslahti, 1981a). Muchas de estas interacciones y sus actividades dependen de los distintos dominios de la molécula de FN.

De considerable interés en el estudio de esta proteína fue el hallazgo de que las células transformadas en general no depositan FN en su matriz extracelular.

Otra característica importante es la susceptibilidad que tiene la molécula de FN a la fragmentación por varias proteinasas. La fragmentación puede estar involucrada en la invasión por parte de las células malignas quienes tienen una conocida actividad proteolítica. Los fragmentos de FN se-

rian potenciales marcadores tumorales y pueden tener actividad transformante.

Estructura de los dominios y fragmentación proteolítica de la FN.

De acuerdo con propiedades hidrodinámicas, espectros cópicas y estados de desnaturalización; la FN se puede describir como una proteína formada por dominios unidos por regiones sensibles a las proteasas (Alexander, 1978; Coloma, 1978; Alexander, 1979). La estructura de dominios fue además confirmada por microscopía electrónica (Engel, 1981) en las cuales se distinguen secuencias que los unen. Estos segmentos son los sitios preferenciales de clivaje por acción de proteinasas. La FN es rápidamente degradada por enzimas proteolíticas solubles e insolubles (Vartio, 1981). Así se ha observado que las principales enzimas plasmáticas (plasmina y trombina) y enzimas tisulares (elastasa y catepsina G) cortan a la FN inicialmente en dos sitios localizados cerca de los extremos N-terminal y c-terminal de la molécula. La fragmentación proteolítica ha suministrado mucha información acerca de las funciones de los dominios.

En el fragmento N-terminal se encuentran los sitios de unión con fibrina, actina, S.aureus, heparina (Hörmann, 1980; Keski-Oja, 1981; Mosher, 1980b, Sekiguchi, 1980; Vartio, 1982).

El tercer aminoácido del extremo N-terminal es una glutamina y está involucrada en reacciones por el factor XIIIa (transglutaminasa) una trombina activada que requiere Ca^{++} (Mc Donagh, 1981). Esta enzima media importantes interacciones de la FN como la unión a la fibrina en el cuagulo, a otras moléculas de FN, a matriz pericelular, S.aukeus, colágeno tipo I (Mosher, 1975; Keski-Oja, 1976; Emmerling, 1981; Mosher, 1980a). La FN también puede interactuar con heparan sulfatos (Lattera, 1980; Rouslahti, 1980).

El dominio de la FN que se une a la gelatina tiene un peso molecular de 30-40 KDa y se encuentra en la región C-terminal (Furie, 1980; Balian; 1980). La FN se une también a distintos tipos de colágeno con diferente afinidad. Se ha demostrado que se une con mayor afinidad a colágeno intersticial (tipos I, II y III) que al de membranas basales (tipos IV y V) (Rouslahti, 1978; Engvall, 1978). Además la FN también interactúa con secuencias similares al colágeno como el C1q del complemento y la acetilcolinesterasa. (Menzel, 1981; Emmerling, 1981).

El fragmento C-terminal con un peso molecular de 140-160 KDa contiene los sitios de unión a la heparina, a las células y la propiedad quimiotáctica (Yamada, 1980; Hahn, 1979; Rouslati, 1981 ayb; Pierschbacher, 1982, Hayashi, 1981; Hayashi, 1982).

La molécula es prácticamente simétrica, salvo que una de sus subunidades tiene un sitio adicional de unión a la

fibrina (Sekiguchi, 1981).

La mayoría de los carbohidratos están localizados en el dominio de unión a la gelatina (Sekiguchi, 1981; Sekiguchi, 1980). Aparentemente estos carbohidratos son los responsables de la protección de la FN al ataque proteolítico (Olden, 1978).

La FN y la transformación maligna

Células normales adherentes depositan en cultivo una matriz extracelular (ME) que está formada por proteínas colágeno, no colágeno y glicosaminoglicanos. La composición de la matriz depende del tipo de células y del grado de diferenciación (Alitalo, 1982a).

La ME le da a la célula el soporte mecánico, además de favorecer la adhesión a estructuras específicas actuando como una barrera selectiva específica (Roushathi, 1981 a y b). Uno de los hechos más importantes es que las células transformadas pierden su ME o esta aparece desorganizada (Smith, 1981; Alitalo, 1982b; Keski-Oja, 1982a, Keski-Oja, 1982b). Las proteínas que se pierden o cuya síntesis está disminuida en las células transformadas son el procolágeno, heparan sulfatos y laminina y la FN (Fagan, 1981).

Aún no es claro si la desorganización de la ME en células transformadas se debe a defectos en la glicosilación de las proteínas (Alitalo, 1982b). Pero es llamativo el hecho que las células pierden su fenotipo transformado si se

cultivan con FN o sobre matrices pericelulares libres de células, sintetizadas por fibroblastos normales (Yamada, 1976; Va^heri, 1978).

Los estudios que han tratado de correlacionar la pérdida de FN de la matriz pericelular con la tumorigenicidad y metastasis, no siempre han dado resultados satisfactorios (Coll, 1977; Der, 1978; Kahn, 1979; Neri, 1979; Neri, 1981).

Los procesos de invasión que distinguen a la célula maligna de la normal, involucran la hidrólisis enzimática de tejido conectivo resultando que los fragmentos proteolíticos de la FN podrian actuar como potencial marcador tumoral. Una vez digerida la matriz extracelular, la capacidad de las células tumorales para adherirse a matrices modificadas le permite tener mayor capacidad metastásica (Kramer, 1980; Nicolson, 1981). El diferente comportamiento de las células tumorales hacia las proteínas de la matriz facilita su penetración e invasión.

Actividad asociada con fragmento de FN.

La característica de la FN de ser una proteína multifuncional deriva de los diversos dominios de la FN que le permite tener múltiples interacciones. Su forma elongada con diferentes dominios capaces de unirse a diferentes proteínas le da una posible función organizativa de la matriz pericelular. El gran tamaño, múltiples interacciones, estruc

tura de dominios y susceptibilidad a proteasas hace pensar que la proteólisis de la FN puede producir "péptidos activados" que pueden tener un efecto regulatorio sobre las funciones de la FN intacta.

La actividad de fragmentos proteolíticos de FN para promover el fenotipo transformado (transforming-enhancing factor TEF) fue detectado en cultivo de fibroblastos infectados por el mutante temperatura sensible del sarcoma de Rous (De Petro, 1981). La actividad TEF se encontró en fragmentos de FN obtenidos con plasmina o catepsina G, propiedad que no posee la molécula intacta, interfiriendo así en la organización de la matriz (Mc Donald J.A., 1982).

Presencia de fragmento de FN in vivo

In vivo se han detectado fragmentos de FN en plasmas líquido sinovial reumatoideo y principalmente en crioprecipitados de plasma de pacientes tumorales (Chen, 1977; De Petro, 1983; Todd, 1980; Clemmensen, 1982). Por lo tanto estos fragmentos podrían ser un potencial marcador tumoral, o enfermedades que involucren activación proteolítica.

En el presente trabajo de Tesis, estudiaremos los efectos de la FN y algunos de sus fragmentos sobre la exacerbación tumoral, los niveles de complejos inmunes y la angiogénesis.

2.3.1. Materiales y Métodos.

Drogas: Fibronectina (FN) (humana) grado analítico (SERVA), Fragmento de FN (Pentapéptido: Gly-Arg-Gly-Asp-Ser)(SIGMA), Fragmento de FN (Tetrapéptido Gly-Arg-Gly-Asp)(SIGMA).

Pretratamiento de esplenocitos normales

Se preparó una suspensión de esplenocitos normales como se indicó antes en el punto 2.1.1.1. Se separaron en cuatro grupos, cada uno de los cuales contiene 60×10^6 linfocitos. Cada grupo fue incubado con 1 ml de medio que contenía a) FN, b) el tetrapéptido, c) el pentapéptido y d) grupo control, durante 50 minutos a 37°C . Las proteínas se ensayaron a 50 y 150 $\mu\text{g/ml}$. Luego de la incubación, las células son centrifugadas y lavadas.

Finalmente 40×10^6 cel/ml son usadas en el ensayo de LIA y 25×10^6 cel/ml se cultivan para obtener sobrenadantes que se usaran en el ensayo de exacerbación tumoral.

Ensayo de S-LIA:

40×10^6 esplenocitos/ml preincubados con FN o sus fragmentos, se inyectaron intradermicamente en un volumen de 0.1 ml. Estos ratones denominados receptores, recibieron dos inyecciones bilaterales de las células.

Cinco días más tarde los receptores se sacrifican, la piel se separa cuidadosamente y se observa bajo lupa con un aumento X6.4.

El esquema del ensayo se muestra en la figura 1.

La cuantificación de la vascularización se explicó en detalle en el punto 2.1.5.1.

Cultivo de esplenocitos pretratados.

Los esplenocitos pretratados con FN o sus fragmentos se cultivan durante 24 hs como fue detallado en 2.1.1.1. y luego se recogen los sobrenadantes y se ensayan sobre el crecimiento tumoral in vivo.

Ensayo de la actividad exacerbadora sobre el crecimiento tumoral.

Los sobrenadantes de esplenocitos de los distintos grupos descriptos antes se ensayaron sobre el crecimiento tumoral in vivo como se indicó en 2.1.1.1.

Cada grupo experimental contiene 10 ratones y los experimentos se repitieron 2 veces.

Medición de complejos inmunes.

Cuando finalizó el experimento de exacerbación tumoral, los animales se sangraron por punción retroorbital, los sueros se agruparon por pares y se determinaron los niveles de CIC.

Los niveles de CIC se midieron por el método de precipitación con PEG como se explicó en detalle en (2.2.1)

Resultados

La tabla I muestra los resultados sobre la respuesta angiogénica del tratamiento de esplenocitos normales con FN o sus fragmentos.

En las condiciones ensayadas no se ve efecto a ninguna de las dosis ensayadas.

El tratamiento con FN o fragmentos no indujo actividad exacerbadora en linfocitos normales, como se demuestra por el ensayo in vivo sobre el crecimiento tumoral (Figura 1), tampoco se observaron modificaciones en los niveles de CIC (Tabla 2)

Conclusión

Observamos que el tratamiento in vitro de esplenocitos normales con FN o sus fragmentos no modifica la angiogénesis respecto del grupo control. Estos valores a su vez son significativamente menores a la respuesta S-LIA inducida por linfocitos de un portador de tumor S13.

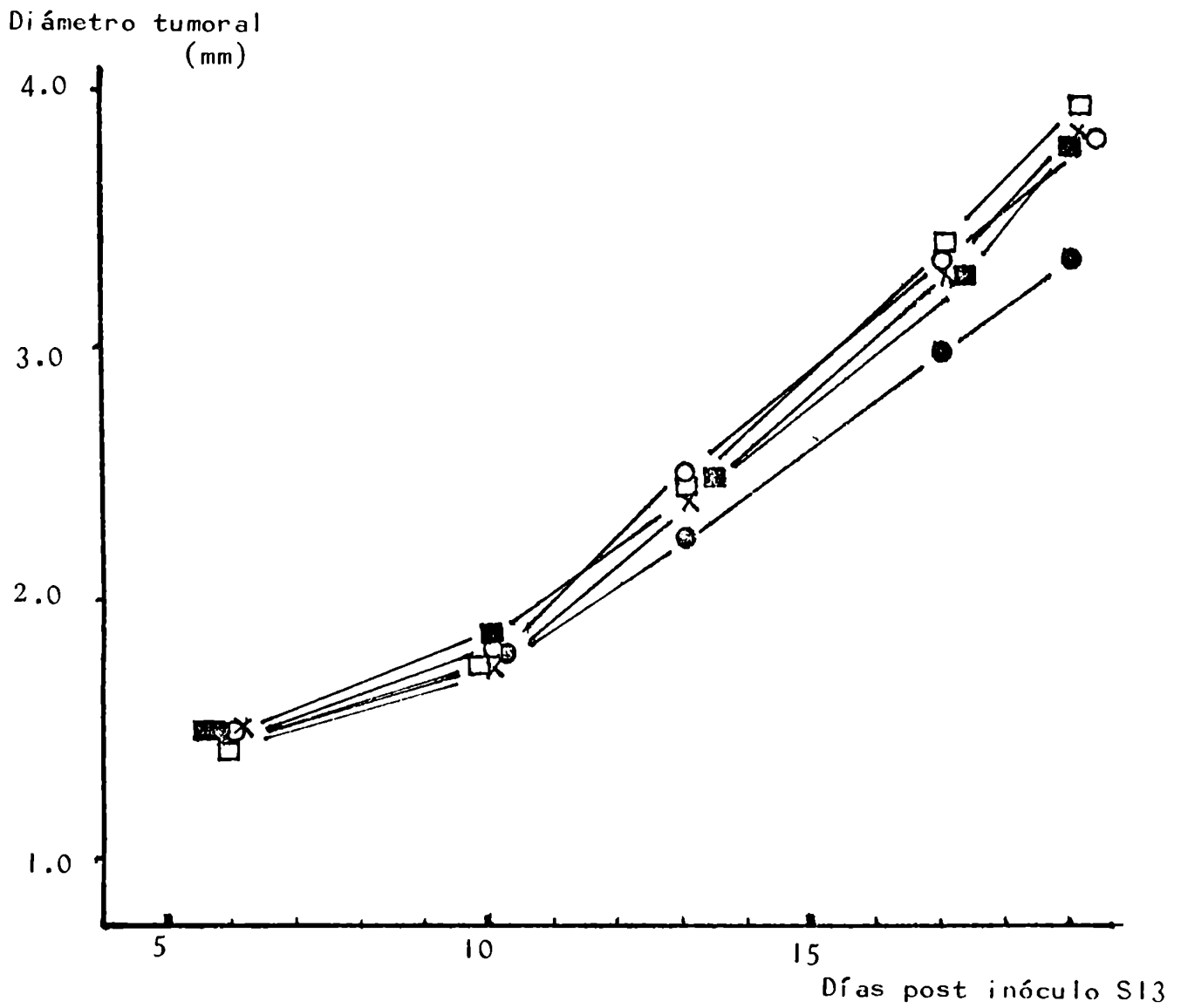
El cultivo de esplenocitos normales, tratados previamente con FN o fragmentos no contienen factores que exacerben el crecimiento tumoral in vivo o modifiquen los niveles de CIC.

En principio esta proteína no parece actuar in vitro, por lo menos en la condiciones ensayadas, pero no podemos dese

cartar que actue in vivo via el sistema inmune del animal.

Alternativamente podría ser que los fragmentos ensayados no corresponden a los que se producen por acción enzimática en el portador de tumor.

FIGURA 1



- X CONTROL
- COLAGENO
- FN
- Pentapéptido de FN
- Tetrapéptido de FN

Tabla 1. Ensayo de angiogénesis inducida por linfocitos.

| Fuente de esplenocitos | densidad de vasos por mm ² | Nº de sitios de inoculación |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| bazo normal | 170 [±] 0.30 | 8 |
| bazo normal + FN | 1.54 [±] 0.40a 1.50 [±] 0.20b | 8 |
| bazo normal + tetrapéptido | 1.62 [±] 0.06a 1.55 [±] 0.10b | 8 |
| bazo normal + pentapéptido | 1.69 [±] 0.10a 1.70 [±] 0.20b | 8 |
| bazo de portador de tumor S13 | 3.70 [±] 0.10 | 8 |

p < 0.001

a= (50ug/ml); b= (150ug/ml)

Tabla 2. Medición de complejos inmunes circulantes.

| Fuente de suero | Diferencia de D0 450nm ($\bar{X} \pm$) | Nº de determinaciones (n) |
|-----------------|---|------------------------------|
| Control | 0.310 \pm 0.027a | 5 |
| | 0.315 \pm 0.050b | 3 |
| FN | 0.300 \pm 0.028a | 5 |
| | 0.324 \pm 0.060b | 4 |
| tetrapéptido | 0.287 \pm 0.037a | 5 |
| | 0.308 \pm 0.033b | 4 |
| pentapéptido | 0.249 \pm 0.058a | 5 |
| | 0.365 \pm 0.059b | 3 |

a: 50 ug/ml

b: 150 ug/ml

CONCLUSIONES GENERALES

INDICE DETALLADO DEL CAPITULO 3

| | | |
|------|--|-----|
| 3. | DISCUSION Y CONCLUSIONES | 157 |
| 3.1. | Factores esplénicos estimuladores del crecimiento tumoral | 158 |
| 3.2. | Especificidad de los factores exacerbadores tumorales | 159 |
| 3.3. | Relación de factores exacerbadores con el tamaño tumoral | 159 |
| 3.4. | Población esplénica responsable de la liberación de factores exacerbadores | 161 |
| 3.5. | Caracterización parcial de los factores exacerbadores tumorales | 162 |
| 3.6. | Factores angiogénicos presentes en cultivos de esplenocitos | 164 |
| 3.7. | Complejos inmunes circulantes (CIC) | 166 |
| 3.8. | Relación huesped tumor | 168 |

3. Conclusión

Ya en la década del cincuenta (Ehrlich, 1957) se postuló que el sistema inmune juega un papel importante en el control de la aparición de neoplasias. La hipótesis de la vigilancia inmunológica en respuesta a tumores tomó mucho impulso a fines de esa década gracias a los trabajos de Prehn (Prehn, 1957). Estas teorías fueron de gran importancia en la inmunología tumoral ya que explicaban algunos de los fenómenos observados. Pero, a pesar de que existe una respuesta inmune muchos tumores siguen creciendo.

La pregunta que surge entonces es ¿Cual es el sistema de escape que impide al sistema inmune funcionar en el portador de tumor?

Existen diversos mecanismos como: la tolerancia inmunológica (Nossal, 1983), la inmunoselección (Prehn, 1970; Byers, 1977), la modulación antigénica (Boyse, 1969), la inmunosupresión (Venkata Raman, 1980; Wang, 1982; Shoul, 1980), la inmunoestimulación y la exacerbación inmunológica.

Estos mecanismos fueron descriptos con detalle en la parte introductoria de esta tesis. Nosotros nos abocamos en particular, en este conjunto de trabajo al estudio de diversos aspectos del fenómeno de exacerbación tumoral inducida por el sistema inmune. Nuestro enfoque principal ha sido la investigación de la exacerbación tumoral mediada por productos solubles liberados por esplenocitos y por factores presentes en el suero de portadores de tumor.

3.1. Factores esplénicos estimuladores del crecimiento tumoral.

Los estudios se realizaron en ratón, con la cepa en docriada BALB/c, que portan un adenocarcinoma mamario (S13).

Basandonos sobre datos bibliográficos nuestro primer paso fué establecer la existencia, en nuestro modelo, de fac tores esplénicos que modulan el crecimiento tumoral.

Realizamos cultivos de corto tiempo de esplenocitos de portador de tumor. En los sobrenadantes de cultivo encon tramos factores que exacerban el crecimiento del tumor S13 in vivo. Esta actividad exacerbadora aparece alrededor del día siete de evolución tumoral y persiste durante toda la evo lución tumoral.

Algunos investigadores demuestran que los factores exacerbadores tumoral son producidos por el tumor y adsor- bidos luego en el bazo quien finalmente lo libera en condi- ciones de cultivo (Hollander, 1978) . Nuestros resultados demuestran que los esplenocitos mismos son los productores del FE y no se trata de un fenómeno de simple absorción ya que siguen liberando el factor luego del tratamiento con tripsina. Igualmente es necesario enfatizar que en este modelo es nece saria la presencia del tumor metabólicamente activo para que los esplenocitos manifiesten un neto efecto exacerbador.

3.2. Especificidad de los factores exacerbadores tumorales

El efecto exacerbador no es específico ya que los sobrenadantes facilitan también el crecimiento de otro tumor murino (M3), en vista de este fenómeno y debido a que algunos autores atribuyen la exacerbación tumoral a virus que comúnmente contaminan los tumores (Mc Donald, 1981; Isakov, 1981), medimos los niveles de la enzima láctico deshidrogenasa tanto en los sueros de animales portadores de tumor como en los medios condicionados por esplenocitos. Descartamos así la presencia del virus de la lactico deshidrogenasa, por lo menos en su fase activa.

A continuación estudiamos el efecto in vitro de los sobrenadantes con actividad exacerbadora y de fracciones purificadas de los mismos. Los estudios in vitro se realizaron sobre tumor S13 y M3, ambos susceptibles de exacerbación in vivo. Por el hecho de no haber detectado efecto in vitro, pensamos que para la expresión de la actividad exacerbadora es necesaria la participación del huesped. Esto lo demostramos transfiriendo la actividad exacerbadora tumoral a ratones normales, más aún observamos que la transferencia es efectiva independiente de la vía de inoculación empleada.

3.3. Relación de factores exacerbadores con el tamaño tumoral.

Cuando realizamos la cirugía tumoral encontramos que

el tamaño de la masa tumoral al tiempo de la cirugía es un factor importante.

Si operamos un tumor de siete días de evolución (ETB) la actividad facilitadora del crecimiento tumoral desa parece rápidamente, no detectándose dicha actividad a las 24 hs. luego de la cirugía.

Si el tumor se extirpa en un estadio avanzado (20 días de evolución-ATB), la actividad persiste en el bazo durante dos semanas luego de la cirugía. Por lo tanto, hay mo dificaciones en el sistema inmune a lo largo de la evolución tumoral. Esto nos sugiere que en un ATB hay una mayor estimulación antigénica que en un ETB, que afecta al sistema inmune en forma diferente.

Si bien existen diferencias con respecto al comportamiento del bazo luego de la cirugía tumoral, es claro que luego de la extirpación del tumor, la actividad exacerbadora tumoral desaparece. Se puede inferir entonces que el tumor juega un rol activo en su propia estimulación.

Algunos autores han demostrado que las células tumo rales liberan factores inmunosupresores que facilitan indirectamente el crecimiento tumoral por una disminución de la defensa del huésped (Medoff, 1966; Putman, 1985). Nosotros observamos que las células del tumor S13 no liberan en cultivo factores de autoestimulación, tampoco liberan factores inductores de la exacerbación tumoral. Alternativamente, se podría pensar que las células tumorales no liberan dichos

factores en las condiciones de cultivo, pero que in vivo son capaces de liberarlos. Si este fuese el caso deberíamos detectar la actividad exacerbadora en extractos tumorales, como lo han observado otros investigadores (Diament, 1985; Watanabe, 1978).

Nosotros observamos que en los extractos tumorales hay una tendencia a la exacerbación, mientras que en los extractos de órganos normales, la tendencia es a la inhibición. El ExS13 no muestra un neto efecto estimulatorio, pero sí una diferencia estadísticamente significativa respecto del Ex0N. Podemos pensar entonces que para observar un neto efecto exacerbador en los sobrenadantes de esplenocitos, sea necesario no solo la liberación de algún factor tumoral, sino además la presencia de la propia masa tumoral.

3.4. Población esplénica responsable de la liberación de factores exacerbadores tumorales.

Existen evidencias de la importancia de los diferentes tipos celulares en la regulación de la respuesta inmune (Kwong, 1984; Owens, 1985; Santos, 1985; Patel, 1982).

La portación del tumor puede originar modificaciones en las funciones inmunológicas celulares (Manor, 1976, Wang, 1980; Buesow, 1984) que explicarían la aparición de factores exacerbadores. En nuestro modelo demostramos la aparición de estos cambios funcionales en subpoblaciones esplénicas du

rante la progresión del tumor. Observamos que, en un portador de tumor chico, tanto la población T como la no-T liberan factores exacerbadores. En cambio en un portador de tumor avanzado sólo la población T es responsable de la exacerbación tumoral.

La población no-T está formada principalmente por linfocitos B y alrededor de un 2% de macrófagos, así esta población está involucrada en la producción de anticuerpos. Nosotros observamos, como discutiremos más adelante, que los complejos inmunes antígeno-anticuerpo están aumentados entre los 7 y 10 días de evolución tumoral. Además estos complejos exacerbaban el crecimiento tumoral, mientras que CIC aislado en etapas posteriores de evolución tumoral, no lo hacen. Lo cual concuerda con el hecho de que la población no-T tenga actividad exacerbadora sólo en estadios precoces y no es estadios avanzados del desarrollo tumoral.

3.5. Caracterización parcial de los factores, exacerbadores tumorales.

Como se discutió anteriormente la cinética de desaparición del FE es diferente dependiendo del tamaño del tumor en el momento de la cirugía.

Para intentar una caracterización parcial del FE, realizamos fraccionamiento de los sobrenadantes con actividad exacerbadora (SoETB, SoATB y SoATR). Encontramos un fracción

(F1) en los tres sobrenadantes, cuyo peso molecular es 220-250 KD en esta fracción se observan por inmunodifusión la presencia de inmunoglobulina. El contenido de hidratos de carbono es de 4,5% (P/P).

En el SoATB, encontramos además una segunda fracción (F2) de peso molecular entre 100 y 10 KDa, que parece ser un fragmento de F1.

La actividad exacerbadora no se pierde en soluciones de baja fuerza iónica, ni por sucesivos ciclos de congelación y descongelación.

Otros investigadores han informado que factores inmnológicamente activos se forman por la unión de dos subfactores inactivos (Patk, 1982). En nuestro modelo en el estado avanzado tanto F1 como F2 tienen actividad por separado, aunque no podemos descartar el hecho de que ambos actúen en forma conjunta in vivo.

El grupo de Watanabe (Watanabe, 1978) aisló un factor de bajo peso molecular pero que, en medios que contienen SFB, o cuando lo aislaba de plasma mostraba un alto PM, como consecuencia del acoplamiento a proteínas (α -globulinas) presentes en el suero. En nuestro caso esto no ocurre, porque los cultivos se realizaron en condiciones libres de suero, de modo que F1 tiene un alto PM por sí misma.

En un intento de caracterizar mejor el FE preparamos sueros inmunes xenogénicos, contra dos sobrenadantes exacerbadores. Los antisueros se ensayaron in vivo y demostraron que podían neutralizar la actividad exacerbadora. Co

mo el Anti-SoETB podía neutralizar al SoATB, podemos concluir que F2 es un fragmento de F1 o por lo menos que tiene determinantes antigénicos similares.

3.6. Factores angiogénicos presentes en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos.

La angiogénesis es un proceso que involucra el crecimiento de vasos preexistentes y la formación de nuevos capilares (Zawicki, 1981). Este es un fenómeno normal en procesos de regeneración y en procesos inflamatorios pero más evidente en procesos tumorales (Glaser, 1980; Gospodarowicz, 1978; Thakral, 1979). En vista de esto, se podría pensar que el fenómeno de angiogénesis contribuiría al rechazo del tumor, gracias a que permitiría la llegada de células inmuno competentes. Esto no es siempre cierto, y en muchos modelos se ha demostrado que el mismo tumor libera factores angiogénicos. Se produce una cascada angiogénica tumoral debida a un factor aislado recientemente (angiogenina) que colabora con varios factores como cobre, heparina y factores de crecimiento con afinidad por la heparina que producen la neovascularización (Folkman, 1975a), favoreciendo así el crecimiento tumoral debido al mejor aporte de nutrientes.

La respuesta angiogénica directa está además complementada por la indirecta mediada por el sistema inmune (Kaminsky, 1981; Polverini, 1977, 1984). La inducción de la

respuesta angiogénica mediada por células linfoideas de un portador de tumor se denomina angiogénesis inducida por linfocitos (LIA). Esta respuesta fue estudiada en nuestro laboratorio en detalle (Davel, 1984, 1985; Miguez, 1986). La Dra. Davel demostró que aparece muy tempranamente en el bazo del portador de tumor una respuesta LIA singeneica (S-LIA).

A continuación, estudiamos si la respuesta LIA podía estar mediada por productos solubles. Encontramos que los SoETB y SoATB tienen factores solubles capaces de inducir S-LIA. Luego de la cirugía, la actividad S-LIA desaparece si el tumor operado es precoz pero persiste si el tumor es avanzado. De aquí se puede inferir que la exacerbación tumoral y la actividad LIA son fenómenos que, por lo menos corren paralelos. Cuando estudiamos la población celular responsable de la liberación de factores inductores de S-LIA observamos que siempre prevalece la población T, independientemente del estadio tumoral. Por lo tanto podemos concluir que los factores angiogénicos son factores comprometidos en la exacerbación tumoral pero no son los únicos. Esto puede deducirse del hecho de que la exacerbación tumoral está mediada por linfocitos T y no-T en un ETB y por LT en un ATB, mientras que la actividad angiogénica está mediada por LT en ambos casos.

3.7. Complejos inmunes circulantes (CIC)

Dado que los LB están involucrados en la liberación de factores exacerbadores, y como estas células son productoras de anticuerpos, pensamos que los anticuerpos o los complejos inmunes podrían estar involucrados en el proceso de exacerbación tumoral. En vista de esto, dosamos complejos inmunes (CIC) en ratones portadores de tumor. Comprobamos que los CIC aumentan con la portación del tumor alcanzando valores significativamente elevados a los 7-10 días de evolución tumoral para luego decaer a valores normales. Este pico de elevación de complejos coincide con el tiempo al cual la población no-T libera actividad exacerbadora al medio de cultivo. Más interesante aún es la observación de que estos complejos son exacerbadores del crecimiento tumoral en una forma específica, ya que no modifican el crecimiento del tumor M3, ni M2.

En algunos cánceres humanos se ha correlacionado el aumento de CIC con un mal pronóstico de la enfermedad y la disminución de los CIC con una buena respuesta al tratamiento tumoral (Mooney, 1983). Nuestros resultados se oponen a estos hallazgos ya que demostramos que los CIC disminuyen en estadios avanzados de la enfermedad. No podemos descartar el hecho de que diferentes modelos presenten complejos que se diferencian en cantidad y calidad y consideramos que los CIC no servirían como un marcador de evolución tumoral sino que

significan un parámetro más asociado con la patología tumoral.

Cuando aislamos CIC en estadios avanzados del desarrollo tumoral observamos que estos no exacerban al tumor S13, ni aún cuando se usaron concentraciones proteicas superiores a las usadas con los CIC de estadios precoces. Esto demuestra que, durante el crecimiento del tumor, los CIC se modifican, no sólo en forma cuantitativa sino también cualitativa.

La exacerbación tumoral producida por CIC-ETB podría ser mediada por componentes inflamatorios, ya que es sabido que los CIC median muchas reacciones inflamatorias. Los cortes histológicos realizados sobre tumores que fueron exacerbados por CIC-ETB no presentan infiltrado linfocitario que apoye la hipótesis de la inflamación. En cambio se observó una cantidad significativa de mitosis en los tumores que fueron exacerbados por CIC-ETB comparado con los controles. Dado que los CIC no estimularon el crecimiento de células S13 in vitro, tenemos que pensar que ellos actúan indirectamente induciendo la liberación via sistémica de algún factor de crecimiento para el tumor.

Por último hidrolizamos los CIC exacerbadores y comprobamos que sus componentes por separado no tienen actividad exacerbadora sino que es necesaria la integridad del complejo para ello.

3.8. Relación huesped tumor

Mostramos anteriormente que los linfocitos de un portador de tumor liberan factores que favorecen el crecimiento del mismo tumor. Aunque el tumor no libera el FE, es necesario que esté presente en forma metabólicamente activo para que los linfocitos liberen dicho factor.

Uno de los fenómenos más importante en un tumor metabólicamente activo es la producción de enzimas proteolíticas (Liotta, 1986; Pauli, 1983; Mullis, 1983). Estas enzimas degradan tejido conectivo, permitiendo así la invasión tumoral. (Pereyra-Alfonso, 1986; Sloane, 1986).

La fibronectina es una de la principales glicoproteínas circulante y tisular que interviene en la constitución de membranas basales y en las interacciones celulares (Barlati, 1986; Akiyama, 1985). Se ha encontrado aumentada en el plasma de portadores de tumor y se ha correlacionado con su capacidad metastásica (Puricelli, 1985). Más interesante aún fue el descubrimiento de que fragmentos de FN que estaban aumentados en el plasma de pacientes oncológicos, tenían actividad transformante (De-Petro, 1981). En vista de estos hallazgos y teniendo en cuenta que la FN puede ser un contaminante cuando se aíslan CIC, decidimos estudiar el efecto de la FN y algunos de sus fragmentos sobre la exacerbación del tumor S13.

Realizamos estudios in vitro sobre esplenocitos nor

males, dado que los ensayos in vivo requerían concentraciones muy superiores de FN.

El tratamiento in vitro de esplenocitos normales con FN o sus fragmentos no modificó la respuesta LIA. Tampoco observamos liberación de factores exacerbadores o aumento de CIC. Por lo tanto a las dosis usadas y en las condiciones de cultivo la FN no es la responsable de la activación de los esplenocitos.

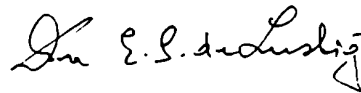
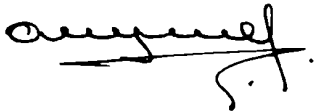
No podemos descartar el hecho de que la FN actúe in vivo, desencadenando una exacerbación tumoral y dando respuesta LIA positiva

RESUMEN GENERAL

4. Resumen General

A modo de resumen final detallaremos los puntos principales que se han desarrollado en esta tesis:

- a- Producción de factores estimuladores del crecimiento tumoral por el bazo de ratones portadores de tumor.
- b- Relación entre factores exacerbadores tumoral y el tamaño del tumor.
- c- Caracterización parcial de las fracciones con actividad exacerbadora.
- d- Poblaciones esplénicas que intervienen en el fenómeno de exacerbación tumoral.
- e- Neutralización de la actividad exacerbadora por sueros in munes xenogéneos.
- f- Relación de la actividad exacerbadora con factores circulantes como los CIC.
- g- Angiogénesis inducida por linfocitos, correlación con la exacerbación tumoral.



BIBLIOGRAFIA

- 1- Agnello V.
Detection of immune complexex.
En: Rose NR, Friedman H., eds Manual of Clinical Immunology.
Washington, DC American Society for Microbiology; 669, 1976.
- 2- Akiyama S.K.; Hasegawa E.; Hasegawa T.; Yamada K.M.
The interaction of fibronectin fragments with fibroblastic cells.
J. of Biological Chemistry 260 (N° 24): 13256, 1985.
- 3- Akiyama S.K.; Yamada SS.; Yamada K.M.
Characterization of a 140-KD avian cell surface antigen as a fibronectin-binding molecule.
J. of cell biology. 102: 442, 1986.
- 4- Akiyama S.K.; Yamada K.M.
Biosynthesis and acquisition of biological activity of the fibronectin receptor.
J. of Biological chemistry 262 (N° 36): 17536, 1987.
- 5- Akiyama S.K.; Yamada K.M.
Fibronectin.
Adv. Enz. and related areas of molecular biology. Editado por Dr. Alton Meister © 1987 por J. Wiley & Sons, 59: 1, 1987 b).
- 6- Akolkar P.N.; Aduani S.A.; Gothoskar B.P.
Circulating immunocomplexes in Hodgkin's disease.
Neoplasma 30: 73, 1983.

- 7- Alessandri G.; Raju K.; Gullino P.
Mobilization of capillary endothelial cells in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo.
Cancer Res. 43: 1790, 1983.
- 8- Alexander S.S.; Colonna G.; Yamada K.M.; Pastan I.; Edelhoch H.
Molecular properties of a major cell surface protein from chick embryo fibroblasts.
J. Biol. Chem. 253: 5820, 1978.
- 9- Alexander S.S.; Colonna G.; Edelhoch H.
The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin.
J. Biol. Chem. 254: 1501, 1979.
- 10- Algire G.
An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse.
J. Natl. Cancer Inst. 4: 1, 1943.
- 11- Algire G.H.; Charkley H.W.; Legallais F.V.; Parle H.D.
Vascular reaction of normal and malignant tumors in vivo.
I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants.
J. Natl. Cancer Inst. 6: 73, 1945.
- 12- Ali I.; Hynes R.
Effects of LETS glycoprotein on cell motility.
Cell 14: 439, 1978.

- 13- Alitalo K.; Vaheri A.
Pericellular matrix in malignant transformation.
Adv. Cancer Res. 37: 111, 1982a).
- 14- Alitalo K.; Keski-Oja J.; Hedman K.; Vaheri A.
Loss of different pericellular matrix components of rat
cells transformed with a T class ts mutants of Rous
sarcoma virus.
Virology 119: 347 , 1982b).
- 15- Amelio Di R.; Cooke B.; Hobbs J.R.
Circulating immune complexes in human malignant melanoma.
Tumori, 68:469, 1982.
- 16- Anzano M.A.; Roberts A.B.; Smith J.M.; Sporn M.B.;
De Larco J.E.
Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally
transformed cells is composed of both type α and type β
transforming growth factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6264 , 1983.
- 17- Averbach R.; Kubai L.; Knighton D.; Folkman J.
A simple procedure for the long term cultivation of chick
embryos.
Dev. Biol. 41: 391, 1974.
- 18- Averbach R.; Kubai L.; Sidkv J.
Angiogenesis induction by tumors, embryonic, tissues and
lymphocytes.
Cancer Res. 36: 3425, 1976.

- 19- Auerbach R., Sidky Y.
Nature of the stimulus leading to lymphocyte induced
angiogenesis.
J. Immunol. 123: 751, 1979.
- 20- Auerbach R.
Angiogenesis-inducing factors, a review.
En: Lymphokines pag. 69, vol. 4, (1981). Editado por E.
Pick y M. Laudry, Academia Press.
- 21- Ausprunk D.; Knighton D.; Folkman J.
Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted
to the chick chorioallantois: role of host and preexisting
graft blood vessels.
Am. J. Pathol. 79: 597, 1975.
- 22- Ausprunk D., Folkman J.
Migration and proliferation of endothelial cells in
preformed and newly formed vessels during tumor-angiogenesis.
Microvasc. Res. 14: 53, 1977.
- 23- Azizkhan R.; Azizkhan J.; Zetter B., Folkman J.
Mast cell heparin stimulates migration of capillary
endothelial cells in vitro.
J. Exp. Med. 152: 931, 1980.
- 24- Baird A., Esch F.; Bohlen P.; Ling N.; Gospodarowicz D.
Isolation and partial characterization of an endothelial
cells growth factor from the bovine kidney: homology with
basic fibroblast growth factor.
Regul. Pept. 12: 201, 1985.

- 25- Baldwin R.W.; Robins R.A.
Humoral factors abrogating cell-mediated immunity in the tumor-bearing host.
Curr. Top. Microbiol. Immunol 72: 21, 1975.
- 26- Balian, G.; Click E.M.; Bornstein P.
Location of a collagen-binding domain of fibronectin.
J. Biol. Chem. 255:3234, 1980.
- 27- Barlati S.; De-Petro G.; Vartio T.; Vaheri A.
Transformation-enhancing factors and fibronectin degradation products as possible tumor markers.
En: Biochemical and biological markers of neoplastic transformation. Editado por Prakash Chandra (Planum Publishing Corporation) p.p. 295, 1983.
- 28- Barnett E.V.; Knutson D.W.; Abrass C.K.; Chia D.S.; Young L.S.; Liebling M.R.
Circulating Immune Complexes:
Their Immunochemistry, Detection and Importance.
Annals of Internal Medicine , 91: 430, 1979.
- 29- Barnhill R.; Ryan T.
Biochemical modulation of angiogenesis in the choriallantoic membrane of the chick embryo.
J. Invest. Dermatol. 81: 485, 1983.

- 30- Bowman P.; Betz A.; Ar D.; Wolinsky J.; Penney J.; Shivers R.; Goldstein G.
Primary culture of capillary endothelium from rat brain.
In vitro 17: 353, 1981.
- 31- Boyse E.A.; Old L.J.
Some aspects of normal and abnormal cell-surface genetics.
Ann. Rev. Genet 3: 269, 1969.
- 32- Buessow S.; Paul R.; Lopez D.
Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice.
J. Natl. Cancer Inst. 73: 249, 1984.
- 33- Burgess W.; Mehlman T.; Marshak D.; Fraser B.; Maciag T.
Structural evidence that endothelial cell growth factor B is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 7216, 1986.
- 34- Burgos H.
Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta.
Eur. J. Clin. Invest. 13: 289, 1983.
- 35- Byers V.S.; Johnston J.O.
Antigenic differences among osteogenic sarcoma tumor cells taken from different locations in human tumor.
Cancer Res. 37: 3173, 1977.

- 36- Cafruny W.A.; Senitzer D.
Protein A-binding immunosuppressive mouse serum factors.
Cancer Immunol. Immunoth. 17: 200, 1984.
- 37- Cano P.O.; Jerry L.M.; Sladowski J.P.; Osterland C.K.
Circulating immune complexes in systemic lupus
erythematosus.
Clin. Exp. Immunol. 29: 197, 1977.
- 38- Carpentier N.A.; Lange G.T.; Fiere D.M.; Fournie G.J;
Lambert P.H.; Miescher P.A.
Clinical relevance of circulating immune complexes in
human leukemia: association in acute leukemia of the
presence of immune complexes with unfavorable prognosis.
J. Clin. Invest, 60: 874, 1977.
- 39- Casali P.; Bossus A.; Carpentier N.A.; Lambert P.H.
Solid-phase enzyme immunoassay or radioimmunoassay for
the detection of immune complexes based on their
recognition by conglutinin: conglutinin binding test.
A comparative study with ¹²⁵I-labelled C1q binding and R_a
ji-cell RIA test.
Clin. Exp. Immunol, 29: 342, 1977.
- 40- Castellot I.; Karnovsky M.; Spiegelman B.
Differentiation dependent stimulation of neovascularization
and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5597, 1982.

- 41- Chang R.; Turk J.L.
Increased resistance in splenectomized mice to
methylcholantrene induced tumor.
Br. J. Cancer 35: 768, 1977.
- 42- Chen A.B.; Amrani D.L.; Mosesson M.W.
Heterogeneity of the cold-insoluble globulin of human
plasma (C1g), a circulating cell surface protein.
Biochim. biophys. Acta 493: 310, 1977.
- 43- Chen Yi-H; Anderson A.B.;
Effector mechanism of tumor Immunity in murine plasmacytoma.
Cancer Res. 48: 1398, 1988.
- 44- Cheung H.T.; Catarow W.D.; Sundharadas G.
Characteristics of low-molecular-weight factor extracted
from mouse tumors that affects in vitro properties of
macrophages.
Int. J. Cancer 23: 344, 1979.
- 45- Chia D.; Dorsch C.A.; Levy L, Barnett E.V.
The metabolism of nucleic acids in mice.
Immunology, 36: 323, 1979.
- 46- Clark E.; Kirby-Smith H.; Rex.R.; Williams R.
Recent modifications in the method of studying living
cells and tissues in transparent chambers inserted in the
rabbit's ear.
Anat. Rec. 47: 187, 1930.

- 47- Clemmensen I.; Andersen R.B.
Different molecular forms of fibronectin in rheumatoid synovial fluid.
Arthritis Rheum. 25: 25, 1982.
- 48- Cochran A.J.; Mackie R.M.; Ross C.E.; Ogg L.; Jackson A.
Leukocyte migration inhibition by cancer patients' sera.
Int. J. Cancer 18: 274, 1976.
- 49- Coll J.M.; Luborsky S.W.; Mora P.T.
Metabolically labeled cell membrane protein in spontaneously and SU40 virus transformed mouse fibroblasts.
Biochemistry 16: 3169, 1977.
- 50- Colonna G.; Alexander S.S.; Yamada K.M.; Pastan I.; Edelhoch H.
The stability of cell surface protein to surfactants and denaturants.
J. Biol. Chem 253: 7787, 1978.
- 51- D'Amore P.; Glaser B.; Brunson S.; Fenselaud A.
Angiogenic activity from bovine retina.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 3068, 1981.
- 52- Davel L.; Miguez M.; Sacerdote de Lustig E.
Angiogenesis induction by lymphocytes from tumor-bearing mice in a syngeneic combination.
Transplantation 37: 327, 1984.

- 53- Davel L.; Miguez M.; Sacerdote de Lustig E.
Evidence that indometacin inhibits lymphocyte-induced angiogenesis.
Transplantation, 39(5): 564, 1985
- 54- Davison P.; Beusch K.; Karasek M.
Isolation and long term cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis.
In vitro 19: 937, 1983.
- 55- De-Petro G.; Barlati S.; Vartio T.; Vaheri A.
Transformation - enhancing activity of gelatin - binding fragments of fibronectin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(N° 8): 4965, 1981.
- 56- De-Petro G.; Barlati S.; Vartio T.; Vaheri A.
Transformation - enhancing activity in plasma of tumor patients: relationship with fibronectin fragments.
Inst. J. Cancer 31: 157, 1983.
- 57- Der, C.J.; Stanbridge E.J.
Lack of correlation between the decreased expression of cell surface LETS protein and tumorigenicity in human cell hybrids.
Cell. 15: 1241, 1978.
- 58- Dewhirst F.E.; Stashenko P.P.; Mole J.E.; Tsurumachi T.
Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1β .
J. Immunology 135(N° 4): 2562, 1985.

- 59- Diament M.; Klein S. Bonaparte Y.P.de.
Función del bazo y crecimiento de la metástasis. Influencia del extracto tumoral.
Medicina. 45: 412, 1985.
- 60- Doan R.; Ollier-Hartman M.
Study of circulating immune complexes in three hematologic diseases: acute myeloid leukemia and hematosarcoma.
Cancer Immunol. Immunother, 8(N°2/3): 161, 1980.
- 61- Doe W.F.; Booth C.C.; Brown D.L.
Evidence for complement - binding immune complexes in adult coeliac disease, Chorhn's disease, and ulcerative colitis.
Lancet, 1: 402, 1973.
- 62- Eiján A.M.; Jasnís M.A.; Oisgold-Dagá S.
Liberación de factores exacerbadores del crecimiento tumoral en sistema murino.
Medicina. 44 (N° 6): 650, 1987a).
- 63- Eiján A.M.; Jasnís M.A.; Kohan S.; Oisgold-Dagá S.
Nature of spleen cell population capable of releasing tumor enhancing factor.
Journal of Surgical Oncology, 36: 161, 1987 b).
- 64- Eiján A.M.; Jasnís M.A.; Motta A.B.; Oisgold-Dagá S.
Isolated soluble fractions from spleen cell culture supernatants induce tumor enhancement.
Journal of Surgical Oncology. 41: 134, 1989 a).

- 65- Eiján A.M.; Oisgold Dagá S.
Production of tumor enhancing factors in a murine system.
Journal of Exp. Clin. Cancer Res. (en prensa) 1989b).
- 66- Einsenstein R.; Sorgente N.; Soble L.; Miller A.; Kuettnner K.
The resistance of certain tissues to invasion: Penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme.
Am. J. Pathol. 73: 765, 1973.
- 67- Eiras A.S.; Robins R.A.; Baldwin R.W.; Byers V.S.
Circulating immune complexes in patients with bone tumours.
Int. J. Cancer 25: 735, 1980.
- 68- Ehrlich P.
Über den jetzigen stand der karzinomforschung.
En: The collected Papers of Paul Ehrlich, vol. II,
Pergamon Press, London, pp 550, 1957.
- 69- Emlen W.; Mannik M.
Kinetics and mechanisms for removal of circulating single stranded DNA in mice.
J. Exp. Med. 147: 684, 1978.
- 70- Emmerling M.R.; Johnson C.D.; Mosher D.F.; Lipton B.H.; Lilien J.E.
Cross-linking and binding of fibronectin with asymmetric acetylcholin-esterase.
Biochemistry 20: 3242, 1981.

- 71- Engel J.; Odermatt E.; Engel A.; Madri J.A.; Furthmayr H.; Rohde H.; Timpl R.
Shapes, domain organizations and flexibility of two multifunctional proteins of the extracellular matrix: laminin and fibronectin.
J. molc. Biol. 150: 97, 1981.
- 72- Engvall E.; Rouslahti E.
Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen.
Int. J. Cancer 20: 1, 1977.
- 73- Engvall E.; Rouslahti E.; Miller E.J.
Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and fibrinogen.
J. Exp. Med. 147: 1584, 1978.
- 74- Esparza I.; Green R.; Schriber R.D.
Inhibition of macrophages tumoricidal activity by immune complexes and altered erythrocytes.
J. Immunol. 131: 2117, 1983.
- 75- Fagan J.B.; Sobel M.E.; Yamada K.M.; Crombrughe B. de; Pastan I.
Effects of transformation on fibronectin gene expression using cloned fibronectin DNA.
J. Biol. Chem. 256: 520, 1981.

- 76- Federman J.; Bown G.; Feldberg N.; Felton S.
Experimental ocular angiogenesis.
Am. J. Ophthalmol. 89:231, 1980.
- 77- Fekete B.; Fust G.; Pal A.; Angyal I.
Clinical correlates of circulating immune complexes levels
in advanced lung cancer. A discrimination analysis.
Oncology, 40: 106, 1983.
- 78- Folkman I.; Merlen E.; Abernathy C.; Williams G.
Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.
J. Exp. Med. 133: 275, 1971.
- 79- Folkman J.
Tumor angiogenesis.
Adv. Cancer Res. 19: 331, 1974.
- 80- Folkman J.
Tumor angiogenesis.
En Cancer Vol. 3, pag. 355, 1975 a). Editado por F.
Becker, Plenum Press, New York.
- 81- Folkman J.; Klagsburn M.
Tumor angiogenesis: effect on tumor growth and immunity.
En: Fundamental aspects of neoplasia, pag. 401, 1975 b).
Editado por Glottieb, Plescia, Bishop. Springer-Verlag,
New York Inc.

- 82- Folkman J.; Langer R.; Lindhart R.; Haudenschild C.; Taylor S.
Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221: 719, 1983.
- 83- Folkman J.
How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue.
Cancer Res. 46: 467, 1986.
- 84- Folkman J.
What is the role of Angiogenesis in Metastasis from cutaneous melanoma?
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23(N°4): 361, 1987.
- 85- Fujimoto S.; Greene M.I.; Schon A.H.
Regulation of the immune response to tumor antigens. I) Immunosuppressor cells in tumor-bearing host.
J. Immunol. 116: 791, 1976a).
- 86- Fujimoto S.; Greene M.; Schon A.H.
Regulation of the immune response to tumor antigens. II) The nature of immunosuppressor cells in tumor bearing host.
J. Immunol. 116: 800, 1976b).
- 87- Furie M.B.; Frey A.B.; Rifkin D.B.
Location of a gelatin-binding region of human plasma fibronectin.
J. Biol. Chem. 255: 4391, 1980.

- 88- Gabizon A.; Small M.; Trainin N.
Kinetics of the response of SC from TB animals in an in vivo tumor neutralization assay.
Int. J. Cancer: 18: 812, 1976.
- 89- Garbisa S.; Kniska K.; Trygovason K.; Foltz C.; Liotta L.A.
Quantitation of basement membrane collagen degradation by living tumor cells in vitro.
Cancer Letters, 9: 359, 1980.
- 90- Glaser B.; D'Amore P.
Adult tissues contain chemoattractants for vascular endothelial cells.
Nature 288: 483, 1980.
- 91- Gorelik E.; Fogel M.; Feldman M.; Segal S.
Differences in resistance of metastatic tumor cells and cells from local tumor growth to cytotoxicity of natural killer cells.
J. Natl. Cancer Inst. 63: 1397, 1979.
- 92- Gospodarowicz D.; Thakral K.
Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75: 847, 1978.

- 93- Gospodarowicz D.; Cheng I.; Lui G.; Baird A.; Esch F.; Bohlen P.
Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor.
Endocrinology 117: 2383, 1985.
- 94- Greenblat M.; Shubik P.
Tumor angiogenesis. Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.
J. Natl. Cancer Inst. 41: 111, 1968.
- 95- Gropp C.; Havemann K.; Scherfe T.; Ax W.
Incidence of circulating immune complexes in patients with lung cancer and their effect on antibody-dependent cytotoxicity.
Oncology, 37: 71, 1980.
- 96- Gross J.; Moscatelli D.; Jaffe E.; Rifkin D.
Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells.
J. Cell. Biol. 95: 974, 1982.
- 97- Gross J.; Moscatelli D.; Rifkin D.
Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 2623, 1983.
- 98- Haakenstad A.O.; Mannik M.
The disappearance kinetics of soluble immune complexes prepared with reduced and alkylated antibodies and with intact antibodies in mice.
Lab. Invest 35: 283, 1976.

- 99- Hahn L.H.E.; Yamada K.M.
Isolation and biological characterization of active fragments of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Cell* 18: 1043, 1979.
- 100- Havemann, C.; Scherfe T.; Ax W.
Incidence of immune complexes in patients with lung cancer and their effect on antibody dependent cytotoxicity. *Oncology* 37: 71, 1980.
- 101- Hay F.C.; Nineham L.J.; Roitt I.M.
Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase Clq. *Clin Exp. Immunol*; 24: 396, 1976.
- 102- Hayashi M.; Yamada K.M.
Differences in domain structures between plasma and cellular fibronectins. *J. Biol. Chem.* 256: 11292, 1981.
- 103- Hayashi M.; Yamada K.M.
Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. *J. Biol. chem.* 257: 5263, 1982.
- 104- Hellström I.; Hellström K.E.
Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney-virus induced mouse sarcomas. *Int. J. Cancer*; 4: 587, 1969.

- 105- Hellström K.E.; Hellström I.
Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens.
Adv. Immunol. 18: 209, 1974.
- 106- Hellström K.E.; Hellström I.
Evidence that tumor antigens enhance tumor growth in vivo by interacting with a radiosensitive (suppressor?) cell population.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 75: 436, 1978.
- 107- Herberman R.
Report on international comparative evaluation of possible value of assays for immune complexes for diagnosis of human breast cancer.
Int. J. Cancer, 27(N°5): 569, 1981.
- 108- Hewitt H.B.; Blake E.R.; Walder A.S.
A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origins.
Br. J. Cancer 33: 241, 1976.
- 109- Hirai R.; Yamaoka K.; Mitsui H.
Isolation and partial purification of a new class of transforming growth factor from an avian sarcoma virus-transformed cells line.
Cancer Res. 43: 5742, 1983.

- 110- Hoffken K.; Meredith I.D.; Robins R.A.; Baldwin R.W.;
Davies C.J.; Blamey R.W.
Circulating immune complexes in patients with breast cancer.
Br. Med. J. 2: 218, 1977.
- 111- Hollander N.; Isakov N.; Segal S.; Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells
from tumor-bearing animals. II Characterization of the
cell populations involved in its productions and release.
Int. J. Cancer 22: 471, 1978.
- 112- Hood L.; Weissman I.; Wood W.; Wilson J.
Effector mechanisms of the immune system.
En: Immunology Gillen, eds. California, 334, 1984.
- 113- Hormann H.; Seidl M.
Affinity chromatography on immobilized fibrin monomer.
III. The fibrin affinity center of fibronectin. Hoppe
seyler's.
Z. physiol. Chem. 361: 1449, 1980.
- 114- Hudson L.; Hay F.C.
En: Practical Immunology 2º Edición, p.278, 1980.
Editado por Blackwell Scientific Publications.

- 115- Humphries M.; Akiyama S.K.; Komoriva A.; Olden K.; Yamada K.M.
Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediate cell type-specific adhesion.
J. of Cell. Biology 103(N°6, pt 2), 2637, 1986.
- 116- Huber S.A.; Bigi G.; Lucas Z.J.
Cycling of immune response to syngeneic murine mammary adenocarcinoma.
Cancer Res. 40: 3484, 1980.
- 117- Isakov N.; Segal S.; Hollander N.; Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor-bearing animals. I. Effect on tumor growth and antibody production.
Int. J. Cancer. 22: 465, 1978.
- 118- Isakov N.; Feldman M.; Segal S.H.
Effect of lactic deshydrogenase virus infection on tumor induction and tumor growth.
Cancer Res. 41: 667, 1981.
- 11 - Izui S.; Lambert P.H.; Miescher P.A.
In vitro demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA: a possible basis for a local formation of DNA-antiDNA complexes in systemic lupus erythematosus.
J. Exp. Med. 144: 428, 1976.

- 120- Jakob W.; Jentzsch K.; Maversberg G.; Heder G.
The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay
for angiogenesis factors: reactions induced by carrier
materials.
Exp. Path. 15: 241, 1978.
- 121- Jasniz M.A.; Eiján A.M.; Oisgold-Dagá S.
Factores exacerbantes en el bazo de ratones operados de
tumor grande.
Medicina 42, (6/2): 801, 1982.
- 122- Jasniz M.A.; Eiján A.M.; Oisgold-Dagá S.R.
Regulation of tumor growth by soluble spleen factors:
effect of tumor resection.
J. Surg. Oncol. 35: 139, 1987.
- 123- Jaye M.; Howk R.; Burgess W.; Ricca G.; Chui I.; Ravera
M.; O'Brien S.; Modi W.; Macias T.; Drohan W.
Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide
sequence and chromosomal localization.
Science 233: 541, 1986.
- 124- Jennette J.C.; Feldman J.D.
Sequential quantitation of circulating immune complexes
in syngeneic and allogeneic rats bearing Maloney sarcomas.
J. Immunol. 118: 2269, 1977.

- 125- Jennette J.C.
Consistent fluctuation in quantities of circulating immune complexes during progressive and regressive phases of tumor growth.
Amer. J. Pathol, 100: 403, 1980.
- 126- Julius H.M.; Simpson E.; Herzenberg L.A.
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived lymphocytes.
Europ. J. Immunol. 3: 645, 1973.
- 127- Jurin M.; Plavsic B.
Dynamics of immunity in syngeneic lymphoma bearing mice.
Europ. J. Cancer 14: 653, 1978.
- 128- Kahn P.; Shin S.L.
Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability.
J. Cell. Biol. 82: 1, 1979.
- 129- Kaliss N.
The survival of homografts in mice pretreated with antisera to mouse tissues.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 64: 977, 1957.
- 130- Kaminsky M.J.; Nowacyk M.; Skopinska-Rozewska E.; Kaminsky A.
Human peripheral blood T lymphocyte subpopulation isolated on the basis of their affinity for sheep red blood cells differ in angiogenesis inducing capability.
Clin. Exp. Immunol. 46: 327, 1981.

- 131- Kennard J.; Zolla-Pazner S.
Origin and function of suppressor macrophages in myeloma.
J. Immunol. 124: 268, 1980.
- 132- Keski-Oja J.; Mosher D.F.; Vaheri A.
Cross-linking of a major fibroblast surface-associated
glycoprotein (fibronectin) catalized by blood coagulation
factor XIII.
Cell. 9: 29, 1976.
- 133- Keski-Oja J.; Yamada K.M.
Isolation of an actin-binding fragment of fibronectin.
Biochem J. 193: 615, 1981.
- 134- Keski-Oja J.; Gahmberg C.G.; Alitalo K.
Pericellular matrix and cell surface glycoproteins of
virus-transformed mouse epithelial cells.
Cancer Res. 42: 1147, 1982a).
- 135- Keski-Oja J.; Rapp, U.R.; Vaheri A.
Transformation of mouse epithelial cells by acute murine
sarcoma virus 3511: inhibition of collagen synthesis and
induction of novel polypeptides.
J. Cell. Biochem 20: 139, 1982b).
- 136- Kessler D.; Langer R.; Pless N.; Folkman J.
Mast cells and tumor angiogenesis.
Int. J. Cancer 18: 703, 1976.

- 137- Kijlstra A.; Vanes L.A.
Enhanced degradation of soluble immune complexes by guinea-pig peritoneal macrophages in the presence of complement.
Immunology, 43: 345, 1981.
- 138- Kier Joffé E.B.de; Eiján A.M.; Disgold-Dagá S.
Actividad de los sobrenadantes esplénicos de ratones portadores de tumor sobre el crecimiento in vitro de células tumorales.
Medicina. 47(n° 6): 651, 1987.
- 139- Klein S.; Bonaparte Y.P.de, D'Elia I.S.de.
Enhancement of the incidence of metastasis in tumor-resected mice.
Invasion and Metastasis. 5:309, 1985.
- 140- Knighton D.; Silver I.; Hunt T.
Regulation of wound-healing angiogenesis. Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration.
Surgery 90: 262, 1981.
- 141- Kontiainen S.K.; James R.F.L.; Culbert E.J., Feldman M.
Structure of antigen-specific suppressor factor: Current views.
Surv. Immunol. Res. 1:17, 1982.

- 142- Koppi T.; Halliday W.J.
Cellular origin of blocking factors from cultured spleen cells of tumor-bearing mice.
Cell. Immunology, 76: 29, 1983.
- 143- Koppi-Reynolds T.A.; Halliday W.J.
A two-chain tumour-related; suppressor factor specific for a sequence antigen.
Immunology Letters, 8:219, 1984 a).
- 144- Koppi T.; Khan J.; Halliday W.
Suppression by serum of immunoreactivity to a common tumor antigen in cancer patients.
Oncology 41: 77, 1984b).
- 145- Koster F.; Levin J.; Walker L.
Nephrotic syndrome in "Schistosomiasis mansoni" complicated by chronic salmonellosis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 713, 1975.
- 146- Koster F.; Levin J.; Walker L.
Hemolytic-uremic syndrome after shigellosis: relation to endotoxemia and circulating immune complexes.
N. Eng. J. Med. 298: 927, 1978.
- 147- Kothes P.; Pick E.
Studies on the inhibition of macrophage migration induced by soluble antigen-antibody complexes.
Clin. Exp. Immunol. 19: 105, 1975.

- 148- Kradin R.L.; Zhu Y.; Hales Ch. A.; Bianco C.; Colvin R.
Response of pulmonary macrophages to hyperoxic pulmonary injury.
Am. J. Pathol. 125: 346, 1986.
- 149- Kramer R.H.; Gonzalez R.; Nicolson G.L.
Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells.
Int. J. Cancer 26: 639, 1980.
- 150- Krapf F.; Renger D.; Schendel I.
A peg-precipitation laser nephelometer technique for detection and characterization of circulating immune complexes in human sera.
Journal of Immunological methods, 54: 107, 1982.
- 151- Krapf F.; Renger D.; Schdel I.; Fricke M.; Kemper A.; Deicher H.
Circulating immune complexes in malignant diseases increased detection rate by simultaneous use of three assay methods.
Cancer Immunol. Immunother., 15: 138, 1983.
- 152- Krieger G.; Khela A.; Wander H.E.; Salo A.M.; Rauschecker H.F.; Nagel G.A.
Clinical significance of circulating immune complexes in patients with metastatic breast cancer.
Int. J. Cancer 31: 207, 1983

- 153- Kristensen E.; Bradslund I.; Nielsen H.; Svehag S.E.
Prognostic value of assays for circulating immune complexes and natural cytotoxicity in malignant skin melanoma (Stages I and II).
Cancer Immunol. Immunother, 9: 31, 1980.
- 154- Kumar R.K.; Lykke A.W.J.; Penny R.
Immunosuppression associated with SJL/J murine lymphoma II characterization of a plasma suppressor factor in tumor bearing mice.
J. Natl. Cancer Inst. 67(N°6): 1277, 1981.
- 155- Kwong L.; Kilburn G.D.; Teh H.S.
The use of cytotoxic T cells in the regulation of tumor growth in syngeneic mice.
Cancer Immunol. Immunother 17: 205, 1984.
- 156- Lahey S.J.; Steele G.; Rodrick M.; Berkowitz R.; Goldstein D.; Ross D.; Ravikumar T.; Wilson R.; Byrn R.; Thomas P.; Zamcheck N.
Characterization of antigenic components from circulating immune complexes in patients with gestational trophoblastic neoplasia.
Cancer, 53:1316, 1984.
- 157- Lambert P.H.; Nydegger U.E.; Perrin L.H.; Mc Cormick J.; Fehr K.; Miescher P.A.
Complement activation in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: ¹²⁵I-C1q binding capacity and complement breakdown products.
Rheumatology. 6: 52, 1975.

- 157⁴ Lambert P.H.; Bricteux N.; Salmon J.; Miescher P.A.
Dynamics of immune complex nephritis during antibody excess.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol, 45: 185, 1973
- 158- Lambert P.H.; Dixon F.J.; Zubler R.H.
A who collaborative study for the evaluation of eighteen
methods for detecting immune complexes in serum.
J. Clin. Lab. Immunol., 1: 1, 1978.
- 159- Langer R.; Folkman J.
Polymers for the sustained release of proteins and other
macromolecules.
Nature; 23(6):797, 1976.
- 160- Lanser R.; Conn H.; Vacnati J.; Haudenschild C.; Folkman J.
Control of tumor growth in animals by infusion of an
angiogenesis inhibitor.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 4331, 1980.
- 161- Laterra J.; Ansbacher R.; Culp L.A.
Glicosaminoglycans that bind cold-insoluble globulin in
cell-substratum adhesion sites of murine fibroblasts.
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 77: 6662, 1980.
- 162- Lattime E.C.; Stoppacciaro A.; Khan A.; Stutman O.
Human natural cytotoxic activity mediated by tumor
necrosis factor: regulation by Interleukin-2.
J. Natl. Cancer Inst. 80 (N°13): 1035, 1988.
- 163- Leibovich J.; Polverini P.; Shepard M.; Wiseman D.;
Shiveli V.; Nuseir N.
Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor-
necrosis factor alpha.
Nature 329: 530, 1987.

164- Leslie R.

Complex aggregation: a critical event in macrophage handling of soluble immune complexes.

Immunology today. 6: 183, 1986.

165- Levinsky R.J.; Cambiaso C.J.; Masson P.L.; Heremans J.F.

Detection of circulating antigen-antibody complexes by their inhibitory effect on the agglutination of IgG coated particles by rheumatoid factor Clq.

Clin. Exp. Immunol. 25: 212, 1976.

166- Levinsky R.J.

Methods of detecting immune complexes.

En: Clinical Aspects of Immunology. Lachmann y Peters eds. Blackwell Scientific Publications. Fourth Edition, 398, 1982.

167- Liotta L.A.; Tryggvason K.; Garbisa S.; Hart I.; Foltz C.M.; Shafie S.

Metastatic potential correlated with enzymatic degradation of basement membrane collagen.

Nature 284: 67, 1980.

168- Liotta L.A.

Tumor invasion and metastasis. Role of the extracellular matrix.

Cancer Res. 46: 1, 1986.

- 169- Lobb R.; Lass E.J.; Sullivan R.; Shing J.; D'Amore P.;
Jacobs I.; Klagsburn M.
Purification and characterization of heparin binding
endothelial cell growth factors.
J. Biol. Chem. 261: 1924, 1986.
- 170- Lockwood C.M.; Rees A.J.; Pinching A.J.
Plasma-exchange and immunosuppression in the treatment
of fulminating immune-complex crescentic nephritis.
Lancet, 1: 63, 1977.
- 171- Luty G.; Thompson D.; Gallup J.; Mello R.; Patz A.;
Fenselau A.
Vitreous and inhibitor of retinal extract induced
neovascularization.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24: 52, 1983.
- 172- Maier T.; Kilburn D.G.; Levy J.G.
Properties of Syngeneic and allogeneic antisera raised
to tumor-specific suppressor factor from DBA/2J mice.
Cancer Immunol. Immunother. 12: 49, 1981.
- 173- Maier T.; Levy J.
Antitumor effects of an antiserum raised in syngeneic
mice to a tumor-specific T suppressor factor.
Cancer Imm. Immunother. 13: 134, 1982.

- 174- Mc Carthy J.B.; Skubitz A.P.M.; Palm S.L.
Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin.
J. of Nat. Cancer Inst. 80(N°2): 108, 1988.
- 175- Mc Donagh R.P.; Mc Donagh J.; Petersen T.E.; Thogersen H.C.; Skorstengaard K.; Sottrup-Jesen L.; Magnusson S.; Dell A.; Morris H.R.
Amino acid sequence of the factor XIIIa acceptor site in bovine plasma fibronectin.
FEBS Lett. 127: 174, 1981.
- 176- Mc. Donald J.A.; Kelley D.G.; Broekelmann T.J.
Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization of fibroblast extracellular matrix.
J. Cell. Biol. 92: 485, 1982.
- 177- Mc Donald T.L.
Isolation of Clq-binding virus-Ab CI from LDV-infected mice.
Immunologi 45: 365, 1982.
- 178- Mc Donald T.L.
Blocking of cell-mediated Immunity to Moloney Murine sarcoma virus-transformed cells by lactate Deshydrogenase virus-antibody complex.
J. Natl. Cancer Inst. 70 (N°3): 493, 1983.

- 178- Mc Duffie F.C.
Immune complexes in the reumatic diseases.
J. Allergy Clin. Immunol. 62: 37, 1978.
- 179- Manor Y.; Treves A.; Cohen I.; Feldman M.
Transition from T-cell protection to T-cell enhancement
during tumor growth in a allogenic host.
Transplantation 22: 360, 1976.
- 180- Medoff J.R.; Clack V.D.; Roche J.K.
Characterization of an immunosuppressive factor from
malignant ascites that resembles a factor induced in
vitro by carcinoembryonic antigen.
The J. of Immunol. 137(N°6): 2057, 1986.
- 181- Menzel E.J.; Smolen J.S.; Liotta J.; Reid K.B.M.
Interaction of fibronectin with Clq and its collagen-like
fragment (CLF).
FEBS Lett. 129: 188, 1981.
- 182- Mergia A.; Eddy R.; Abrahan J.; Fiddes J.; Shows T.
The genes for basic and acidic fibroblast growth factors
are on different human chromosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 644, 1986.

- 183- Mignatti P.; Robbins E.; Rifkin D.B.
Tumor invasion through the human amniotic membrane:
Requirement for a proteinase cascade.
Cell, 47: 487, 1986.
- 184- Miguez M.; Davel L.; Sacerdote de Lustig E.
Lymphocyte-induced angiogenesis. Correlation with the
metastatic incidence of two murine mammary adenocarcinomas.
Invasion Metastasis 6: 313, 1986.
- 185- Mikulski S.M.; Muggia F.M.
The suppressor mechanisms and their significance in
tumor immunology.
Cancer Immunol. Immunother. 4: 139, 1978.
- 186- Millerioux L.; Duchage N.; Masson A.; Lenfant M.
Relation between a spleen-derived immunosuppressive
peptide and the immunoglobulin-binding factor.
Cell. Immunol., 58: 209, 1981.
- 187- Miner K.M.; Nicolson G.L.
Differences in the sensitivities of murine metastatic
lymphoma/lymphosarcoma cells to macrophage-mediated
cytolysis and/or cytostatic.
Cancer Res. 43: 2063, 1983.

- 188- Mohamed I.; Ansell B.M.; Holborow E.J.; Bryceson A.D.M.
Circulating immune complexes in subacute infective
endocarditis and post-streptococcal glomerulonephriti
J. Clin. Pathol. 30: 308, 1977.
- 189- Moscatelli D.; Gross J.; Rifkin D.
Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and
collagenase production by capillary endothelial cells.
J. Cell. Biol. 91: 201, 1981.
- 190- Mooney N.A.; Townsend P.A.; Wiltshaw E.; Glyn-Evans
Shanti-Raju K.; Poulton T.A.
An assessment of sequential measurements of immune complex
levels in ovarian cancer patients with respect to clinical
progress.
Gyneol. Oncol. 15: 207 , 1983.
- 191- Moore W.L.; Perkerson M.; Forrest J.W.
Demonstration of cryoprecipitable immune complexes in
pneumococcal pneumonia.
South Med. J., 70: 1103, 1977.
- 192- Mosher D.F.
Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-
stabilizing factor.
J. Biol. Chem. 250: 6614, 1975.

- 193- Mosher D.F.;
En: Spaet, Progress of hemostasis and thrombosis, vol. 5:
III. (Grune & Straton, New York 1980)a).
- 194- Mosher D.F.; Proctor R.A.
Binding and factor XIIIa - mediated cross - linking of a
27-kilodalton fragment of fibronectin to staphylococcus
aureus.
Science 209: 927, 1980b).
- 195- Mullis D.E.; Rohrilich S.T.
The role of proteinases in cellular invasiveness.
Biochim. Biophys. Acta 695, 177, 1983.
- 196- Nelson M.; Nelson D.S.
Inhibition of delayed-type hypersensitivity reactions by
tumor cells and by soluble products affecting macrophages.
Immunology, 34(N°2): 277, 1978.
- 197- Neri A.; Rouslahti E.; Nicolson G.L.
Relationship of fibronectin to the metastatic behaviour
of rat mammary adenocarcinoma cell lines and clones.
J. Supramol. Struct. 3: 444, 1979.
- 198- Neri A.; Rouslahti E.; Nicolson G.L.
Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat
mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at
primary and metastatic sites.
Cancer Res. 41: 5082, 1981.

- 199- Ness S.; Gerbes A.; Gerlach E.
Isolation, identification and continuous culture of
coronary endothelial cells from ginea pig hearts.
Eur. J. Cell. Biol. 24: 287, 1981.
- 200- Nicolson G.L.; Irimura T.; Gonzalez R.; Rouslahti E.
The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma
cells to endothelial cells and their basal lamina.
Expl. Cell. Res. 135: 461, 1981.
- 201- Nicosia R.; Tchoo R.; Leighton J.
Angiogenesis dependent tumor spread in reinforced
fibrin clot culture.
Cancer Res. 43: 2159, 1983.
- 202- Nossal G.J.V.
Cellular mechanism of immunologic tolerance.
Annu. Rev. Immunol. 1: 33, 1983.
- 203- Nydegger U.E.; Lambert P.H.; Gerber H.; Miescher P.A.
Circulating immune complexes in the serum in systemic
lupus erythematosus and in carriers of antigen:
quantitation by binding to radiolabeled Clq.
J. Clin. Invest. 54: 297, 1974.
- 204- Nydegger U.E.; Zubler R.H.; Gabay R.
Circulating complement breakdown products in patients
with reumatoid arthritis: correlation between plasma C3d;
circulating immune complexes, and clinical activity.
J. Clin. Invest. 59: 862, 1977.

- 205- Oberbarnscheidt J.; Kolsch E.
Direct blockade of Antigen-reactive B Lymphocytes by immune complexes. An "off" signal for precursors of IgM-producing cells provided by the linkage of antigen and Fc-receptors.
Immunology, 35: 151, 1978.
- 206- Oettgen H.F.; Hellström K.E.
Tumor immunology.
En: Cancer Medicine. Holland y Frei III ed. Second Edicion. Lea & Febiger. Philadelphia 1029, 1982.
- 207- Ohara J.; Lahet S.; Inman J.; Paul W.E.
Partial purification of murine cell stimulatory factor (BSF)-1.
J. Immunol. 135(Nº4): 2518, 1985.
- 208- Oisgold-Dagá S.; Jasnís M.A.
Efecto de factores esplénicos sobre el crecimiento tumoral.
Medicina. 41(6): 673, 1981.
- 209- Oka Y.; Gishan F.; Greene H.; Orth D.
Effect of mouse epidermal growth factor/urogastrone on the functional maturation of rat intestine.
Endocrinology 112: 940, 1983.

- 210- Olander J.; Marasa J.; Kimes R.; Jhonston G.; Feder J.
An assay measuring the stimulation of several types of bovine endothelial cells by growth factor(s) derived from cultured human tumor cells.
In vitro 18: 99, 1982.
- 211- Olden K.; Pratt R.M.; Yamada K.M.
Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: effects of tunicamycin of the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts.
Cell. 13: 461, 1978.
- 212- Ouchterlony O.
Diffusion-in-gel methods Prog.
Allergy for immunological analysis. 5: 1, 1958.
- 213- Owens T.; Crispe N.
Suppressor T cells, distinct from "veto cells" are induced by alloantigen priming and mediate transferable suppression of cytotoxic T lymphocyte responses in vivo.
J. Immunol. 135(N° 5): 2984, 1985.
- 214- Ozanne B.; Wheeler T.; Kaplan P.
Cells transformed by RNA and DNA tumor viruses produce transforming factors.
Federation Proc. 41: 3004, 1982.

- 215- Padarathsingh M.; Dean J.H.; Jerrells T.; Mc Coy J.L.;
Lewis D.D.; Norting J.W.
Evidence for and characterization of suppressor cells in
BALB/c mice bearing ADJ-PC5 plasmocytomas.
J. Natl. Cancer Inst. 62: 1235, 1979.
- 216- Patel M.; Havas H.
The role of T, B and adherent cells in the "in vitro"
immune response of TEPC-183- bearing mice.
Immunology, 46: 97, 1982.
- 217- Pauli B.V.; Schwartz D.E.; Thomar E.J.M.; Kuettner K.E.
Tumor invasion and host extracellular matrix.
Cancer Met. Rev. 2: 129, 1983.
- 218- Pereyra Alfonso S.; Haedo A.; Bal de Kier Joffé E.
Differences in plasminogen activator content and
secretion of two murine mammary adenocarcinomas with
different metastasizing ability.
Comun. Biol. 5: 61, 1986.
- 219- Pierschbacher M.D.; Rouslahti E.; Sundelin J.; Lind R.;
Peterson P.A.
The cell attachment domain of fibronectin determination
of the primary structure.
J. Biol. chem. 257: 9593, 1982.

- 220- Pliskin M.; Ginsberg S.; Carp N.
Induction of neovascularization by mitogen activated spleen cells and their supernatants.
Transplantation 29: 255, 1980.
- 221- Polverini P.J.; Cotran R.S.; Gimbrone M.A.; Unanue E.
Activated macrophages induce vascular proliferation.
Nature, 269: 804, 1977.
- 222- Polverini P.J.; Leibovich S.J.
Induction of neovascularization in vivo by tumor associated macrophages.
Lab. Invest. 51: 635, 1984.
- 223- Poulton T.A.; Mooney N.A.; Nineham L.J.; Hay F.C.
Sequential studies of circulating immune complexes in gynecological malignancies.
Am. J. Repr. Immunol. 2: 265, 1982.
- 224- Prehn R.T.; Main J.
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 18: 769, 1957.
- 225- Prehn R.T.
Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene induced mouse sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 45: 1039, 1970.

226- Prehn R.T.

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

227- Presta M.; Moscatelli D.; Joseph-Silverstein J.; Rifkin D.

Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration.
Mol. Cell. 6: 4060, 1986.

228- Ptak W.; Rosenstein R.W.; Gershon R.K.

Interaction between molecules (subfactors) released by different T cell sets that yield a complete factor with biological (suppressive) activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 2375, Immunology, 1982.

229- Ptak W.; Bereta M.; Ptak M.; Nerson M.; Green D.

Suppression and contrasuppression in the induction of contact sensitivity by the administration of cell-bound antigen-antibody complexes.

J. of Immunol. 135(4): 2312, 1985.

230- Puricelli L.; Gomez D.E.; Bal de Kier Joffé E.

Análisis del proceso metastásico.

Medicina 47: 313, 1987.

- 231- Pussell B.A.; Lockwood C.M.; Scott D.M.; Pincing A.J.;
Peters D.K.
Value of immune-complex assays in diagnosis and
management.
Lancet 2: 359, 1978.
- 232- Putnam J.B. Jr; Roth J.A.
Identification and characterization of a tumor derived
immunosuppressive glycoprotein from murine melanoma
K-1735.
Cancer Imm. Immth., 19: 90, 1985.
- 233- Quay S.C.; Murphy S.F.; Mihn J.
Biochemical studies of immune complexes II. Purification
of immune complexes from sera of patients with malignant
melanoma.
Clin. Immunol. Immunopathol, 26: 318, 1983.
- 234- Rall L.; Scott J.; Bell G.
Mouse pre-proepidermal growth factor synthesis by the
kidney and other tissues.
Nature 313: 228, 1985.
- 235- Rao V.S.; Bennett J.A.; Shen F.W.; Gershon R.K.; Mitchell
M.S.
Antigen-antibody complexes generate Lyt 1 inducers of
suppressor cells.
J. of Immunology 125(N°1): 63, 1980.

- 236- Rayner A.A.; Steele G.; Rodrick M.L.
Application of PEG to detection of circulating Immune complexes in cancer patients.
The American Journal of Surgery, 141: 460, 1981.
- 237- Roberts A.B.; Anzano M.A.; Lamb L.C.; Smith J.M.; Sporn M.B.
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from nonneoplastic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(N°9): 5339, 1981.
- 238- Rodrick M.; Steele G.
An evaluation of two antigen non specific assays for circulating immune complexes using a model system.
J. Clin. Lab. Immunol. 7: 193, 1982.
- 239- Rodrick M.L.; Steele G.; Ross D.S.; Lahey S.J.; Deasy J.M.; Rayner A.A.; Harte P.J.; Wilson R.E.; Munroe A.E.; King U.P.
Serial circulating Immune complex levels and mitogen responses during progressive tumor growth in WF rat.
JNCI. 70(N°6): 1113, 1983.
- 240- Rohen N.; Sidky Y.; Auerbach R.
Lyt phenotype analysis of the effector cells responsible for evoking lymphocytes-induced angiogenesis (LIA).
Cell. Immunol. 63: 272, 1981.

- 241- Rossen R.; Barnes B.
Measuring serum immune complexes in cancer.
Ann. Int. Med; 88(4):570, 1978.
- 242- Rouslahti E.; Engvall E.
Immunochemical and collagen-binding properties of
fibronectin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 312: 178, 1978.
- 243- Rouslahti E.; Engvall E.
Complexing of fibronectin with glycosaminoglycans and
collagen.
Biochim. biophys. Acta 631:350, 1980.
- 244- Rouslahti E.; Engvall E.; Hayman E.G.
Fibronectin: current concepts of its structure and
function.
Coll. Rel. Res. 1: 95, 1981 a).
- 245- Rouslahti E.; Hayman E.G.; Engvall E.; Cothran W.C.;
Butler W.T.
Alignment of biologically active domains in the
fibronectin molecule.
J. Biol. Chem. 256: 7277, 1981 b).
- 246- Ruiz-Arguelles A.; Jett J.R.; Ritts S.E.
Stage-Associated Incidence of serum circulating immune
complexes in patients with untreated biobrogenic carcinoma.
Cancer Immunol. Immunother 12: 197, 1982.

- 247- Salinas F.A.; Wee K.H.; Silver H.K.B.
Modulation of lymphocytes activation by plasma-pheresis
in advanced malignant melanoma.
En: Mechanims of lymphocyte activation (K.Resch, ed)
pp 4790-4791, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1981.
- 248- Salinas F.A.; Wee K.H.; Silver H.K.B.
Immune complexes and human neoplasia. Review II.
Biomed. Pharmacother. 37: 211, 1983.
- 249- Salinas F.A.; Wee K.H.; Silver H.K.B.
Clinical Relevance of Immune complexes Associated
Antigen, and Antibody in Cancer.
En: Immune Complexes and Human Cancer. Editado por F.A.
Salinas y M.G. Hanna, Jr. (Plenum Publishing Corporation,
1985) Cap. 2, 55, 1985.
- 250- Sanders A.; Shubik P.
A transparent window for use in the syrian hamster.
Israel J. Exp. Med. 11: 118, 1964.
- 251- Sandison J.
A new method for microscopic study of living growing
tissues by the introduction of transparent chamber in the
rabbits's ear.
Anat. Rec. 28: 281, 1924.

- 252- Santos L.; Yamada F.; Schinberg M.
Monocyte and lymphocyte interaction in patients with
advanced cancer.
Cancer 56: 1553, 1985.
- 253- Sariola H.; Ekblom P.; Lehtonen E.; Saxen L.
Differentiation and vascularization of the metanephric
kidney grafted on the chorioallantoic membrane.
Dev. Biol. 96: 427, 1983.
- 254- Sato N.; Goto T.; Haranka K.; Satommi N.; Nariuchi H.;
Mano-Hirano Y.; Sawasaki Y.
Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular
endothelial cells: Morphologic modulation, growth
inhibition, and cytotoxicity.
J. Natl. Cancer Inst. 76: 1113, 1986.
- 255- Scheirber A.; Kennay I.; Kowalsky W.; Friessel R.;
Mehlman T.; Maciag T.
Interaction of endothelial cell growth factor with heparin:
characterization by receptor antibody recognition.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 6138, 1985.
- 256- Schmidt D.H.; Kaufman B.M.; Butler V.P.
Persistence of hapten-antibody complexes in the
circulation of immunized animals after a single
intravenous injection of hapten.
J. Exp. Med. 139: 278, 1974.

- 257- Segal- Eiras A.; Berrera L.; Mazzoli A.
Correlación de CIC con actividad citotóxica sérica inducida por Ac citofilicos espermáticos.
Revista Argentina de Microbiología 16(3): 145, 1984.
- 258- Sekiguchi K.; Hakomori S.I.
Funtional domain structure of fibronectin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2661, 1980.
- 259- Sekiguchi K.; Fukuda M.; Hakomori S.I.
Domain structure of hamster plasma fibronectin.
J. Biol. Chem. 256: 6452, 1981.
- 260- Seppa H.; Grotendorst G.; Seppa S.; Schiffmann E.;
Martin G.
The platelet-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblast.
J. Cell. Biol. 92: 584, 1982.
- 261- Shoul L.; Schwartz S.; Good R.; Peng R.; Cheng C.
Human soluble suppressor factor affecting lymphocyte response in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6096, 1980.
- 262- Sjögren H.; Helmström I.; Bansal S.; Hellmström K.
Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor bearing individuals may be antigen-antibodies complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68: 1372, 1971.

- 263- Sjögren H.O.; Hellström I.; Bansal S.C.; Warner G.A.;
Hellstrom K.E.
Elution of "blocking factors" from human tumors capable
of abrogating tumor cell destruction by specifically
immune lymphocytes.
Int. J. Cancer, 9: 274, 1972.
- 264- Sloane B.F.; Honn K.V.
Cysteine proteinases and metastasis.
Cancer Metastasis Rev. 3: 249, 1984.
- 265- Smith D.E.; Mosher D.E.; Johnson R.B.; Furcht L.T.
Immunological identification of two sulphhydryl-containing
fragments of human plasma fibronectin.
J. Biol. Chem. 257: 5831, 1981.
- 266- Snyderman R.; Pike M. C.
Macrophage migratory dysfunction in cancer.
Amer. J. Pathol. 88: 727, 1977.
- 267- Steele G.; Sonis S.; Stelos P.; Rittgers R.; Zamcheck N.;
Finn D.; Maltz J.; Mayer R.; Lokich J.; Wilson R.E.
Circulating immune complexes in patients following
clinically curative resection of colorectal cancer.
Surgery 83: 648, 1978a).

- 268- Steel G.; Sonis S.; Stelos P.; Rittgers R.
Circulating immunocomplexes in patients following
clinically curative resection of colorectal cancer.
Surgery, 83: 838, 1978b).
- 269- Stenman S.; Vaheri A.
Fibronectin in human solid tumors.
Int. J. Cancer 27: 427, 1981.
- 270- Stolpen A.; Guinan E.; Fiers W.; Pober I.
Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon
act singly and in combination to recognize human vascular
endothelial cell monolayers.
Am. J. Pathol. 123: 16, 1986.
- 271- Subramanian Ch.; Yu S.; Mc Khann C.F.
Soluble suppressor factor from the spleens from tumor-
bearing mice.
Cancer Res. 38: 1996, 1978.
- 272- Tada T.; Hayakawa K.
Antigen-specific helper and suppressor factors.
Prog. Immunol. 4: 389, 1980.
- 273- Takei F.; Levy D.; Kilburn G.
Characterization of a soluble factor that specifically
suppressed the in vitro generation of cells in mice.
J. Immunology 120 1218, 1982.

- 274- Tanaka F.; Yonemoto R.H.; Waldman S.R.
Blocking factors in sera of breast cancer patients.
Cancer 43: 838, 1979.
- 275- Tannenbaum S.; Finko R.; Cines D.
Antibody and immune complexes induce tissue factor
production by human endothelial cells.
J. of Immunol; 137 (5): 1532, 1986.
- 276- Thakral K.; Goodson W.; Hunt T.
Stimulation of normal blood vessel growth by wound
macrophages.
J. Surg. Res. 26: 430, 1979.
- 277- Theofilopoulos A.N.; Wilson C.B.; Dixon F.J.
The Raji Cell radioimmune assay for detecting immune complexes
in human sera.
J. Clin. Invest. 57: 169, 1976.
- 278- Theofilopoulos A.N.
Immune complexes in humoral immune responses: suppressive
and enhancing effects.
Immunology Today; 1 (N° 1): 1, 1980.
- 279- Theofilopoulos A.N.
Immune complexes in cancer.
N. Engl. J. Med. 307: 1208, 1982.

- 280- Thomas K.; Rios Candelore M.; Fitzpatrick S.
Purification and characterization of acidic fibroblast
growth factors from bovine brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 357, 1984.
- 281- Thomas K.; Gimenez Gallego G.
Fibroblast growth factor; broad spectrum mitogens with
potent angiogenic activity.
Trends Biochem. Sci. 11: 81, 1986.
- 282- Ting C.; Rodriguez D.; Ting R.; Wivel N.; Collins M.
Suppression of T cell mediated immunity tumor cells:
Immunogenicity versus immunosuppression and preliminary
characterization of the suppressive factors.
Int. J. Cancer 24: 644, 1979.
- 283- Ting C.; Rodriguez D.
Tumor cells-triggered macrophages mediated suppression
of the T-cell cytotoxic response to associated antigens.
I. Characterization of the cell components for induction
of suppression.
J. Natl. Cancer Inst. 69(N°4): 867, 1982.a)
- 284- Ting C.; Rodriguez D.
Mechanism for induction of suppression.
J. Natl. Cancer Inst 69: 873, 1982.b)

285- Ting Ch.; Rodriguez O.

Tumor cell-triggered macrophage-mediated suppression of the T-cell cytotoxic response to tumor associated antigens.

II) Characterization of the cell components for induction of suppression.

J. Natl. Cancer Inst. 69: 867, 1982.

286- Todaro G.J.; Fryling Ch.; De Larco J.E.

Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(N° 9): 5258, 1980.

287- Todaro G.; De Larco I.; Fryling C.

Sarcoma growth factor and other transforming peptides produced by human cells: Interactions with membrane receptor.

Federation Proc. 41: 2969, 1982.

288- Todd H.C.; Coffey M.S.; Waalkes P.T.; Abeloff F.M.; Parsons R.G.

Serum levels of fibronectin and a fibronectin like DNA-binding protein in patients with various diseases.

J. Natl. Cancer Inst. 65: 901, 1980.

- 289- Treves A.J.; Cohen I.R.; Feldman N.
A syngeneic metastatic tumor model in mice: the natural immune response of host and its manipulation.
Isr. J. Med. Sci. 12: 369, 1976.
- 290- Vaheri A.; Alitalo K.; Hedman K.; Keski-Oja J.; Kurkinen M.; Wartiovaara J.
Fibronectin and the pericellular matrix in normal and transformed adherent cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 312: 343, 1978.
- 291- Vaheri A.; Keski-Oja J.; Alitalo K.; Edman K.; Kurkinen M.
Structure and functions of fibronectin.
Devl. Biochem. 16: 161, 1980.
- 292- Vasalli P.; Simon G.; Rouiller C.
Electron microscopic study of glomerular lesions resulting from intravascular fibrin formation.
Am. J. Pathol. 43: 579, 1963.
- 293- Vartio T.; Seppä H.; Vaheri A.
Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G.
J. Biol. Chem. 256: 471, 1981.

- 294- Vartio T.
Characterization of the binding domains in the fragments
cleaved by cathepsin G from human plasma fibronectin.
Eur. J. Biochem. 123: 223, 1982.
- 295- Venkataraman M.; Raod D.; Levin R.; Westerman M.
Suppression of B-lymphocyte function by T-lymphocytes
in patients with advanced lung cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 74: 37, 1980.
- 296- Vu M.; Burger P.; Klinworth G.
Angiogenic activity in injured rat corneas as assayed in
the chick chorioallantoic membrane.
Lab. Invest. 53: 311, 1985.
- 297- Wang K.C.; Berczi M.; Hoffman E.G.; Sehon A.H.
Effector and enhancing lymphoid cells in plasmacytoma-
bearing mice II) Dynamic changes during tumor progression.
Int. J. Cancer 25: 493, 1980.
- 298- Wang D.; Heacock E.; Onikul S.; Chang-Xue A.; Young T.;
Mannick J.
Association of impaired immune responsiveness of
lymphocytes from animals bearing large tumors with a
membrane-bound suppressive.
Cancer Res. 42: 416, 1982.

- 299- Watanabe M.; Phan Sh.; Friedman H.
Serologic and immunochemical characterization of an immunosuppressive soluble factor from mastocytoma-bearing mice.
J. Natl. Cancer Inst., 61(N° 1): 249, 1978.
- 300- Weiss J.; Brown R.; Kumar S.; Philips P.
An angiogenic factor isolated from tumors: a patent low molecular weight compound.
Br. J. Cancer 40: 493, 1979.
- 301- Weiss I.; Hill C.; Davis R.; Mc. Laughlin B.; Sedowofia K.; Brown R.
Activation of a procollagenase by low-molecular weight angiogenesis factor.
Biosci. Rep. 3: 171, 1983.
- 302- Weissman B.; Aaronson S.
BALB and Kirsten Murine sarcoma viruses alter growth and differentiation of EGF-dependent BALB/c mouse epidermal keratinocyte lines.
Cell 32: 599, 1983.
- 303- Werkmeister J.; Zaunders J.; Mc Carthy W.; Hersey P.
Characterization of an inhibitor of cell division released in tumor cell cultures.
Clin. Exp. Immunol. 41: 487, 1980.

- 304- Yamada K.M.; Yamada S.S.; Pastan I.
Cell surface protein partially restores morphology,
adhesiveness and contact inhibition of movement to
transformed fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1217, 1976.
- 305- Yamada K.M.; Olden K.
Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and
blood.
Nature, Lond. 275: 179, 1978.
- 306- Yamada K.M.; Kennedy D.W.; Kimata K.; Pratt R.M.
Characterization of fibronectin interactions with
glycosaminoglycans and identification of active
proteolytic fragments.
J. Biol. Chem. 255: 6055, 1980.
- 307- Yamada K.M.; Akiyama S.K.; Hasegawa T.; Hasegawa E.;
Humphries M.; Kennedy D.W.; Nagata K.; Urushihara H.;
Olden K.; Chen W.T.
Recent advances in research on fibronectin and other
cell attachment proteins.
J. Cell. Biochemistry 28: 79, 1985 a).
- 308- Yamada K.M.; Kennedy D.W.
Amino acid sequence specificities of an adhesive
recognition signal.
J. of Cell. Biochemistry 28: 99, 1985, b)

- 309- Yamagishi H.; Pellis N.; Nokyr M.; Kahan B.
Specific and non specific immunologic mechanisms of
tumor growth facilitation.
Cancer 45: 2929, 1980.
- 310- Yamahoka K.; Hirai R.; Tsugita A.; Mitsui H.
The purification of an acid heat-labile transforming
growth factor from an avian sarcoma virus-transformed
rat cell line.
J. Cell. Physiol. 119: 307, 1984.
- 311- Yoshida R.; Zawadzki Z.
Circulating immune complexes in patients with neoplastic
disorders.
Oncology, 37: 152, 1980
- 312- Young M.R.; Sundharadas G.; Cantarow W.D.; Kumar P.R.
Purification and functional characterization of a low
molecular weight immune modulating factor produced by
Lewis lung carcinoma.
Int. J. Cancer 30: 517, 1982.
- 313- Zawicki D.; Jain R.; Schmidt-Schoenbeing G.; Chien S.
Dynamics of neovascularization in normal tissue.
Microvasc. Res. 21:27, 1981.
- 314- Zetter B.
Migration of capillary endothelial cells is stimulated by
tumor-derived factors.
Nature 285: 41, 1980.

315- Zetter B.; Azizkhan R.

Normal and tumor-derived factors that modulate endothelial cell migration and proliferation.

En: Plasma and cellular Modulatory Proteins, pag. 59 (1981)

Editado por D. Bing. Boston.

316- Zubler R.H.; Lambert P.H.

Detection of immune complexes in human diseases.

Prog. Allergy. 24: 1, 1987.