

Tesis de Posgrado

Niveles de DNA ploidia de adenocarcinoma mamario murino y de sus variantes metastásicas en diferentes órganos

Vidal, María del Carmen Clotilde

1990

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

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

Vidal, María del Carmen Clotilde. (1990). Niveles de DNA ploidia de adenocarcinoma mamario murino y de sus variantes metastásicas en diferentes órganos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2341_Vidal.pdf

Cita tipo Chicago:

Vidal, María del Carmen Clotilde. "Niveles de DNA ploidia de adenocarcinoma mamario murino y de sus variantes metastásicas en diferentes órganos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2341_Vidal.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Handwritten notes:
No. 10.1.241

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

"NIVELES DE DNA PLOIDIA DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO
Y DE SUS VARIANTES, METASTASICAS EN DIFERENTES ORGANOS".

Autora

MARIA DEL CARMEN CLOTILDE VIDAL

Directora de Tesis

EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

Lugar de Trabajo

INSTITUTO DE ONCOLOGIA "ANGEL H. ROFFO"

Tesis presentada para optar al Título de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1990

Handwritten:
2341
y. 2

Dedico esta Tesis:

Con todo mi amor, a mi esposo y a mi hijo. Principalmente por ellos, el constante entusiasmo en mi labor.

A la memoria de mis padres, de quienes me siento orgullosa.

A mi tan querido amigo, el Dr. Joe Hin Tjio; al científico eminente y al increíble ser humano que se conjugan en él.

A todos aquellos que, con su honesta y callada labor cotidiana, reivindican a la humanidad.

Agradezco:

A la Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, mi directora de Tesis, por su ayuda y por ser un ejemplo constante de entusiasta dedicación a la Ciencia.

Al Dr. Julio Fernández Mendy, del Instituto de la Visión, cuya exitosa intervención hizo posible la prosecución del presente trabajo.

Al Dr. Lucas Luis Colombo, por permitirme compartir su modelo, y por su ayuda en el manejo experimental.

Con todo cariño, a la Sra. Catalina Sasko, de quien aprendí el cultivo de tumores, pero muy especialmente por su extraordinaria calidad humana.

A la Dra. María Susana Merani, por su valioso asesoramiento sobre cromosomas bandeados de ratón.

A nuestra muy querida voluntaria, Sra. Queca Noya de Angeleri, por su constante entusiasmo en mi labor y por su aliento.

A Inés y María Cecilia, de Biblioteca, mi sincero y afectuoso reconocimiento.

A todos mis compañeros, profesionales y personal del Departamento de Investigaciones del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", por su cariño y apoyo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Si has de cerrar la ventana
adonde asoman tus ojos
cierra antes tus ojos.

Antonio Porchia.

INDICE

	Pág
Introducción.....	5
Descripción del modelo experimental.....	18
Características fenotípicas de las distintas líneas.	20
Comparación entre dos líneas con muy diferente capacidad metastásica en pulmón.....	22
Ventajas del modelo experimental.....	24
Parte experimental.....	26
Discusión y conclusiones.....	56
Bibliografía.....	62

INTRODUCCION

La propuesta de que el cáncer tiene una base genética está sustentada por una amplia variedad de observaciones. En efecto, se ha encontrado que la mayoría de los carcinógenos son también mutágenos, que pacientes con síndromes de inestabilidad cromosómica o con desbalances génicos o cromosómicos tienen un riesgo aumentado de contraer cáncer, que la mayoría de los tumores son manifiestamente clonales en origen, que anomalías cromosómicas específicas están asociadas con cánceres específicos, que determinados cromosomas están involucrados en tumorigenicidad y que ciertos tipos raros de cáncer se heredan con modalidad mendeliana. Además, el descubrimiento de los oncogenes y de los antioncogenes o genes supresores de malignidad refuerza dicha propuesta (Heim, S., Mitelman, F., 1987).

Mediante el uso de métodos perfeccionados para cultivo de células tumorales y técnicas de bandeado de alta resolución se han podido demostrar defectos cromosómicos en la gran mayoría de las neoplasias; en muchas, esos defectos son consistentes y, a menudo, son compartidos por diferentes tipos de malignidades. Además de los defectos propios de la iniciación en el desarrollo de un tumor, puede haber, en la etapa de promoción, otros defectos cromosómicos que potencian el proceso maligno llevando a la expansión tumoral. (Yunis, J.J., 1983).

La Citogenética pone en evidencia la correlación entre inestabilidad génica y potencial maligno. Apoyan este criterio estudios que relacionan cambios cariotípicos con progresión maligna. (Nicolson, G.L., 1984, a).

La progresión tumoral depende de las variantes que se producen a causa de anomalías genéticas y de la selección por parte del huésped de aquellas más aptas. (Nowell P.C., 1986).

La información derivada de estudios citogenéticos demostró ser de gran utilidad en áreas clínicas y de investigación. Las contribuciones clínicas son:

- (a) la demostración de un cariotipo cromosómico anormal en células de biopsia de tumor sólido puede confirmar o establecer un diagnóstico de malignidad más temprano que lo que es posible sin tales estudios.
- (b) ciertos patrones cromosómicos específicos pueden ser indicadores confiables del curso clínico incluyendo la sensibilidad a terapia.

Otro punto de gran importancia en el estudio de la evolución clínica de los tumores es la presencia en los mismos de poblaciones celulares heterogéneas (Jackson, L.G., 1978).

Durante la formación inicial de un tumor primario, ya sea de origen mono o policlonal, el nivel de diversidad subpoblacional será bajo. Esta carencia de diversidad puede, entonces, actuar como un estímulo para la formación rápida de variantes, y de allí aumenta la diversidad celular que no será indefinida sino que alcanzará una fase "plateau" en la cual la tasa de formación de variantes será más lenta. De aquí, que los tumores deben considerarse como entidades complejas en las que el número de subpoblaciones celulares y sus propiedades están cambiando constantemente, no sólo en relación a presiones de selección sino también como una consecuencia de interacciones entre las mismas subpoblaciones (Fidler, I.J., et al., 1985).

Los neoplasmas malignos son heterogéneos para una variedad de propiedades, incluyendo histología y morfología celulares, antígenos, glicolípidos y glicoproteínas de la superficie celular, componentes de adhesión y reconocimiento celulares, enzimas hidrolíticas y de síntesis, locomoción celular, despegue, invasividad, y capacidad metastatizante. También hay variabilidad célula a célula en cuanto a sensibilidad para agentes terapéuticos, tales

como drogas, radiación e hipertermia, y mecanismos de respuesta hacia el huésped. Tal diversidad de propiedades en la población celular también ocurre, pero no a tal alto grado, en células y tejidos normales que, a pesar de mantener fenotipos celulares relativamente estables, también son heterogéneos para la expresión de componentes particulares. (Nicolson G.L., 1984, a).

La inestabilidad genotípica por sí sola no puede, ciertamente, explicar las tasas extremadamente altas de variación fenotípica de la célula tumoral porque las tasas más altas de mutación génica espontánea que se conocen (tal como $5-7 \times 10^{-5}$ /cél/generación, encontradas por Cifone y Fidler (1981)) son órdenes de magnitud menores que las tasas de variación fenotípica. Una explicación podría ser que la mutación génica ocurra en sitios génicos regulatorios, generando así rápida heterogeneidad fenotípica celular. Esto se evidencia por el hecho de que la mayoría de los cambios en los productos génicos asociados con el fenotipo maligno son más cuantitativos que cualitativos (Nicolson, G.L., 1985).

Además de las ya descritas hay que considerar también de gran importancia las modificaciones epigenéticas que, se piensa, alteran la expresión génica sin alterar las secuencias génicas del ADN (=DNA: deoxyribonucleic acid). Una de tales modificaciones es el grado de metilación del ADN en residuos citosina que, se sabe, puede alterar la transcripción mientras que la hipometilación puede dar por resultado la activación de genes específicos (Nicolson, G.L., 1984, b). También el microambiente del huésped puede ejercer profundas influencias en la estabilidad de las células tumorales. La variabilidad de las concentraciones de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, hormonas, enzimas, iones, inductores y otros reguladores pueden jugar roles complejos, interactuantes, para determinar la susceptibilidad a modi-

ficaciones genéticas y epigenéticas. Las interacciones con la matriz extracelular normal son importantes en mantener estados de activación y diferenciación de las células y tejidos normales. Las células tumorales pueden también responder a sus microambientes del estroma pero no siguiendo los mecanismos normales. Además, los tumores muestran, a menudo, infiltración por células normales del huésped tales como linfocitos, granulocitos y macrófagos, que pueden tener profundos efectos sobre el crecimiento tumoral, invasión y diseminación. (Nicolson, G.L., 1985).

A pesar de que la discusión acerca de los cromosomas en cáncer concierne principalmente a los posibles efectos de los desórdenes estructurales, las anomalías numéricas son también hallazgos muy frecuentes en la mayoría de las enfermedades tumorales. (Heim, S., et al., 1986). En efecto, la aneuploidía es un cambio importante en la carcinogénesis.

Se entiende por aneuploidía toda desviación del número cromosómico de aquel característico de la especie. Números cromosómicos altos pueden obtenerse por un doblaje del complemento completo a través de varios mecanismos. Tumores con números modales en la región triploide o tetraploide tienen, a menudo, marcadores que no están presentes en duplicado; esto puede incluir la presencia de un número impar de cromosomas en uno o más de los grupos normales, indicando que deben haber ocurrido cambios subsecuentes al doblaje. (Sandberg, A.A., 1980).

La aneuploidía puede estar asociada con un evento primario en algunos cánceres y con un cambio tardío en otros tumores. (Conti, C.J., et al., 1986; Tsutsui, T., et al., 1983; Bigner, S.H., et al., 1986).

Hay un número de posibles mecanismos que pueden llevar a aneuploidía incluyendo: efectos sobre los microtúbulos; daño a elementos esenciales para la función cro

mosómica como son los centrómeros, los orígenes de repli
cación y los telómeros; reducción en la condensación o
el apareamiento de los cromosomas; inducción de intercam
bios cromosómicos; persistencia del nucleolo durante la
división celular; daño a los centriolos o a los quineto
coros; deterioro del alineamiento de los cromosomas; al
teraciones en las concentraciones de iones durante la mi
tosis; daño a la membrana nuclear; y una desorganización
física de la segregación cromosómica (Oshimura, M., et
al., 1986).

La inducción de un estado aneuploide en una cé
lula preneoplásica o neoplásica podrá tener cualquiera
de los siguientes efectos biológicos: un cambio en el do
saje génico, un cambio en el balance génico, la expresión
de una mutación recesiva o un cambio en la estabilidad
genética que podría, secundariamente, llevar a neoplasia.

En lo que concierne a cambios en el dosaje y ba
lance génicos hay dos razones por las cuales estos pue
den ser importantes en la regulación del crecimiento ce
lular:

- las concentraciones de productos génicos críti
cos parecen ser muy importantes en el control del ciclo
normal, y la distribución del material genético en la mi
tosis es uno de los componentes de ese control.

- la super-expresión de proto-oncogenes puede ser
un paso importante en la transformación celular y esto
puede también estar relacionado a cambios en el cariotipo
(Holliday, R., 1989).

En cuanto a la expresión fenotípica de una muta
ción recesiva, estudios moleculares sobre retinoblastoma
indican que éste es el mecanismo responsable en el desa
rrollo de este tumor (Cavenee, W.K., et al., 1983).

Hay varios métodos para la determinación de ADN
ploidía:

- (a) Análisis citogenético.
- (b) Citofotometría de absorción.
- (c) Citometría de flujo, sobre material fresco (Melamed, M.R., et al., 1977).
- (d) Citometría de flujo, sobre tejido incluido en parafina (Hedley, D.W., et al., 1985).

Un rasgo general de las células tumorales es la pérdida de la precisión en la disyunción cromosómica, llevando a aneuploidía.

El centrómero se separa según una secuencia específica de especie, no al azar, genéticamente controlada, que no depende del tamaño del cromosoma ni de la posición del centrómero. Tal secuencia sería también independiente del tejido o de las condiciones fisiológicas bajo las cuales crecen las células (Vig, B.K., 1983).

La rara no disyunción o rearrreglo de, por lo menos, un cromosoma específico puede, por sí mismo, ser el evento desestabilizador inicial. La replicación de uno o más genes críticos aumentaría el nivel de producto génico de aquél que es óptimo para la precisa separación del centrómero y la función normal del huso mitótico. Así, en el ciclo celular siguiente habrá super- ó sub-expresión del importante producto génico y de esta manera aumentaría la probabilidad de error en la disyunción cromosómica en la siguiente y subsecuentes mitosis (Holliday, R., 1989).

En células de tejido maligno se observa frecuentemente el fenómeno de endomitosis que incluye duplicaciones c-mitóticas y endomitóticas. En las primeras los cromosomas duplicados no se distribuyen a las células hijas sino que se incluyen en el mismo núcleo debido a falla del aparato cinético. Se forma, a menudo, un huso multipolar, llevando a distribución irregular de cromosomas dentro de varios núcleos, y a la formación de células

micronucleadas. Por contraste, las duplicaciones endomitóticas ocurren durante la interfase dentro de la membrana nuclear y no involucran al huso. Estas anomalías, que llevan a doblaje cariotípico exacto, ocurren regularmente en muchos organismos dando cuenta de la presencia de células tetraploides en tejidos normales. Una forma bien conocida de endomitosis es la endoreduplicación, en la cual ocurre la duplicación adicional de los cromosomas antes de la condensación cromosómica. Puede reconocerse solamente si es seguida por una mitosis. Un rasgo de endoreduplicación es la presencia durante la metafase, de diplocromosomas, siendo éstos cromosomas con cuatro cromátides. Después de la separación de los diplocromosomas, la mitosis sigue un curso normal y se forman dos núcleos hijos con complementos dobles de cromosomas. Parecería que un bloqueo en la fosforilación de componentes celulares tales como histonas, necesarios para la condensación cromosómica y mitosis venidera, puede ser influyente en la endoreduplicación. (Larizza, L., et al., 1984).

La fusión de células tumorales que puede ser con células del huésped (fusión heterocariótica) o entre ellas (fusión homocariótica), con un aumento consecuente en el número cromosómico es una manera por la cual puede aumentar el grado de malignidad. La fusión celular se visualiza, citogenéticamente, por lo que se llama "prophasing", fenómeno que ocurre cuando una célula en metafase se fusiona con otra, que puede estar en cualquier fase del ciclo celular (G1, S, G2, y M) y causa la disolución de la membrana nuclear de esta última célula, a través, aparentemente, de una sustancia (o sustancias) que sólo la célula en metafase segrega, obligando a la otra célula a entrar en profase y seguir la mitosis. Las estructuras nucleares representan, meramente, la apariencia "normal" de la etapa del ciclo celular afectada por "prophasing": típicos cromosomas si el núcleo está al fi-

nal de G2; largas fibras simples si en G1; cromatina desorganizada si en S. (Sandberg, A.A., 1987). A este fenómeno llaman también, condensación prematura de cromosomas, ó pulverización cromosómica, aunque, junto con Sandberg, consideramos más apropiado el de "prophasing".

Se ha visto que la frecuencia con la que las células de subpoblaciones de tumores mamarios se fusionan unas con otras es mucho más alta que la descrita para varios otros tipos celulares (Miller, F.R., et al., 1988).

La fusión heterocariótica es un mecanismo cualitativo que permite la distribución genética entre un genoma tumorigénico y uno normal, generando así variabilidad genética más alta y, por lo tanto, una mayor probabilidad de segregación maligna. Más aún, los híbridos de células tumoral y normal de diferentes linajes de desarrollo pueden permitir la expresión simultánea de proto-oncogenes diseñados para trabajar sólo en tipos específicos de células blanco. (Larizza, L., et al, 1984). Además, la fusión de células neoplásicas con células normales podría proveer al tumor con un medio para reducir cualquier antigenicidad específica de tumor y, por lo tanto, permitirle escapar de los mecanismos de vigilancia inmunológica. (Goldenberg, D. M., et al., 1974).

Por otro lado, y como se dijo anteriormente, los tumores son infiltrados, a menudo, por linfocitos, granulocitos, y macrófagos, que pueden jugar un papel importante en el crecimiento, invasión, y diseminación tumorales. Hay indicaciones de que los linfocitos B y los macrófagos poseen el potencial intrínseco para fusión, que puede ser mediada por factores secretados (Lagarde, A.E., 1986). Además, los linfocitos comparten un número de propiedades con las células metastásicas, tales como el potencial para migrar a localizaciones anatómicas diferentes, penetrar los vasos, infiltrar diferentes tejidos, y alojarse preferencialmente en ciertas regiones de

distintos tejidos. La fusión de tales células con células malignas puede conferir tales propiedades a las células del híbrido dando por resultado una alta capacidad metastásica (De Baetselier, P., et al., 1981).

Todos estos procesos pueden causar una fase de poliploidización seguida por pérdida de cromosomas lo que originará una mayor heterogeneidad e inestabilidad genética que llevará, muy probablemente, al surgimiento de subpoblaciones con potencial metastásico.

A pesar de los notables avances en el tratamiento quirúrgico de los neoplasmas primarios y de las agresivas terapias adyuvantes, la mayoría de los pacientes con cáncer mueren de enfermedad metastásica por el hecho de que las lesiones en sitios secundarios ya son bastantes grandes en el momento del diagnóstico. Una masa tumoral al límite más bajo de detección radiográfica, 1 cm^3 , puede contener unas 10^9 células; la erradicación del 99,9% de ellas, un logro terapéutico notable, aún deja 10^6 células para proliferar proveyendo así una gran base para posterior generación de heterogeneidad biológica.

Diferentes subpoblaciones de células tumorales actuarían para estabilizar sus proporciones relativas e imponer así un equilibrio sobre la población combinada. La remoción del efecto estabilizante, aislando clones o aplicando una fuerte presión de selección tal como la quimioterapia, lleva a la rápida diversificación en las poblaciones resurgentes. Una vez que estas poblaciones se hacen relativamente heterogéneas se estabilizan otra vez, alcanzando un equilibrio. El mantenimiento de la heterogeneidad celular puede tener las ventajas de la multifor^umidad sin las desventajas de la superespecialización. Los tumores, por lo tanto, sacan provecho de los beneficios de la diversidad. (Fidler, I.J., et al., 1982).

El único tratamiento exitoso de la enfermedad metastásica será uno que evada los diferentes fenotipos

de las células tumorales dentro de metástasis individuales de un paciente y probablemente requerirá múltiples agentes y modalidades terapéuticas. (Talmadge, J.E., et al., 1984).

Los factores que determinan los patrones de diseminación metastásica son complejos. Dos teorías han suscitado considerable controversia por varias décadas: la hipótesis "suelo-semilla" de Paget (Paget, S., 1889), y la "teoría mecánica" de Ewing (Ewing, J., 1928). Paget consideraba que el microambiente de un órgano podía favorecer la siembra y crecimiento de células tumorales llevadas por la sangre, sobre otro órgano. Ewing, en cambio, establecía que "la mecánica de la circulación explica, sin duda, la mayoría de estas peculiaridades; porque no hay un órgano parenquimatoso más adaptado que otros para el crecimiento de células tumorales embólicas".

La diseminación tumoral requiere que las células:

(a) que han crecido para formar la masa primaria invadan localmente con la penetración activa o pasiva de los pequeños vasos sanguíneos y linfáticos.

(b) despegue desde el sitio de penetración ya sea como simples células o pequeños émbolos.

(c) sobrevivir a eventos traumáticos potencialmente letales y a defensas del sistema inmune del huésped tanto específicas como no específicas durante el pasaje a través del sistema circulatorio.

(d) arresto ya sea en las paredes de vasos sanguíneos menores o dentro de nódulos linfáticos drenantes.

(e) extravasarse y moverse dentro del parénquima del órgano circundante, supuestamente utilizando las mismas propiedades celulares que le permitieran invasión e intravasación, y

(f) proliferar en un sitio secundario para dar origen a metástasis clínicamente manifiestas que pueden, en sí mismas, metastatizar subsecuentemente.

Desde hace ya algunos años se observa creciente interés en el significado clínico y biológico del contenido celular de ADN de los cánceres humanos. La aneuploidía es ahora un fenómeno bien reconocido ya que una serie considerable de estudios informa una incidencia del 70 al 90% para tumores sólidos. Puede decirse que, en general, aquellos pacientes cuyas neoplasias exhiben un contenido de ADN diploide o cercano a diploidía, tienen un pronóstico mucho más favorable que los portadores de malignidades con niveles más altos de ploidía. Pocas excepciones se han informado respecto de esto; una de ellas la constituye la leucemia linfocítica aguda de la niñez, en que se observa un pronóstico relativamente favorable para la subcategoría hiperdiploide, (Smets, L.A., et al., 1987); otra excepción la constituye la tumorigénesis hepática químicamente inducida, en que se observa predominancia de hepatocitos diploides; cabe señalar aquí que los hepatocitos normales de la mayoría de los mamíferos son poliploides principalmente tetraploides (Saeter, G., et al., 1988). Además de su importancia acerca del pronóstico, el estudio de los niveles de ADN ploidía de los tumores complementa, frecuentemente, los estudios histopatológicos, ayuda en algunos casos para profilaxis y diagnóstico temprano, y está relacionado, muchas veces, con el potencial metastásico de los tumores primarios. Para documentar lo aquí expresado, de la muy amplia bibliografía disponible, hemos seleccionado sólo algunos trabajos: (Tribukait, B., et al., 1979; Barlogie, B., et al., 1980; Fu, Y.S., et al., 1982; Wolley, R.C., et al., 1982; Friedlander, M.L., et al., 1984; Doseva, D., et al., 1984; Erhardt, K., et al., 1984; Frankfurt, O.S., et al., 1985; Hstmark, J., et al., 1985; Smith, H.S., et al., 1985; Iversen, O.E., et al., 1985; Ljungberg, B., et al., 1986; Fallenius, A.G., et al., 1988; Ljungberg, B., et al., 1988; Baba, H., et al., 1989).

Para algunos tipos tumorales un contenido de ADN

mayormente cercano a triploidía o hipotetraploidía, es indicativo, de peor pronóstico (Atkin, N.B., et al., 1979; Tribukait B., et al., 1982; Wijström, H., et al., 1984). Por otro lado, la combinación diploide-tetraploide, se ha visto, frecuentemente, relacionada con menor malignidad. (Zetterberg, A., et al., 1984).

Quizás uno de los aportes más importantes que presta el estudio de la ploidía del ADN de los tumores malignos es que constituye, en muchos casos, un valioso parámetro en la elección de conducta terapéutica ya sea quirúrgica, quimioterápica, o de radiación. (Erhardt, K., et al., 1984; Johnson, T.S., et al., 1985; Ljungberg, B., et al., 1986; Korenaga, D., et al., 1988)

Hay poca ó ninguna evidencia cariotípica para diferencias consistentes entre cánceres primarios y sus metástasis; la información está relativamente esparcida y las fluctuaciones en cualquier sitio hacen extremadamente difíciles las interpretaciones. La pregunta de si diferencias identificables entre las células de cánceres primarios y metastásicos se debe a diferencias pre-existentes o se desarrollan durante el crecimiento de las mi crometástasis a macrometástasis es difícil de contestar; los dos diferentes procesos no son mutuamente excluyentes. (Weiss, L., 1980). En efecto según lo que se ve en la clínica, en algunos casos hay correlación entre tumor primario y sus correspondientes metástasis (Summers, J.L., et al., 1983; Auer, G., et al., 1984; Ljungberg, B., et al., 1986), y en otros no se observa dicha correlación (Smith, H.S., et al., 1985; Volm, M., et al., 1987).

En el Departamento de Investigaciones del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", el Dr. Lucas L. Colombo ha obtenido un modelo experimental, a partir de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo, en cepa BALB/c (Co^lombo, L.L., 1986). Las diferentes líneas tumorales que conforman dicho modelo tienen capacidad para metastatizar

en diferentes órganos y lo hacen con distintas potencialidades. Hemos considerado, por lo tanto, de gran utilidad el estudio de dichas líneas tumorales desde el punto de vista citogenético. Además, nos interesaba saber si algunos fenómenos observados en la clínica tienen su paralelismo en nuestro modelo.

DESCRIPCION DEL MODELO EXPERIMENTAL DEL DR. LUCAS L. COLOMBO

Sobre este modelo realicé los estudios cromosómicos.

El tumor original surgió en un ratón hembra BALB/c, que estaba en reproducción forzada en el Bioterio del Instituto de Oncología "Angeles H. Roffo". El tumor fue diagnosticado como tumor de mama de tipo histológico: adenocarcinoma, y rotulado como "M3". No tenía metástasis visibles al sacrificio.

La línea tumoral M3 se obtuvo trasplantando trozos de 1x1x1 mm del tumor original en el subcutáneo de ratones BALB/c normales y así, mediante trasplante de tumor subcutáneo en el subcutáneo de nuevos ratones se mantiene de rutina esta línea que desde el segundo trasplante se encuentra estabilizada en todos los parámetros biológicos medidos, e histológicamente se mantiene como "adenocarcinoma de mama semidiferenciado".

Los trasplantes fueron hechos por medio de un trocar largo, en el flanco izquierdo, entrando por la zona inguinal y los fragmentos tumorales fueron depositados a mitad de camino entre la axila y la ingle, en forma estéril.

A partir de la línea M3 se obtuvieron todas las demás según el esquema que se muestra en la Figura 1.

Sc-sc: significa trasplante de fragmentos de tumor subcutáneo al subcutáneo de nuevos ratones.

Pulmón-sc; ganglio-sc; hígado-sc: significa trasplante de tejido tumoral de metástasis pulmonar, ganglionar, o hepática, respectivamente, al subcutáneo de nuevos ratones.

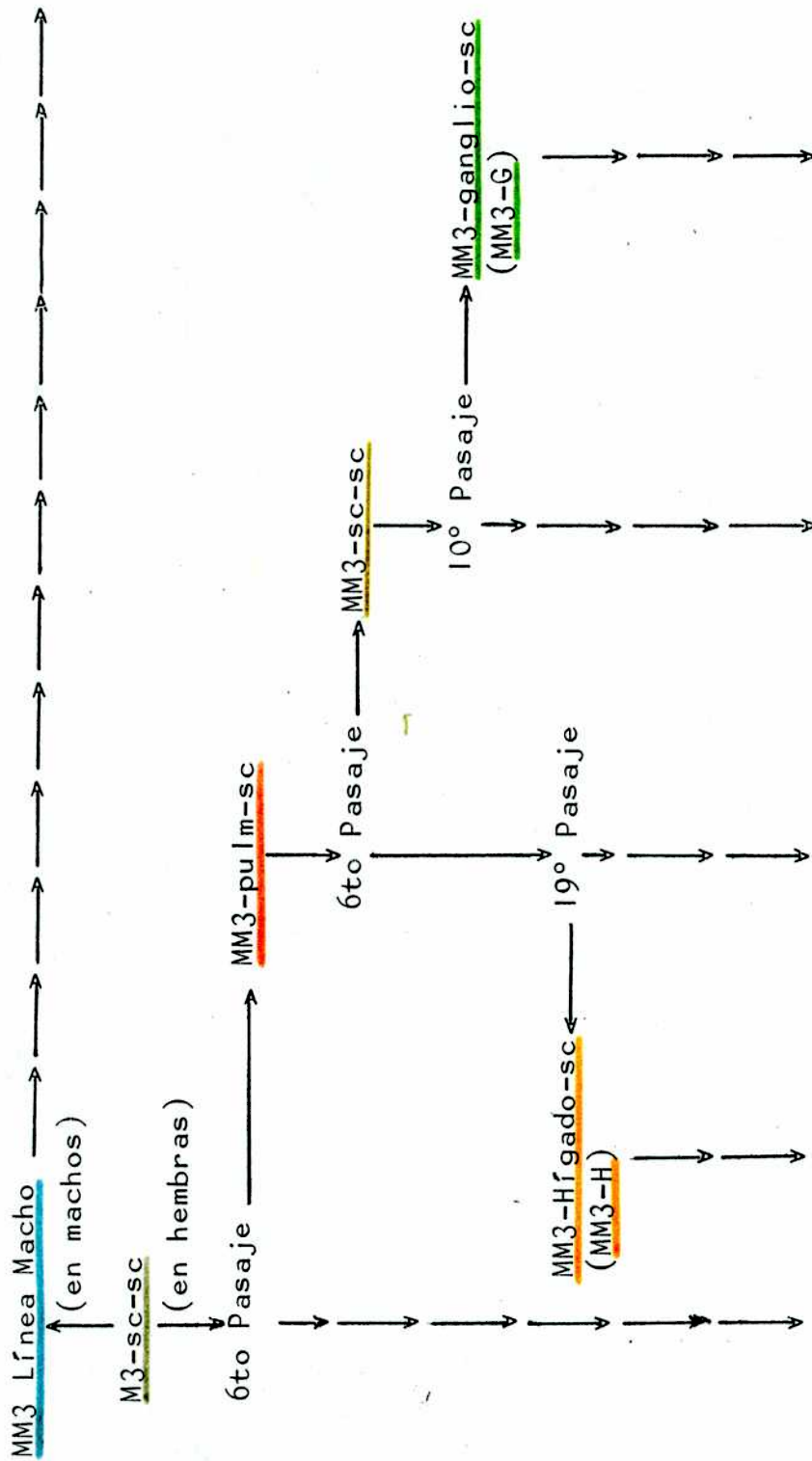


FIGURA 1: Esquema de la obtención de sublíneas tumorales con diferentes patrones metastásicos (Modelo experimental del Dr. Lucas. L. Colombo).

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LAS DISTINTAS LINEAS
(Colombo, L.L., 1986).

Los tumores que componen todas las líneas del modelo son adenocarcinomas semidiferenciados.

Línea M3-Tumor subcutáneo.

Tiempo de latencia: 6 + 2 días.

Tiempo de duplicación del diámetro tumoral: 13 días.
25 días post-trasplante, el tamaño tumoral es de 25 mm, con 40% de incidencia de metástasis pulmonares (6 nódulos por pulmón). Los ratones mueren debido a la masa tumoral subcutánea (10-15 g).

Tiempo medio de supervivencia de los portadores: 50 días.
Nunca metastatiza en ganglios drenantes ni en el hígado.

Línea MM3-pulmón-sc. Tumor subcutáneo.

Al iniciarse la línea:

Tiempo de latencia: 12-14 días.

Después de 25 días post-inóculo el diámetro tumoral era de 12 mm, con 95% de incidencia de metástasis pulmonares y alto número de nódulos por pulmón (30).

Tiempo medio de supervivencia de los portadores: 75 días.

Incidencia de metástasis hepáticas: 15,5% de los ratones.
Con el tiempo, esta línea se hizo menos metastásica, en pulmón, que la M3, que lo es moderadamente.

Línea MM3-sc-sc. Tumor subcutáneo.

Tiempo de latencia: 12 días.

Tiempo de duplicación del diámetro tumoral: 22 días.

Tiempo medio de supervivencia de los portadores: 72 días.

95% de incidencia de metástasis pulmonares, 15 a 20 nódulos

los por pulmón.

Incidencia de metástasis en ganglios drenantes: 40% de los ratones.

Incidencia de metástasis en hígado: 3% de los ratones.

Línea MM3-G. Tumor Subcutáneo.

Tiempo de latencia: 7 días.

Tiempo de duplicación del diámetro tumoral: 22 días.

Tiempo medio de sobrevida de los portadores: 85 días.

Incidencia metastásica en ganglios drenantes: 60% de los ratones.

Conserva y aún exalta su capacidad metastásica en pulmón.

Incidencia metastásica en hígado: 9,2% de los ratones.

Línea MM3-H. Tumor Subcutáneo.

Tiempo de latencia: 12 días.

Tiempo medio de sobrevida de los portadores: 75 días.

Incidencia de metástasis hepáticas (mediana): 12.

Incidencia de metástasis en ganglios drenantes: 2,1% de los ratones.

Gran preferencia de metástasis en hígado pero baja capacidad para metastatizar en pulmón y ganglios drenantes.

MM3-Línea Macho. Tumor Subcutáneo.

Tiempo de latencia: 6,5 días.

Tiempo de duplicación del diámetro tumoral: 11 días.

Tiempo medio de sobrevida de los portadores: 45 días.

Muy baja incidencia de metástasis, sólo en pulmón.

COMPARACION ENTRE DOS LINEAS CON MUY DIFERENTE CAPACIDAD METASTASICA EN PULMON.

La línea MM3-sc-sc, con alto potencial metastásico en pulmón difiere de la línea M3, moderadamente metastásica en dicho órgano.

Se han establecido, en el Departamento de Investigaciones del Instituto "A.H.Roffo", varias pautas que permiten comparar las características propias de las dos líneas. La línea MM3-sc-sc respecto de la línea M3 presenta:

- Menor tamaño celular.
- Menor velocidad de crecimiento, in vivo e in vitro.
- Menor capacidad antigénica. (Colombo L.L., 1986).
- Mayor capacidad invasiva in vitro. (Puricelli, L., et al.; 1984).
- Mayor capacidad de las células para quedar retenidas en pulmón al pasar por su lecho capilar. (Colombo, L.L., et al., 1982).
- Menor grado de sensibilidad de las células para la formación de metástasis artificiales en presencia de M3(sc) ó de MM3-sc-sc(sc) en el sitio subcutáneo. (Colombo, L.L., 1986).
- Menor capacidad para evitar, desde el sitio subcutáneo, la aparición de metástasis artificiales de MM3-sc-sc(sc); y débil efecto sobre las de M3(sc). (Colombo, L.L., 1986).
- La incidencia de presencia de células en ganglio drenante es muy alta aún con tumores pequeños, mientras que para M3 va aumentando con el tamaño del tumor. (Colombo, L.L., 1986).
- Metastatiza en ganglios drenantes en un 40% y en hígado en un 3% de los ratones, mientras que M3 nunca metastatiza en esos órganos. (Colombo, L.L., 1986).
- Mayor actividad de colagenasa tipo IV. (Cómez, D.F., et al., 1989).

- Mayor producción de activador del plasminógeno. (Peyra-Alfonso, S., et al., 1988).
- Mayor capacidad angiogénica inducida por linfocitos. (Míguez, M., et al., 1986).
- Mayor cantidad de células Cu-positivas en los tumores. (Fuchs, A.G., et al., 1986).

VENTAJAS DEL MODELO EXPERIMENTAL DEL DR. LUCAS L. COLOMBO

- Se basa sobre un adenocarcinoma de mama, es decir de un tipo histológico común en la patología oncológica humana.
- Es un modelo in vivo; por lo tanto, permite establecer si las experiencias in vitro se corresponden con el comportamiento in vivo, condición necesaria para ser valederas.
- Son tumores trasplantables; éstos posibilitan la reproducibilidad de las experiencias, la estandarización de la técnica y la fácil manipulación de los tumores.
- Es un modelo de trasplantes singeneicos, por lo que el huésped reaccionará solamente contra aquello que tengan de diferente las células tumorales con respecto a las normales, y se pueden repetir los experimentos en condiciones siempre iguales.
- El modelo proviene de un tumor "espontáneo" surgido en BALB/c que, además de ser unas de las cepas de ratones de más amplia difusión en oncología experimental, posee una baja incidencia de aparición espontánea, ya que estos tumores no son generalmente muy inmunogénicos, como sí lo son los inducidos por carcinógenos químicos o virales, pero que rara vez metastatizan, especialmente en pulmón.
- La característica de no inmunigenicidad lo asemeja a los tumores humanos.
- Se trata de un modelo, de los llamados "variantes específicas de órgano" obtenidas por presiones de selección a partir de una población tumoral heterogénea.
- Consta de líneas tumorales metastásicas y no metastásicas derivadas de un mismo tumor, importante para el estudio de los mecanismos de la metástasis ya que permite

la comparación entre células metastásicas sin tener que comparar con células normales.

- La línea MM3-sc-sc, además de metastatizar en pulmón, lo hace también, a veces, en ganglios drenantes (algo poco frecuente en ratones), característica que la asemeja más a los tumores humanos.

MATERIALES Y METODOS

Son los Materiales y Métodos utilizados para todas las experiencias presentadas en esta Tesis.

Ratones: Se usaron hembras y machos de cepas endocriadas entre hermanos BALB/c de 3 a 5 meses de edad.

Tumores: Los estudios cromosómicos se realizaron sobre tumores de todas las líneas que conforman el modelo experimental del Dr. L.L.Colombo, ya descrito. Las experiencias se hicieron sobre un número importante de ratones y se repitieron muchas veces para cada tipo tumoral a lo largo de varios años, no sólo para obtener una cantidad de metafases estadísticamente válida sino también para detectar cambios en el comportamiento tumoral que pudieran producirse con el tiempo.

Trasplante: Fragmentos de tumor (1 mm^3) sub-cutáneo ó de metástasis fueron trasplantados subcutáneamente en el flanco izquierdo. Los tumores se dejaron crecer hasta la muerte natural de los ratones ó hasta su sacrificio cuando estaban moribundos.

Cultivo de las células tumorales y procesamiento para estudio citogenético: para investigar si la metodología de cultivo in vitro modifica el patrón cromosómico, se procesaron para estudio citogenético suspensiones monocelulares directamente de los tumores. No se encontraron variaciones respecto de los cultivos primarios, lo que sugiere que la utilización de estos últimos es válida y que la heterogeneidad cromosómica observada se debe a los tumores per se y no al pasaje in vitro, pero esto sólo en cuanto a cultivo primario ya que, a partir de cultivo secundario los patrones citogenéticos varían con los suce-

sivos pasajes. Entonces sólo se utilizaron cultivos celulares primarios; éstos proporcionan mayor número de metafases que las suspensiones celulares no cultivadas.

Los tumores una vez limpios y libres de tejido necrótico se cortaron en pequeños trozos que se sometieron, indistintamente, a disociación mecánica con material quirúrgico o bien a dos digestiones enzimáticas sucesivas (Pronasa 0,01% - DNAsa 0,0035% en medio de cultivo) durante 30 minutos a 37°C, en agitación, a fin de obtener suspensiones monocelulares. Se ajustó la concentración celular a $2,5 \times 10^5$ céls/ml. La viabilidad, determinada por la prueba de exclusión de azul tripán, fue alta en todas las experiencias. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂-aire, en MEM (Cat. N.410-1500, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY) suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco) y gentamicina (8 ug/ml), sobre superficie de plástico o de vidrio.

Una vez que los cultivos estuvieron en crecimiento exponencial, se incubaron durante 90 minutos a 37°C con Demecolcine (Sigma) 0,2 ug/ml de medio, para arresto de las células en metafase. Luego de tripsinización (0,25% tripsina-EDTA 0,02%, en PBS (solución buffer fosfato) libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) para despegar las células de la superficie de crecimiento, éstas fueron sometidas a tratamiento hipotónico con una solución 0,075 M KCl por 45 minutos. Las muestras se fijaron en metanol: ácido acético glacial (3:1) por dos horas, se lavaron dos veces y se resuspendieron en dicho fijador. Las células fijadas, extendidas sobre portaobjetos, una vez secadas a temperatura ambiente, se colorearon con 4% Giemsa durante 10 minutos.

Aquellos extendidos a ser sometidos a bandeo cromosómico G, fueron tratados con tripsina y posterior coloración con Giemsa, según el método, ligeramente modifi

cado, de M.Seabright (1971). El cariotipo de las células normales de los ratones BALB/c consta de 40 cromosomas acrocéntricos.

Cuando el tamaño del tumor así lo permitió se cultivaron y estudiaron citogenéticamente, por separado, células derivadas de fragmentos de diferente sitios del mismo.

Para todas las líneas se compararon las medias y patrones de distribución de los números cromosómicos de los tumores subcutáneos que produjeron y de los que no produjeron, metástasis visibles al microscopio estereoscópico.

Estudio Estadístico: Incluye el análisis de la varianza (ANOVA) y el método "t" (de Student) para comparaciones planeadas.

RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para las medias y la distribución del número cromosómico para células de fragmentos de diferentes sitios de tumores grandes. Tampoco para los tumores subcutáneos que produjeron o no produjeron metástasis.

Para cada línea, los resultados obtenidos a partir de varias metástasis pulmonares juntas que, por su tamaño, no permitieron el cultivo por separado, no presentaron diferencias cromosómicas significativas con los de las metástasis que pudieron ser cultivadas aisladamente.

Para cada uno de los tipos tumorales, se sumaron los datos obtenidos de los distintos cultivos sólo cuando el análisis estadístico demostró que no había diferencias entre ellos en cuanto a las medias y patrones de distribución del número cromosómico.

Los datos que se fueron obteniendo del seguimiento de las líneas hasta los últimos cultivos realizados no muestran diferencias significativas respecto de los ya procesados estadísticamente cuyos n figuran en los histogramas correspondientes.

Para todos los tumores los cromosomas son acrocéntricos en casi el 99%.

Línea M3

Estudios cromosómicos: desde fines del año 1980 hasta 1989.

La Figura 2 muestra los histogramas correspondientes a tumor subcutáneo y metástasis pulmonares. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias del número cromosómico.

Cabe destacar que en estudios que realicé hasta

1983 (Bal de Kier Joffé, E., et al., 1983) revelan que la media del número cromosómico de las metástasis pulmonares era significativamente mayor que la del tumor subcutáneo (que se mantuvo invariable a través del tiempo) y fue acercándose a ésta hasta no presentar diferencias significativas con la misma, permaneciendo así hasta ahora. No se detectaron cambios fenotípicos acompañando a esta variación en el plano cromosómico.

Línea MM3-pulmón-sc.

Estudios cromosómicos: desde fines de 1980 hasta 1989.

La Figura 3 muestra los perfiles cromosómicos correspondientes a tumor subcutáneo y metástasis. Hay diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre las medias del tumor subcutáneo respecto de las correspondientes a las metástasis, y entre las de éstas.

Cabe señalar que, en estudios cromosómicos que realicé hasta principios de 1983, tanto en el tumor subcutáneo como en las metástasis pulmonares, alrededor del 85% de las células estaban en el nivel diploide, y las medias del número cromosómico no diferían significativamente entre sí (Bal de Kier Joffé, E., et al; 1983). Con el tiempo fueron cambiando para presentar, desde aproximadamente el año 1985 y hasta la actualidad, los perfiles que se muestran en la Figura 3. Curiosamente, estos cambios en los patrones cromosómicos se acompañaron por una notable disminución en el muy alto potencial metastásico en pulmón que exhibía esta línea (alrededor del 95% de incidencia y más de 20 nódulos por pulmón).

Línea MM3-sc-sc

Estudios cromosómicos: desde 1983 hasta 1989. La Figura 4 muestra los patrones cromosómicos del tumor primario y las metástasis pulmonares.

Las medias del número cromosómico difieren muy significativamente ($p < 0,01$).

Los patrones se conservaron estables a través de todo el período de estudio.

Línea MM3-G

Estudios cromosómicos: desde 1984 hasta 1989.

Los tumores subcutáneos de esta línea y de la que le dio origen (MM3-sc-sc) son bastante similares en cuanto a la distribución y las medias del número cromosómico, que no presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).

En cuanto a las metástasis en ganglios drenantes (axilar y braquial), no puede sacarse conclusión alguna ya que los resultados son muy variados. La Figura 6 muestra las distribuciones del número cromosómico de A y de B, metástasis en un solo ganglio drenante (el otro no metastásico) de dos animales diferentes. Las medias del número cromosómico de ambas no son significativamente diferentes pero sí lo es la de cada una respecto de la del tumor subcutáneo ($p < 0,01$). En la Figura 7 se presentan los patrones cromosómicos de dos pares de ganglios drenantes pertenecientes a dos ratones. C1 y C2 muestran perfiles muy distintos; aunque las medias del número cromosómico no son significativamente diferentes, sí lo son respecto de la del tumor primario. Los patrones D1 y D2 son bastante similares; aunque las medias del número cromosómico difieren entre ellas ($p < 0,01$), no es así respecto de la del tumor subcutáneo.

La media del número cromosómico para las metástasis pulmonares no muestra diferencia significativa respecto de la del tumor primario.

Dos ratones presentaron metástasis hepáticas, uno de ellos también metástasis en bazo. La media del

número cromosómico de las metástasis en bazo difiere significativamente ($p < 0,01$) de la del tumor subcutáneo, y de las correspondiente a metástasis pulmonares y hepáticas que, por otro lado, no exhiben diferencias significativas entre ellas. La Figura 8 muestra los histogramas correspondientes a las metástasis en pulmón, hígado y bazo.

Línea MM3-H

Estudios cromosómicos: desde 1984 hasta fines de 1987.

La Figura 9 muestra el comportamiento cromosómico del tumor subcutáneo, el de MM3-pulmón-sc que dio origen a esta línea y las metástasis hepáticas. La media del número cromosómico para las metástasis en hígado difiere significativamente ($p < 0,01$) respecto de las correspondientes a los tumores subcutáneos de MM3-H y MM3-pulmón-sc, que no presentan diferencias entre sí.

En tres ratones se dieron escasas y pequeñas metástasis pulmonares y en otro hubo metástasis de sólo un ganglio drenante. Aunque los resultados no fueron incluidos para el análisis estadístico debido al bajo número de metafases obtenidas, se muestran los histogramas correspondientes en la Figura 10.

MM3-Línea Macho

Estudios cromosómicos: desde mediados de 1985 hasta 1989.

Sólo fue posible estudiar el tumor subcutáneo (Figura 11), pues esta línea posee un muy bajo potencial metastásico.

MM3 línea Macho se estudió con dos objetivos: (1) establecer comparaciones con su línea paralela en

hembras (MM3-pulmón-sc).

(2) investigar presencia de cromosomas Y en las células tumorales.

Respecto de punto (1), como puede observarse en los histogramas correspondientes (Figuras 3 y 11), los tumores subcutáneos de ambas líneas exhiben su componente principal diploide, con más del 30% de sus células, y hay otro pico importante a nivel tetraploide. Las medias del número cromosómico muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto al punto (2), los estudios aplicando bando G permitieron detectar la presencia de cromosomas Y en un número suficiente de células tumorales (alrededor del 6%), que evidencian fusión espontánea entre éstas y células normales del huésped. La Figura 12 muestra el cariotipo bandeado de una de tales células.

Para todas las líneas:

no se observaron cromosomas cuyo tamaño excediera el de los del cariotipo normal y sólo escasas metafases exhibieron presencia de dobles minutos (DMs). Se vieron, aunque en muy baja proporción, núcleos endomitóticos y metafases con diplocromosomas.

↪ Cuando nos referimos a "nivel" o "región" de una cierta ploidía queremos significar que las células tienen un número cromosómico alrededor de dicha ploidía.

COMPARACION ENTRE LOS TUMORES PRIMARIOS

Comparando las medias de los números cromosómicos de los tumores primarios subcutáneos:

Línea M3, de la que derivan todas las demás, difiere significativamente ($p < 0,01$) sólo de MM3-pulmón-sc y de MM3-H.

Línea MM3-pulmón-sc, que da origen a MM3-sc-sc y a MM3-H, sólo difiere significativamente ($p < 0,05$) de la primera. Línea MM3-pulmón-sc también difiere ($p < 0,01$) de su paralela MM3-Línea Macho.

Línea MM3-sc-sc, que da origen a MM3-G, no difiere significativamente de ésta.

COMPARACION ENTRE LAS DIFERENTES LINEAS QUE METASTATIZAN EN PULMON

En la Figura 14 se observan, ordenadas de abajo hacia arriba según aumenta el potencial metastásico en pulmón, los patrones de distribución del número cromosómico correspondientes a los tumores subcutáneos y sus respectivas metástasis en dicho órgano. A medida que va aumentando la capacidad metastatizante de las diferentes líneas, en los tumores subcutáneos va cobrando importancia la componente a nivel tetraploide en detrimento de la correspondiente al diploide. También en las metástasis pulmonares se observa la misma tendencia si bien, en lo que concierne a la línea más metastásica hay, además, un pico diploide importante.

METASTASIS EN HIGADO PRODUCIDAS POR TRES LINEAS DIFERENTES

Como se observa en la Figura 15, los perfiles

cromosómicos correspondientes a las metástasis hepáticas de la línea MM3-H y de la que le dio origen, MM3-pulmón-sc, son parecidas, con componente principal a nivel diploide y una, bastante importante, hipodiploide; las medias de los números cromosómicos no son significativamente diferentes. Totalmente distinto se muestra el patrón correspondiente a las metástasis hepáticas de la línea MM3-G, con más del 65% de las células en los niveles alrededor del tetraploide con componente principal en éste (37% de las células) siendo, comparativamente despreciable la diploide; también la media del número cromosómico difiere significativamente ($p < 0,01$) respecto de las correspondientes a las otras dos líneas.

COMPARACION ENTRE LAS LINEAS MM3-PULMON-SC Y MM3-SC-SC

Como se observa en la Figura 13, para ambas líneas, MM3-pulmón-sc con mayor porcentaje de células a nivel diploide y MM3-sc-sc a nivel tetraploide, se observa un corrimiento hacia la izquierda para las metástasis, que se manifiesta en la media y distribución del número cromosómico.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE HETEROGENEIDAD TUMORAL-I

Caracterización in vivo e in vitro de subpoblaciones de diferente densidad celular de un adenocarcinoma mamario murino.

Los tumores contienen poblaciones celulares que difieren en muchas características, entre ellas, morfología, tasa de crecimiento, cariotipos, antigenicidad, inmunogenicidad, tumorigenicidad, potencial metastásico, etc.

Con el objeto de estudiar la heterogeneidad del tumor M3(sc), subfraccionamos el mismo según gradientes de densidad obtenidos por centrifugación con Percoll como medio de separación. Se aislaron cuatro subpoblaciones de distintas densidades celulares con diferente morfología y propiedades de crecimiento. Cuando se inocularon subcutáneamente en ratones singeneicos, sólo la subpoblación de menor densidad mostró menos tomas tumorales y un período de latencia más largo llegando a un peso tumoral menor a los 45 días post-inóculo. No se observaron diferencias significativas en la capacidad para producir metástasis espontáneas en pulmón entre el tumor parental y las subpoblaciones aisladas, salvo para la subpoblación de menor densidad que fue menos metastásica que las otras.

El análisis cariotípico de M3 y de las subpoblaciones mostró un modo aproximadamente tetraploide mientras que la media del número cromosómico aumentó con la densidad celular (Figura 16). Así, en este tumor mamario heterogéneo la subpoblación de densidad más baja probó ser menos tumorigénica.

Con el método empleado a partir del tumor M3 se pudieron aislar cuatro subpoblaciones celulares diferentes en cuanto a densidad celular, morfología y distribu-

ción del número cromosómico. Sólo para el caso de la subpoblación de menor densidad celular se observó un potencial metastásico diferente, en este caso menor, que el del tumor parental.

In vivo and in vitro characterization of subpopulations of different cell density from a murine mammary adenocarcinoma.

Lydia Puricelli, María del Carmen C. Vidal, Elisa Bal de Kier Joffé, Lucas L. Colombo.

J. Exp. Clin. Cancer Res., 3(2): 175-184, June 1984.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE HETEROGENEIDAD TUMORAL-II

Caracterización de una nueva variante tumoral murina con diferente comportamiento in vivo seleccionada por sus propiedades de adhesión.

Para investigar si la selección por adhesión a fibronectina (FN) selecciona también para células con diferentes capacidades tumorigénicas y metastásicas, las células M3 se sembraron sobre sustratos plásticos cubiertos con FN; las no adherentes fueron removidas a los 30 minutos y las adherentes se expandieron en cultivo en monocapa. Las células tumorales seleccionadas se cosecharon e inocularon subcutáneamente en ratones singéneos. Este procedimiento de selección se repitió tres veces. Después del tercer ciclo, los tumores se mantuvieron por trasplante subcutáneo por trócar, y la variante obtenida se llamó M3Ad. Esta variante tuvo idéntico comportamiento de adhesión a FN que M3, a pesar de haber sido seleccionada según esa característica. Pero M3Ad exhibió un tiempo de latencia más corto, menor tiempo de supervivencia de sus portadores, una tasa de crecimiento más alta, una menor incidencia de metástasis pulmonares espontáneas y produjo significativamente más y mayores colonias pulmonares que M3, después de inyección iv. Los patrones de distribución del número cromosómico revelaron que para las células M3Ad el modo (72 vs 82) y la media ($\bar{X} \pm ES = 62,0 \pm 2,0$ (n=100); vs $75,8 \pm 2,5$ (n=100)) eran más bajos que para las células M3 ($p < 0,01$); además, la componente principal del histograma del número cromosómico en M3Ad estuvo más cerca del nivel triploide que el mismo parámetro en M3, cercano a tetraploidía (Figura 17). Este último resultado, junto con más altas capacidades tumorigénica y de colonización en pulmón de M3Ad podría estar relacionado con la asociación, ya observada en tumo-

res humanos, entre una alta malignidad y un número cromosómico cercano a triploidía debido, probablemente, a un marcado desbalance génico. (Barlogie, B., et al. 1983; Wijkström, H., et al. 1984)

Characterization of a new murine tumor variant with different in vivo behavior selected by its adhesive properties.

Lydia Puricelli, Lucas L. Colombo, Daniel E. Gómez, María del Carmen C. Vidal, Elisa Bal de Kier Joffé.

(enviado para su publicación).

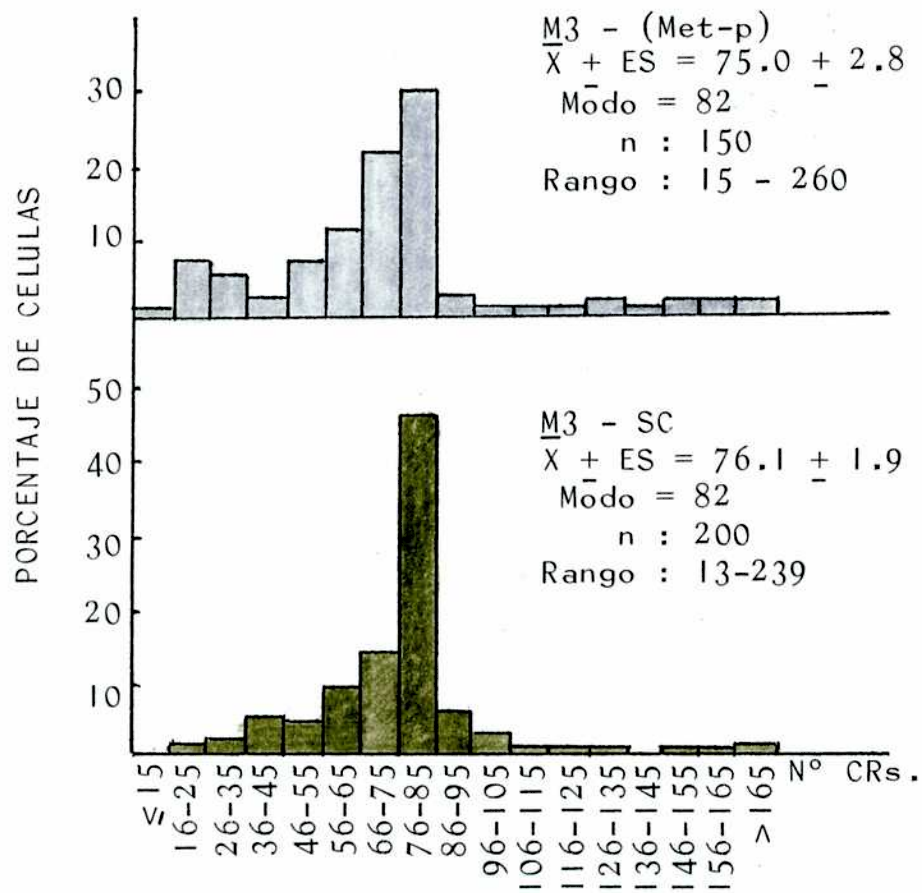


FIGURA 2: Patrones cromosómicos de la Línea M3.
(Met-p = metástasis pulmones).

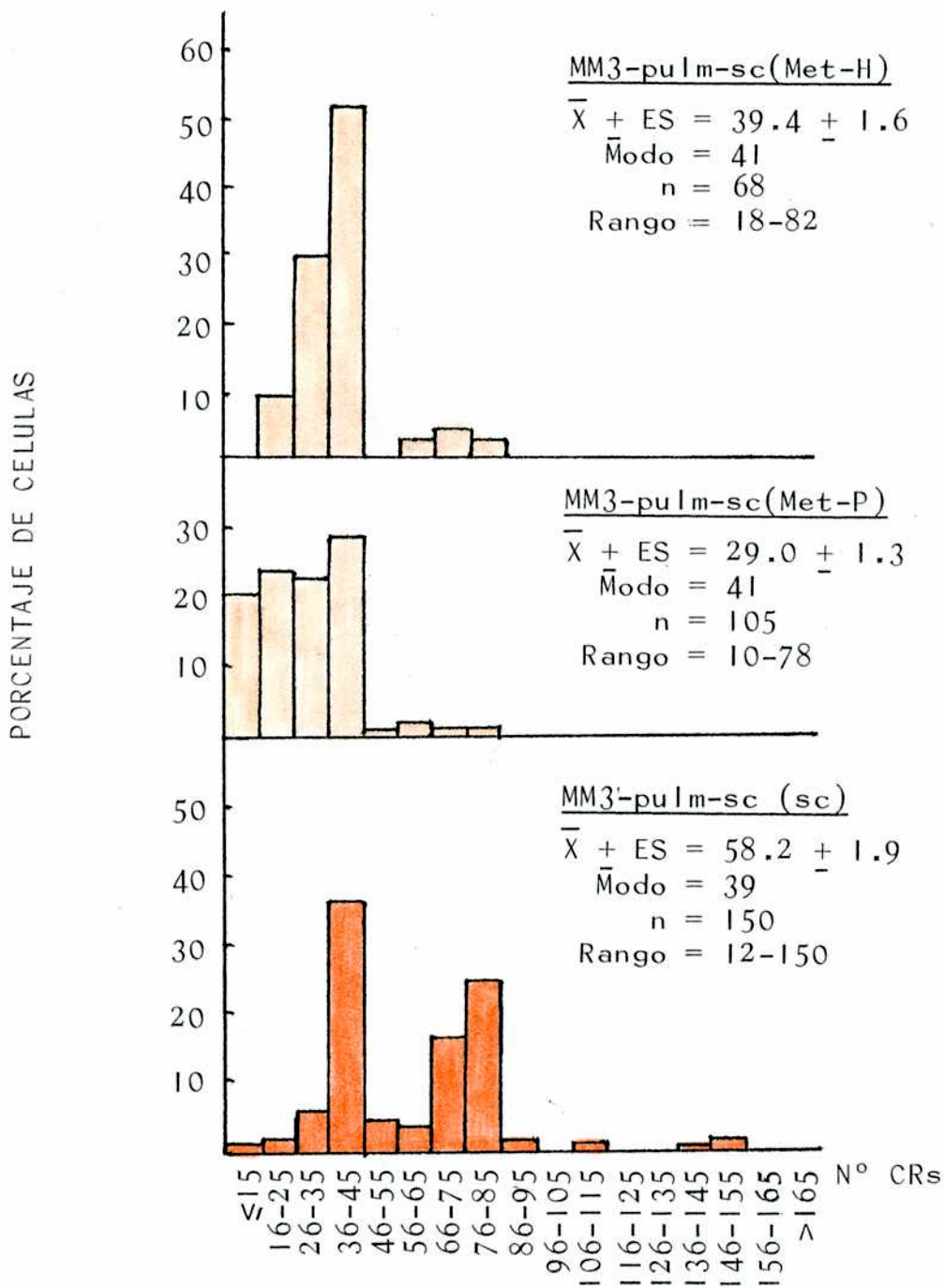


FIGURA 3: Patrones cromosómicos de la Línea MM3-pulm-sc. (Met-H: metástasis hígado).

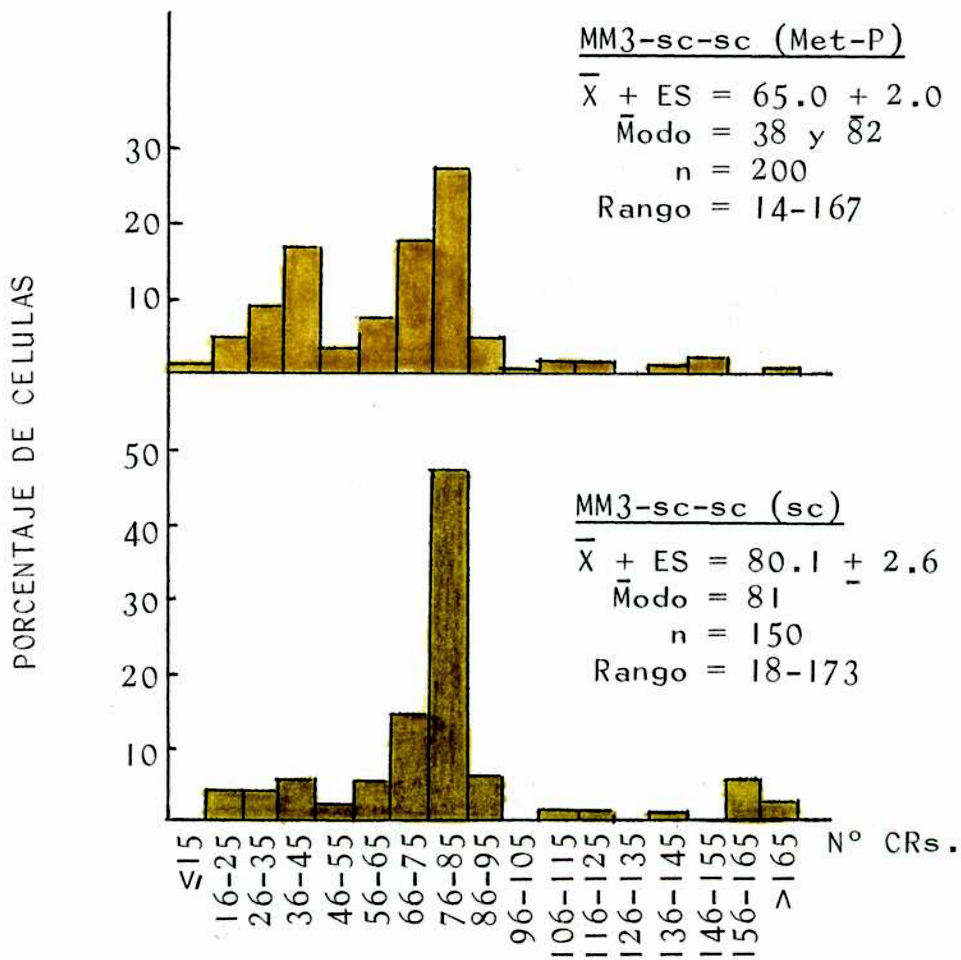


FIGURA 4: Patrones cromosómicos de la Línea MM3-sc-sc.

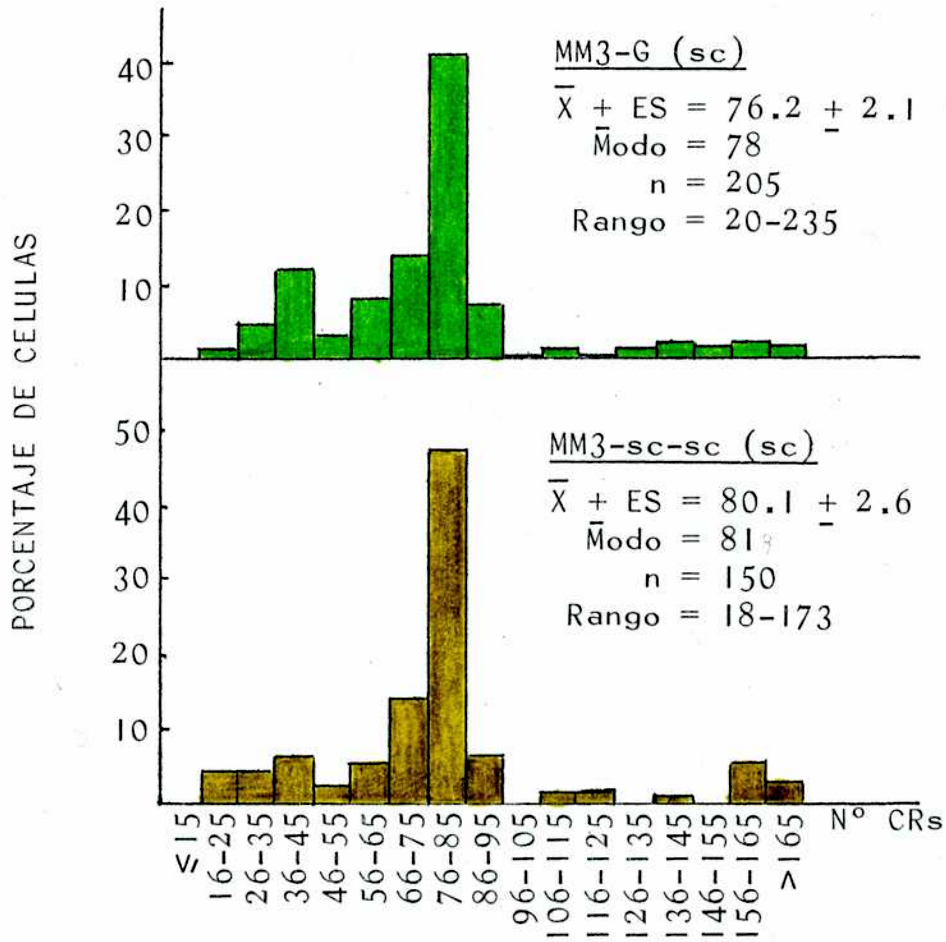


FIGURA 5: Patrón cromosómico de MM3-G (sc) y del que da origen a la línea.

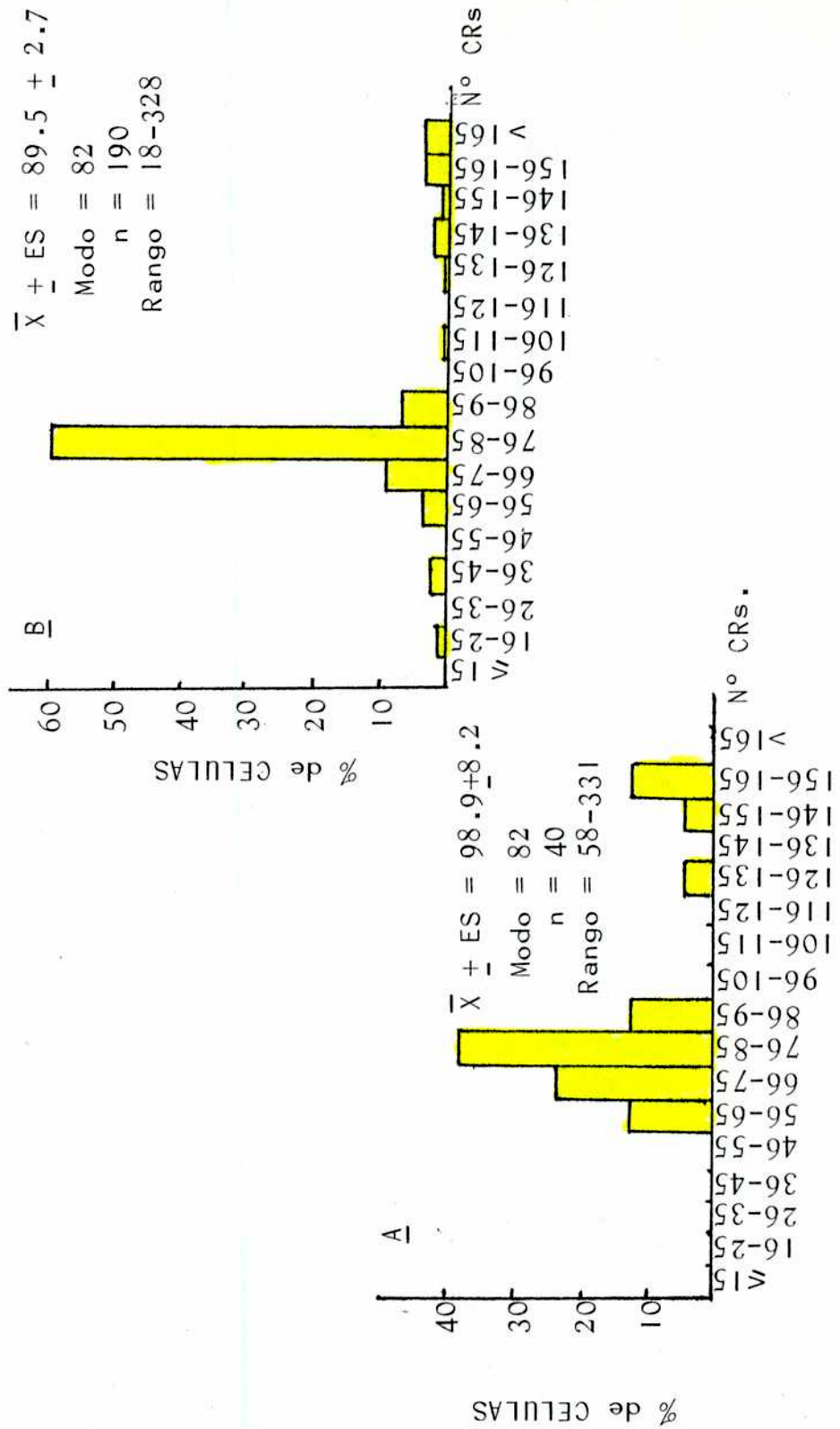


FIGURA 6: Patrones cromosómicos de MM3-G (Met-G) en un solo ganglio drenante (el otro no metastásico), de dos animales diferentes. (Met-G= metástasis ganglio drenante).

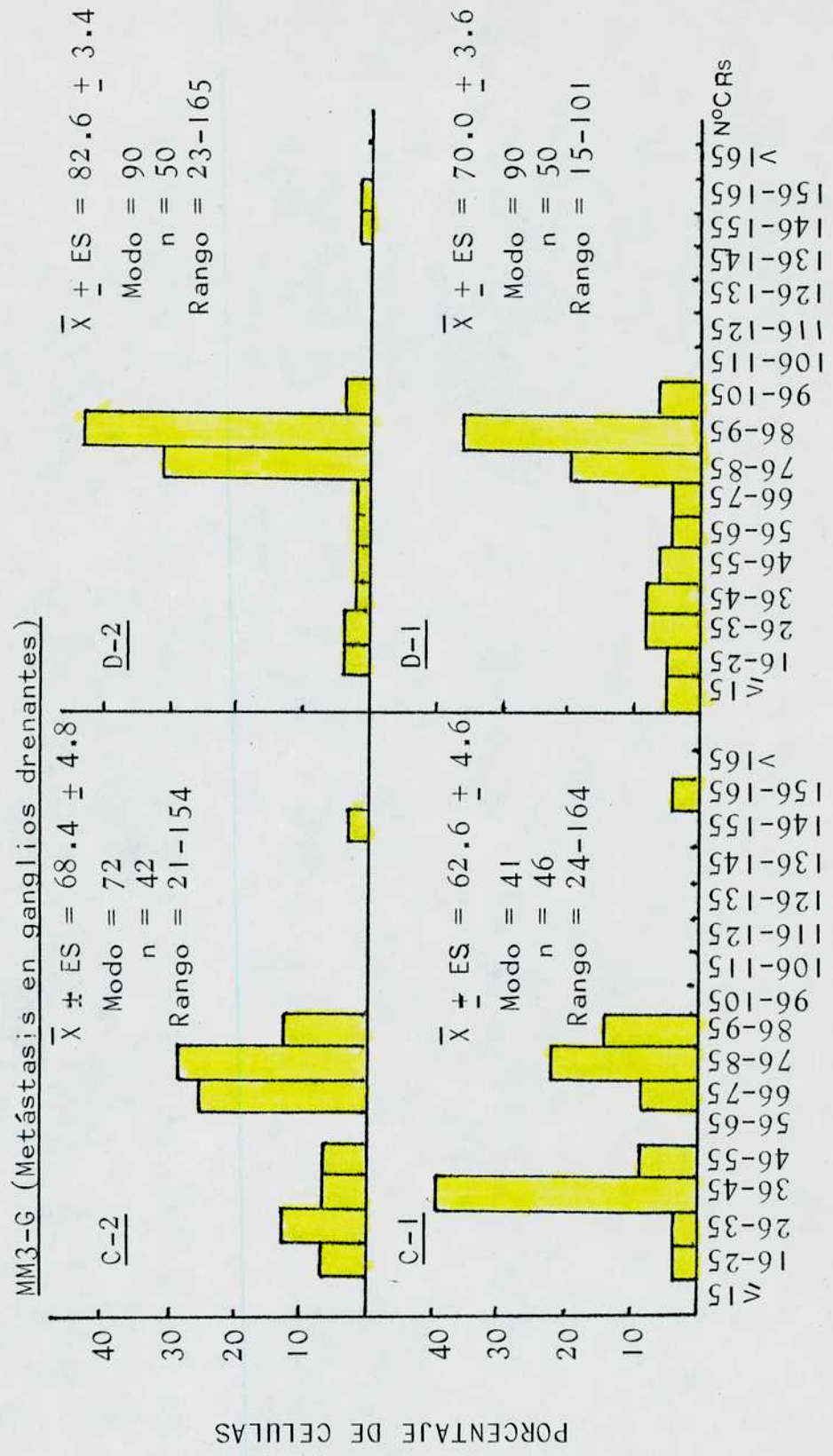


FIGURA 7: Patrones cromosómicos de MM3-G (Met-G) en ambos ganglios drenantes, de dos animales diferentes.

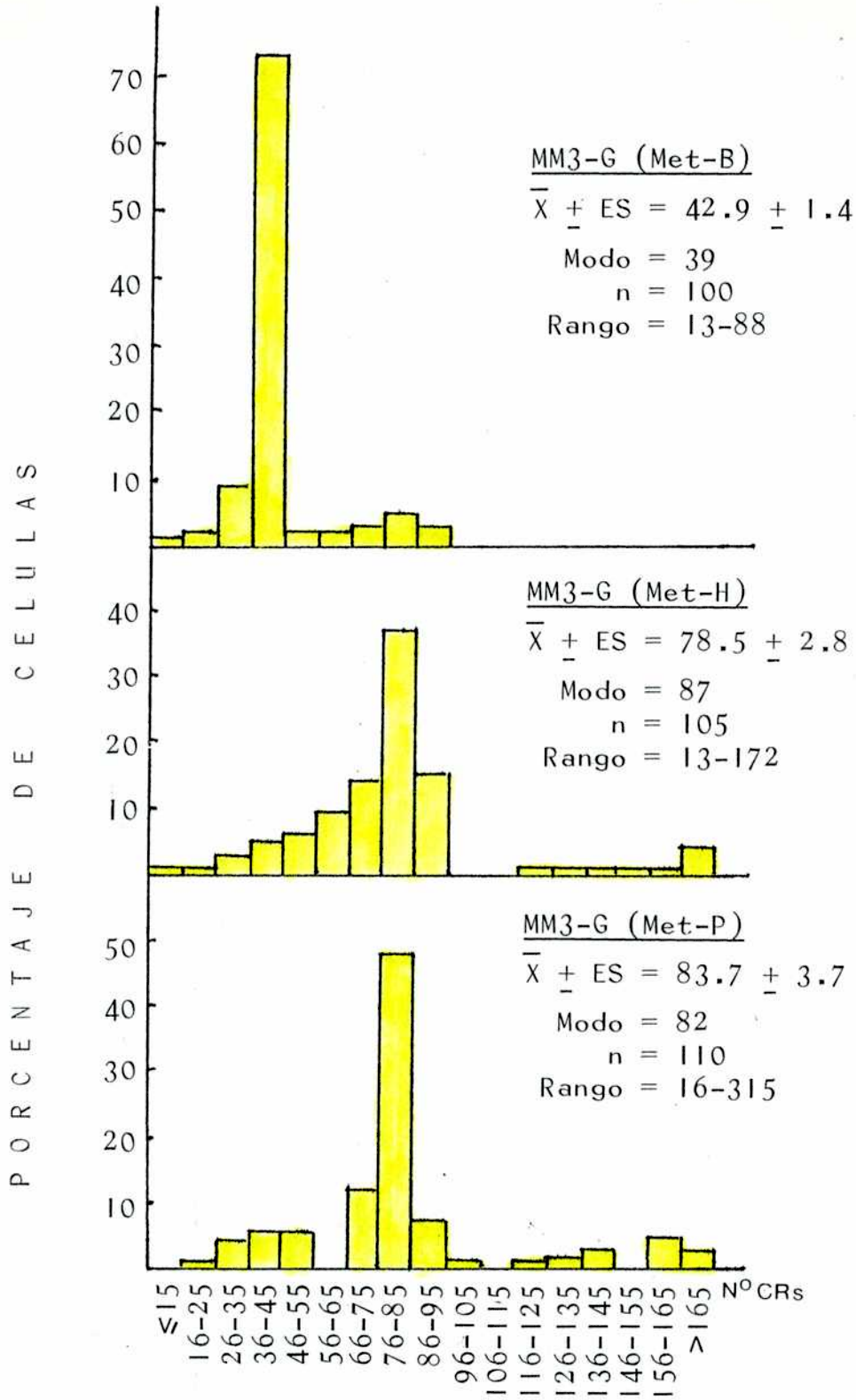


FIGURA 8: Patrones cromosómicos de la Línea MM3-G (continuación)

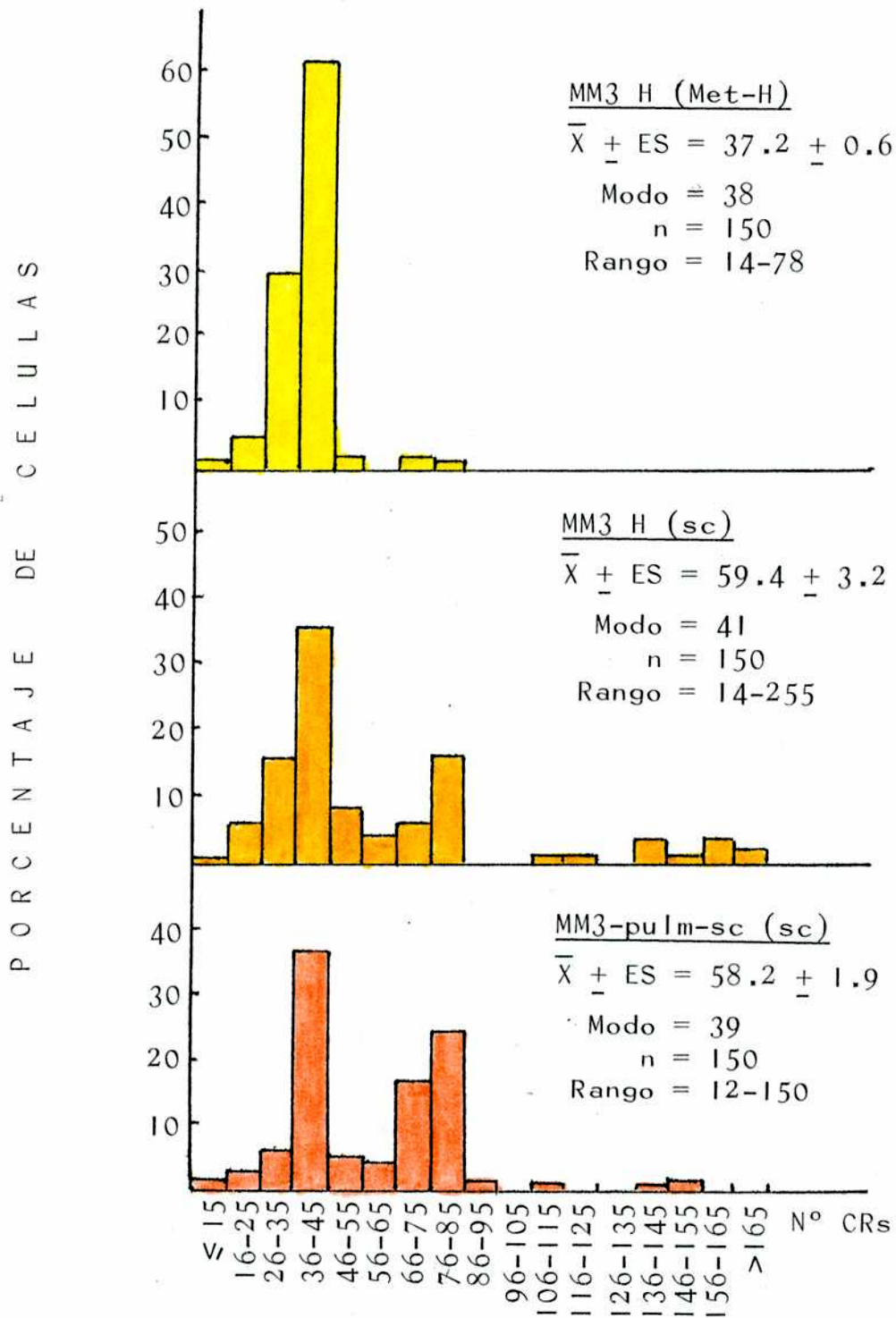


FIGURA 9: Patrones cromosómicos de la Línea MM3-H y de MM3-pulm-sc (sc) que le dió origen.

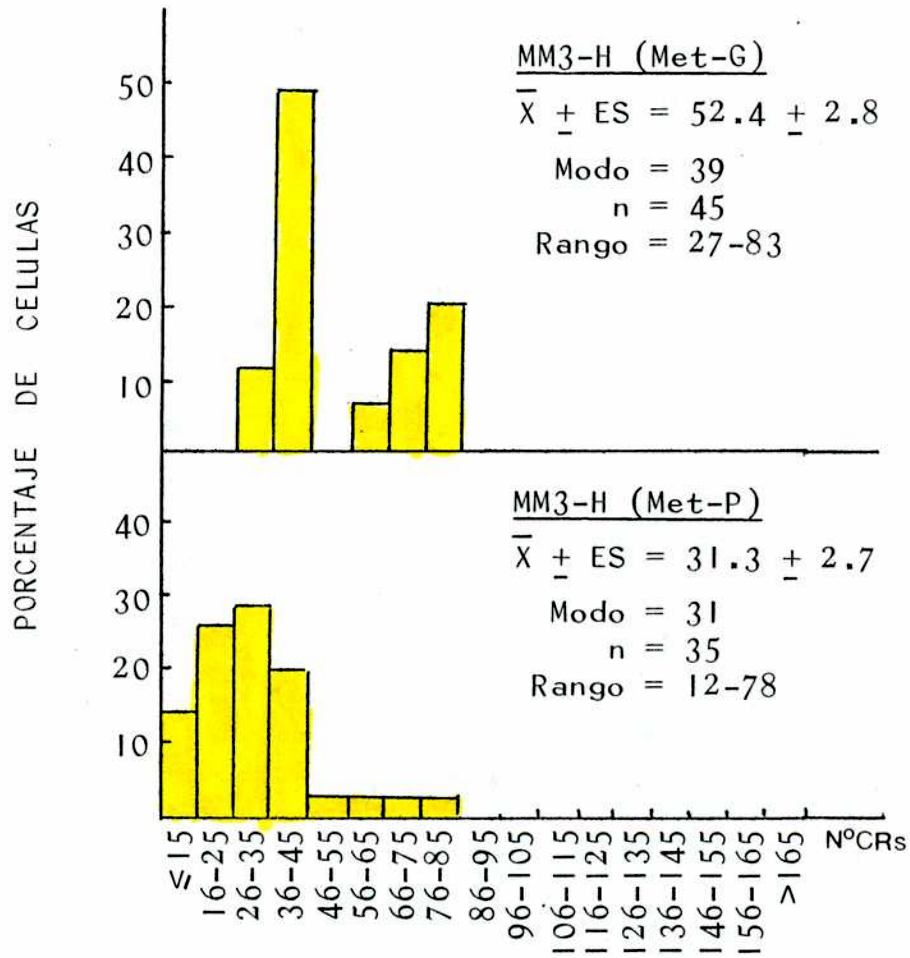


FIGURA 10: Patrones cromosómicos de la Línea MM3-H.
(Continuación).

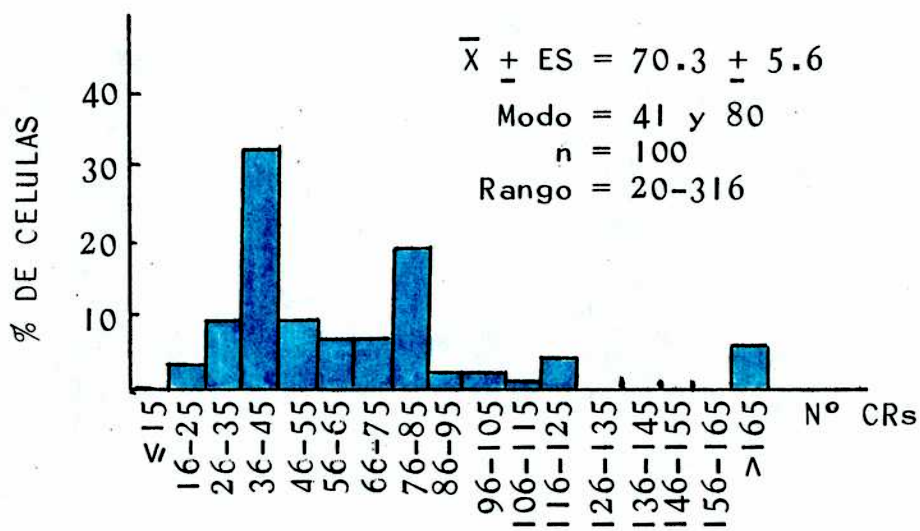


FIGURA 11: Patrón cromosómico del tumor sc de MM3-Línea Macho.

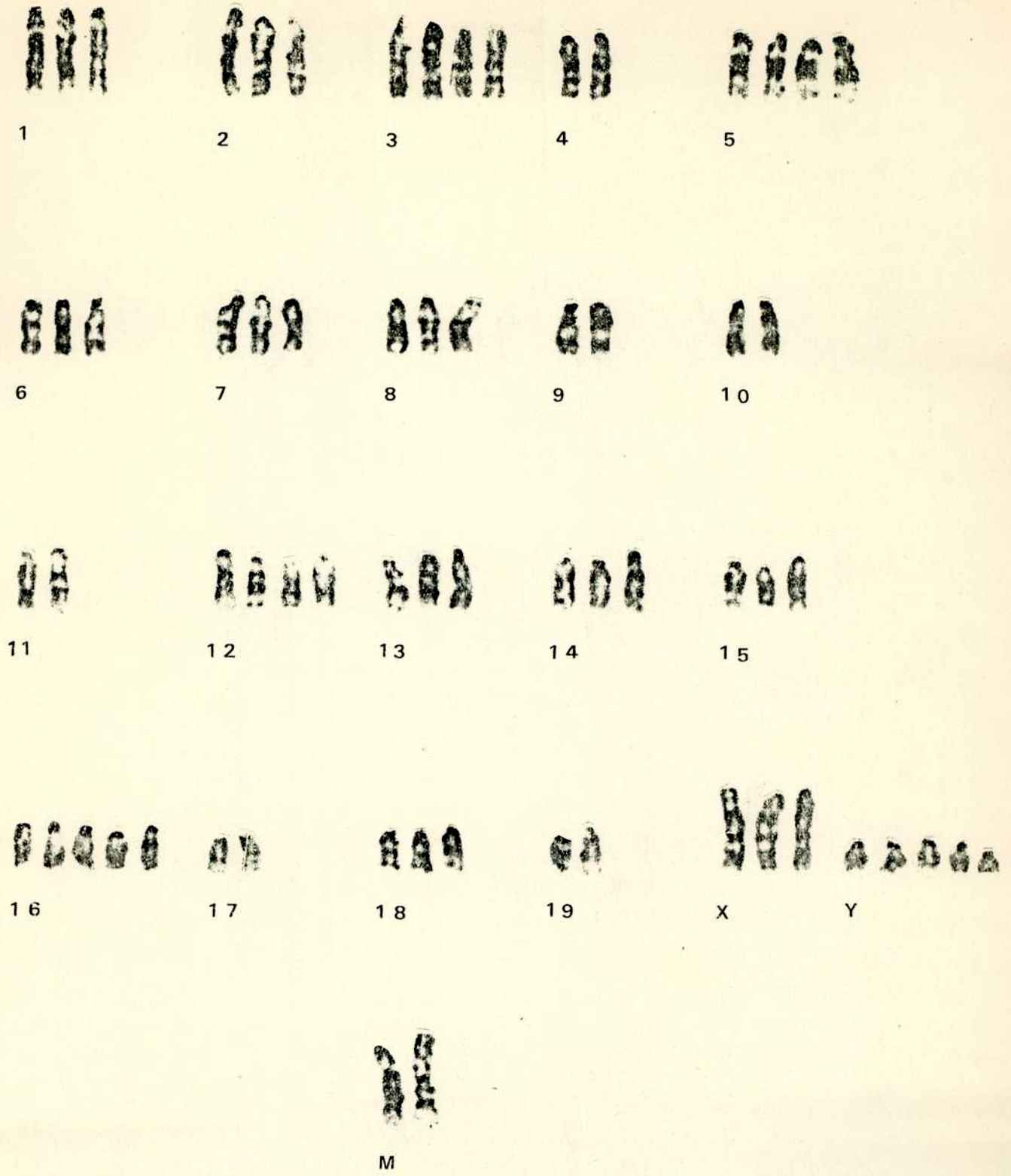


FIGURA 12: Cariotipo bandeado (Bandas G) de una célula de MM3-Línea Macho (sc) donde se observa presencia de cromosomas Y.

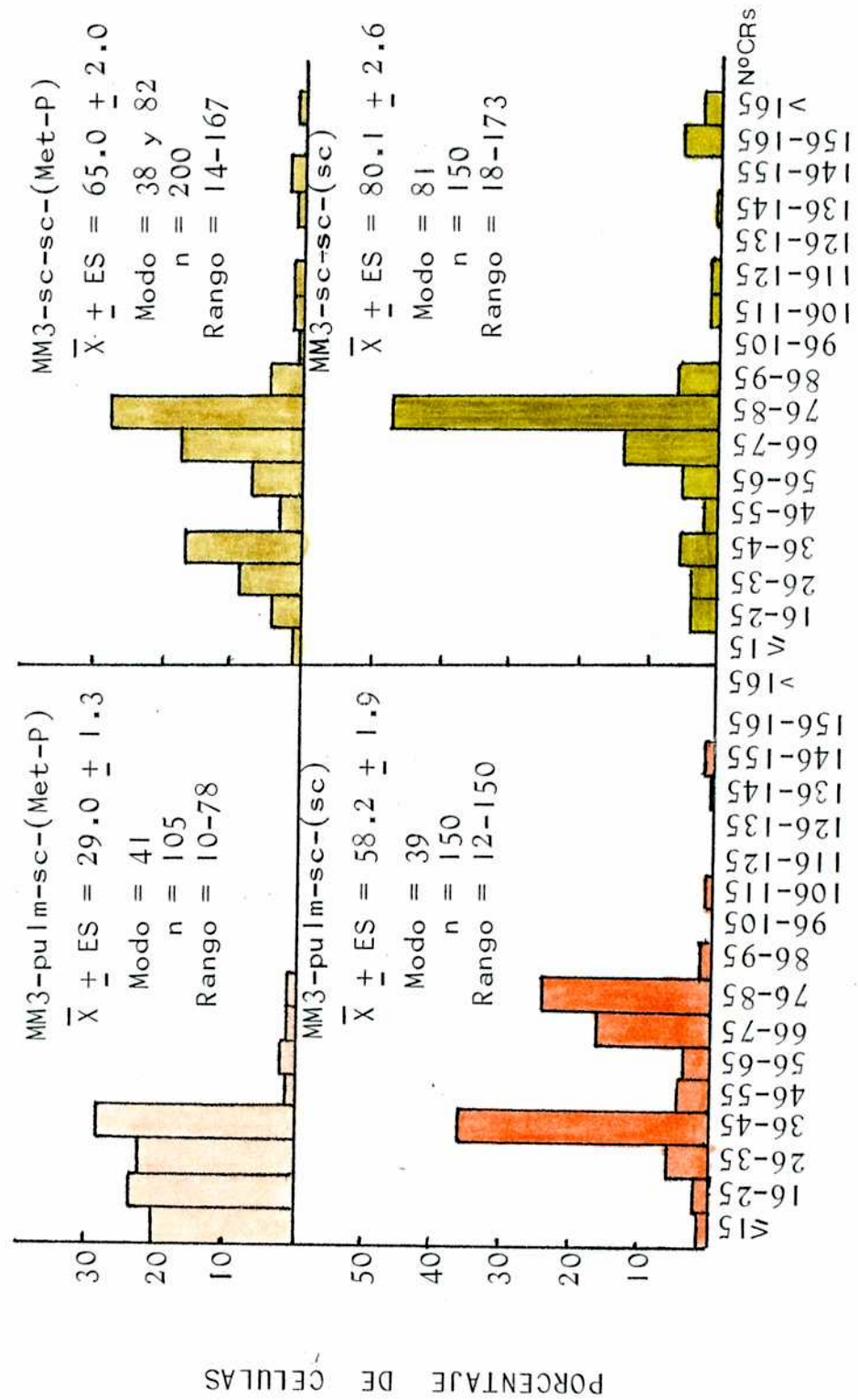


FIGURA 13: Patrones cromosómicos de las líneas MM3-pulm-sc y MM3-sc-sc.

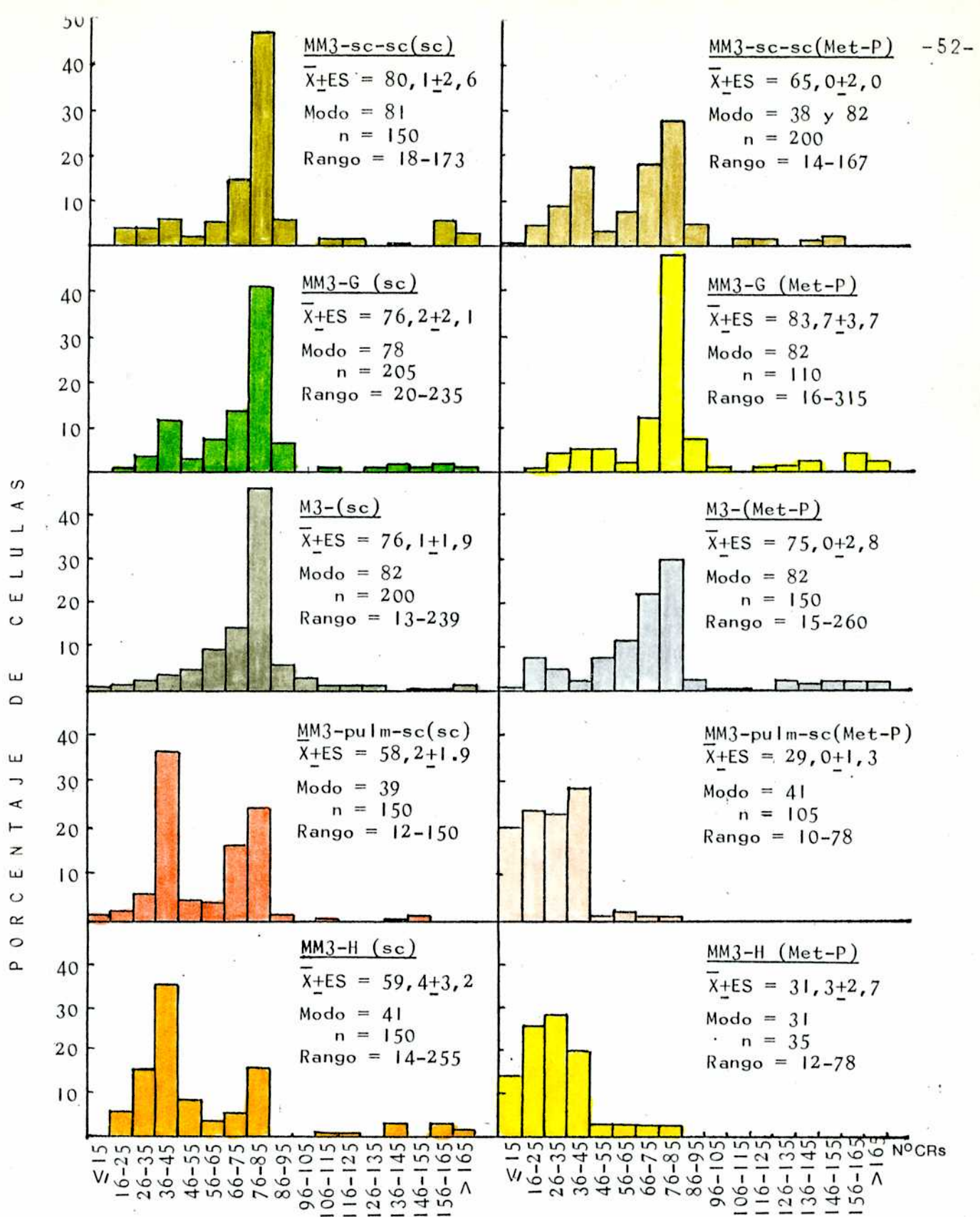


FIGURA 14: Comparación entre los patrones cromosómicos de tumores sc de las distintas líneas y los de sus respectivas metástasis en pulmón. El potencial metastásico aumenta desde el pie de la figura.

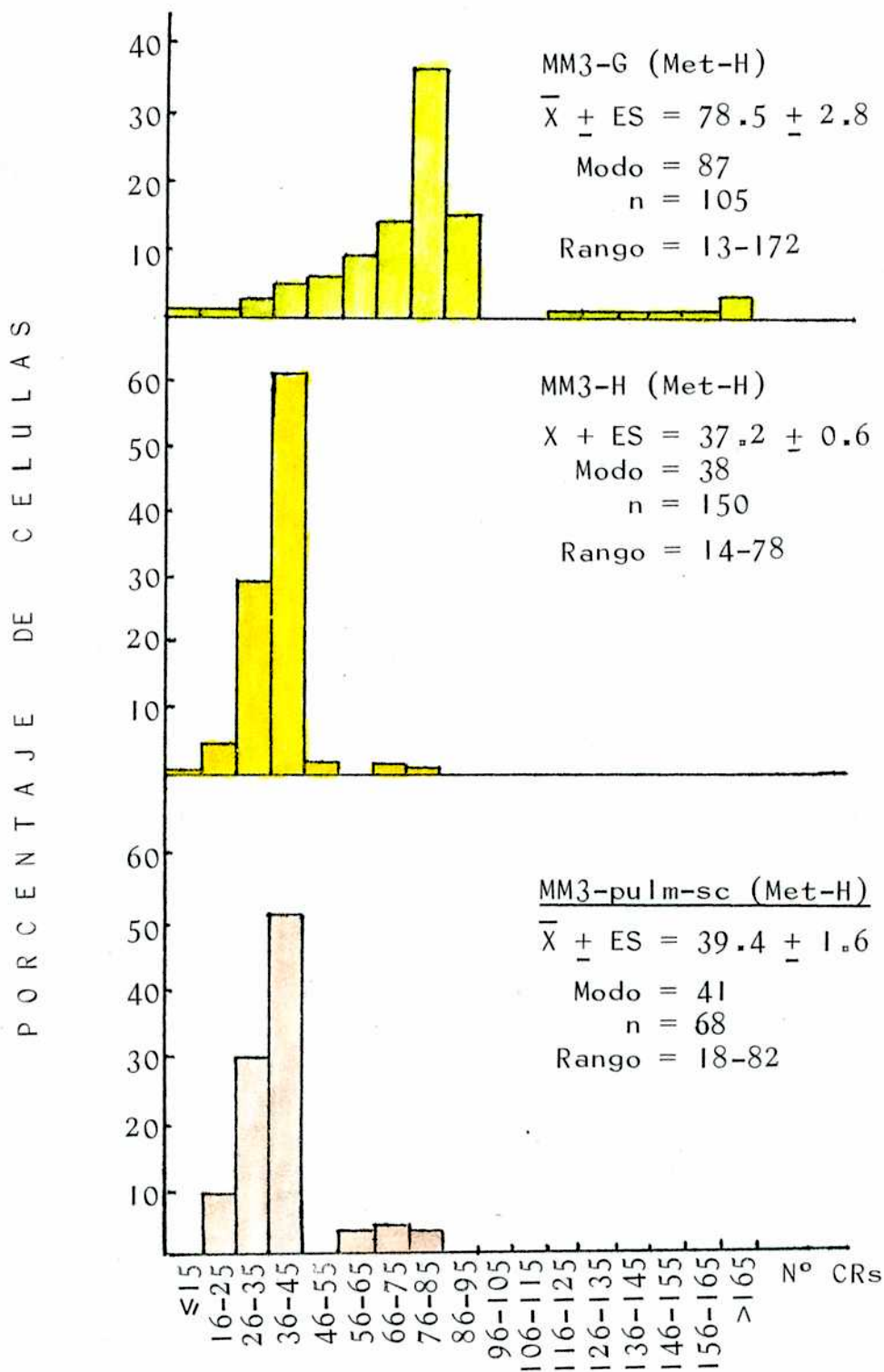


FIGURA 15: Patrones cromosómicos de metástasis en hígado de diferentes líneas.

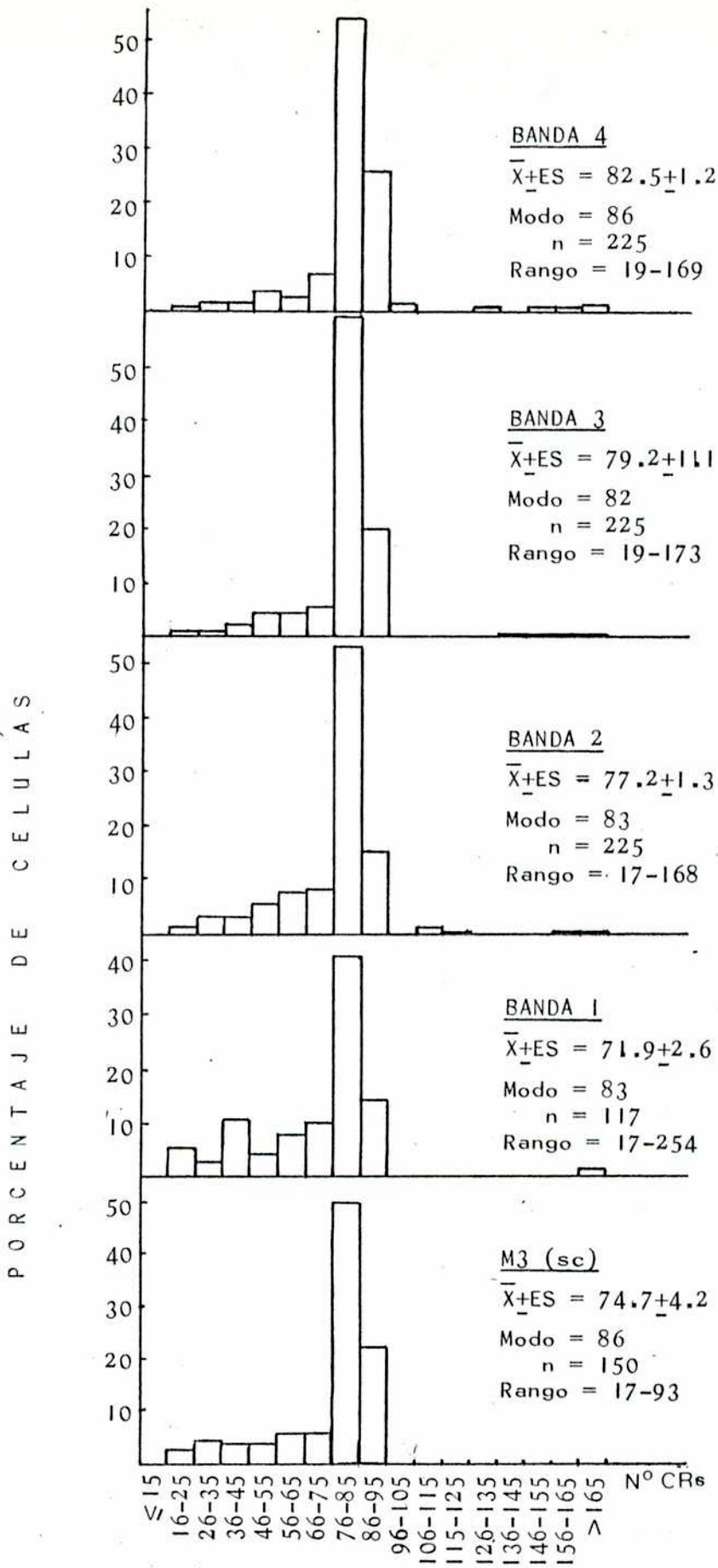


FIGURA 16: Patrones cromosómicos de M3 (sc) y de las subpoblaciones aisladas.

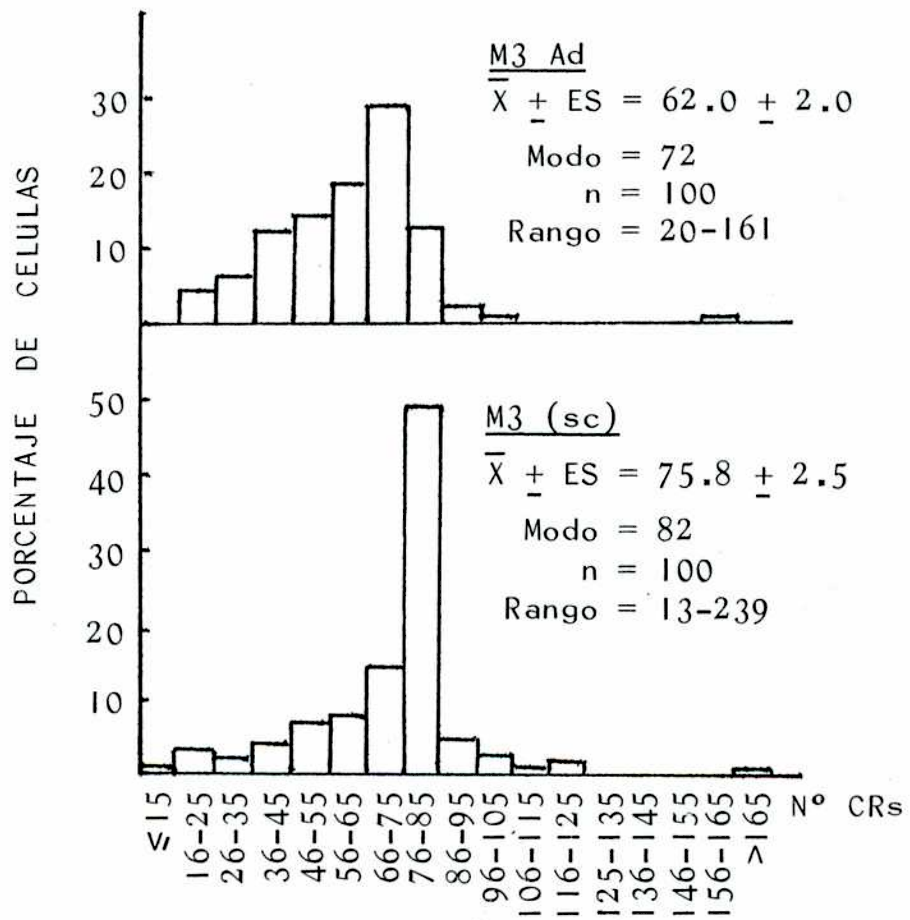


FIGURA 17: Patrones cromosómicos de M3(sc) y de M3 Ad.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los datos expuestos resulta que:

La línea M3 no exhibió diferencias significativas entre las medias del número cromosómico del tumor primario y de sus metástasis (Figura 2). Además, es moderadamente metastásica y sólo en pulmón.

Contrariamente a lo que ocurre con la M3, la línea MM3-pulm-sc, a pesar de derivar directamente de ella presenta diferencias significativas entre las medias del número cromosómico del tumor subcutáneo respecto de los de las metástasis pulmonares y hepáticas y entre las de éstas (Figura 3). Como esta línea se mantiene a través de trasplantes subcutáneos a partir de tejido metastásico de pulmón, es evidente que dicho órgano ha ejercido importantes presiones de selección sobre las células del tumor M3(sc). Efectivamente, se observa:

Incidencia de metástasis pulmonares:

MM3-pulm-sc: 95%

M3: 40%

Número de nódulos/pulmón:

MM3-pulm-sc: más de 20

M3: 6

Además, el 15,5% de los ratones presentan metástasis hepáticas.

La media del número cromosómico de las metástasis pulmonares de M3 que era significativamente mayor, fue acercándose a la del tumor primario y así se mantiene desde entonces. A través del tiempo las diferentes subpoblaciones celulares que conforman el tumor subcutáneo, habrían alcanzado un estado de equilibrio (Fidler, I. J., et al., 1982; Poste, G., 1982; Cifone, M.A., et al., 1981), que se vio reflejado en el perfil cromosómico de las metástasis.

Al igual que para la M3, la línea MM3-pulm-sc presenta, a través del tiempo, modificaciones en la composición de su población celular. En efecto, la línea MM3-pulm-sc, desde sus etapas iniciales y durante un largo período exhibió una incidencia del 95% de metástasis pulmonares con alto número de nódulos por pulmón; el perfil cromosómico de las células del tumor primario y de las metástasis presentaba el 85% de las células en la región diploide. La pérdida considerable en la capacidad metastatizante que se produjo con el tiempo se acompañó con la aparición de subpoblaciones tetraploides e hipotetraploides en detrimento de parte de las diploides, llegando a exhibir un perfil estable, que se muestra en la Figura 3. En este caso, la presión de selección se hizo a favor de subpoblaciones celulares menos metastásicas. Aquí cabe destacar que lo encontrado por nosotros es coincidente con lo observado en la clínica y en otros modelos experimentales, en que:

- tumores con la combinación diploide-tetraploide son más estables y menos agresivos. (Zetterberg, A., et al., 1984).
- no siempre se seleccionan células con mayor potencial metastásico sino también con igual y aún menor capacidad metastatizante (Cifone, M.A., et al., 1981; Fidler, I. J., et al., 1982).

La línea MM3-sc-sc (Figura 4), presenta diferentes patrones y medias del número cromosómico entre tumor subcutáneo y metástasis. Esta línea se mantiene constante a través del tiempo, desde el punto de vista cromosómico y fenotípico, probablemente debido a su mantenimiento mediante trasplantes a partir de tejido subcutáneo. Esta línea deriva, como todas las demás de la M3, pero lo hace a través de MM3-pulm-sc, ya seleccionada mediante sucesivos pasajes por pulmón.

Comparando la línea MM3-sc-sc con la que le da

origen, la primera muestra un mayor porcentaje de células en la región tetraploide mientras que en MM3-pulm-sc es más importante la componente a nivel diploide. Las medias del número cromosómico son diferentes para subcutáneos y metástasis pero para estas últimas, en ambas líneas, se nota un importante corrimiento hacia la izquierda.

A partir de trasplantes de metástasis en ganglios drenantes de la MM3-sc-sc se origina la línea MM3-G, que no difiere cromosómicamente de la que le dio origen (Figura 5). Las metástasis en ganglios drenantes (Figuras 6 y 7) presentan patrones y medias del número cromosómico de lo más variados. Se podría suponer que aquí deben intervenir factores inmunológicos y liberación de linfocinas que seleccionan poblaciones con distintas características cromosómicas. Este hecho apoyaría más bien la teoría del "suelo" dado que es evidente que las células del ganglio pueden modificar o seleccionar preferentemente distintas poblaciones entre las células tumorales que lo invaden. Se confirmaría esto, también, para las metástasis en bazo, otro órgano inmunocompetente, en que difieren significativamente el perfil y la media del número cromosómico con los del tumor primario y metástasis pulmonares y hepáticas que, por otro lado, no difieren entre ellos (Figura 8).

Derivada de la línea MM3-pulm-sc, a través de trasplante de tejido de metástasis hepática, surgió la línea MM3-H. Los tumores subcutáneos de esta línea y de la que le dio origen no difieren cromosómicamente (Figura 9). En ambos existe preponderancia de la región diploide, si bien hay una componente importante a nivel tetraploide que casi desaparece para las metástasis hepáticas en las que, alrededor del 90% de las células reside en la región hipodiploide/diploide. Cabe destacar que en el hígado normal de la mayoría de los mamíferos

adultos hay sólo un 10% de hepatocitos diploides, siendo el resto poliploides, principalmente tetraploides. Esto reflejaría, fisiológicamente, grados crecientes de diferenciación celular y la necesidad de hepatocitos diferenciados para grandes cantidades de muchos productos génicos diferentes para cumplir el rol metabólico multifuncional del hígado. Por ejemplo, durante las tres primeras semanas de vida los hepatocitos de rata son exclusivamente diploides y ahí comienza el proceso de poliploidización con la aparición sucesiva de clases principalmente tetraploides. Durante la transformación maligna químicamente inducida, el hígado de rata incrementa fuertemente la cantidad relativa de células diploides en detrimento de las tetraploides que quedan en un muy bajo porcentaje. Como la poliploidización se sabe que es un proceso irreversible, entonces cabe deducir que hay una selección a favor de células diploides, o sea menos diferenciadas, lo que dotaría al tumor con una mayor capacidad proliferativa (Saeter, G., et al., 1988). Esto es lo que observamos en las metástasis hepáticas de esta línea, que ya provienen de un tumor primario en que gran parte de las células residen en la región diploide.

La Figura 10 muestra los distintos perfiles cromosómicos de las metástasis en pulmón y en ganglios drenantes de la MM3-H que, a diferencia del comportamiento en hígado, no presentan esa prevalencia hacia diploidía.

Esta línea MM3-H, con el tiempo fue perdiendo su potencial metastatizante.

Respecto al sexo de los portadores de tumor, comparando la MM3-Línea Macho con su paralela en hembras (MM3-pulm-sc), se notan importantes diferencias: el tumor primario tiene un menor tiempo de latencia, un crecimiento más rápido, un mucho menor tiempo de sobrevivencia de sus portadores, pero una baja incidencia metastásica, sólo en pulmón. A pesar de que los perfiles cromosómicos del tu

mor subcutáneo en ambas líneas exhiben más del 30% de sus células en nivel diploide y hay otro pico importante tetraploide, las medias de los números cromosómicos difieren significativamente. Pero el mayor aporte del estudio de MM3-Línea Macho fue la demostración de la presencia de cromosomas Y en los tumores, lo que evidencia fusión celular heterocariótica.

La observación, aunque en un muy bajo porcentaje, de núcleos endomitóticos, metafases exhibiendo endoreduplicación, el hallazgo de fusión celular heterocariótica, y la probable existencia también de fusión homocariótica, indican que éstos serían junto con posterior segregación selectiva de cromosomas, los mecanismos que explicarían la aneuploidía y la gran variabilidad fenotípica de las diferentes líneas tumorales de este modelo.

En estos tumores experimentales son raras las translocaciones robertsonianas ya que alrededor del 99% de los cromosomas son acrocéntricos. Esto se corresponde con observaciones en tumores humanos. (Hecht, F., et al., 1988).

Concluyendo, pudimos demostrar:


- (1) la heterogeneidad de las células del tumor M3 que dio origen a las demás líneas. En efecto, se pudieron seleccionar a partir de dicho tumor subpoblaciones celulares que difieren en morfología y densidad celulares, tiempo de latencia, tasa de crecimiento, capacidad metastásica y de colonización en pulmón, tiempo de supervivencia de los portadores de tumor y distribución del número cromosómico;
- (2) que no siempre coinciden los perfiles cromosómicos de los tumores primarios y de sus respectivas metástasis, en este modelo experimental, a pesar de que todas las líneas derivan de un tumor que no muestra diferencias significativas con sus metástasis;

- (3) que hay un perfil cromosómico particularmente benigno y otro más maligno coincidiendo el primero con la combinación diploide-tetraploide, y el segundo, con niveles más altos de ploidía siendo los tumores más agresivos los que tienen el mayor porcentaje de sus células en la región triploide-hipotetraploide;
- (4) que puede haber variaciones en el patrón cromosómico durante las primeras etapas de los sucesivos trasplantes tumorales, hasta equilibrarse con el tiempo;
- (5) que los distintos órganos sitios de metástasis, imprimen sus características sobre las subpoblaciones que los invaden, siendo los órganos inmunocompetentes los que tienen mayor influencia sobre el perfil tumoral;
- (6) que es diferente el comportamiento cromosómico en líneas paralelas de trasplante en hembras y en machos. En estos últimos se ha podido demostrar la fusión entre células tumorales y normales del huésped que, probablemente, exista también en hembras.

Todas estas observaciones tienen una llamativa coincidencia con lo que ocurre en la clínica oncológica humana. (Spremulli, E.N., et al., 1983; Heppner, G.H., et al., 1983; Buick, R.N., 1984; Fidler, I.J., 1985; Nicolson, G.L., et al., 1986; Smith, H.S., et al., 1985; Volm, et al., 1987; Atkin, N.B., et al., 1979; Tribukait, B., et al., 1982; Wijström, H., et al., 1984; Kovacs, G., 1985).



Autora



Directora

BIBLIOGRAFIA

- Atkin, N.B., y R. Kay. (1979).
Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases.
Br. J. Cancer, 40: 210-221.
- Auer, G., E. Eriksson, E. Azavedo, T. Caspersson, y A. Wallgren. (1984).
Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans.
Cancer Res. 44: 394-396.
- Baba, H., D. Korenaga, T. Okamura, A. Saito, A. Watanabe, y K. Sugimachi. (1989).
Prognostic significance of DNA content with special reference to age in gastric cancer.
Cancer 63: 1768-1772.
- Bal de Kier Joffé, E., L.I. Puricelli, M. del C.C.Vidal, E.S. de Lustig. (1983).
Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability.
J. Exp. Clin. Cancer Res. 2: 151-160.
- Barlogie, B., B. Drewinko, J. Schumann, W. Göhde, G. Dosik, J. Latreille, D.A. Johnston, y E.J. Freireich. (1980).
Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man.
Amer. J. Med. 69: 195-203.
- Bigner, S.H., J. Mark, D.E. Bullard, M.S. Mahaley, Jr., y D.D. Bigner. (1986).
Chromosomal evolution in malignant human gliomas starts with specific and usually numerical deviations.
Cancer Genet. Cytogenet. 22: 121-135.

Buick, R.N. (1984).

Cell heterogeneity in human ovarian carcinoma.

J. Cell. Physiol. Suppl. 3: 117-122.

Cavenee, W.K., T.P. Dryja, R.A. Phillips, W.F. Benedict, R. Godbout, B.L. Gallie, A.L. Murphree, L.C. Strong y R. L. White. (1983).

Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma.

Nature 305: 779-784.

Cifone, M.A., e I.J. Fidler. (1981).

Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 6949-6952.

Colombo, L.L.; I.S. de D'Elía, H.M. Glait, A.J. Olivari, D. Klein, O.A. Varela, Y.P. de Bonaparte. (1982).

Diferente retención pulmonar de dos líneas tumorales con distinta capacidad metastásica en pulmón.

Medicina (Buenos Aires) 42: 817.

Colombo, L.L. (1986).

Tesis: Obtención y estudio in vivo e in vitro de las características de un modelo adecuado para el enfoque de la heterogeneidad celular en la biología del proceso metastásico.

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Premio a la mejor Tesis.

Conti, C.J., C.M. Aldaz, J.O'Connell, A.J.P. Klein-Szanto y T.J. Slaga (1986).

Aneuploidy, an early event in mouse skin tumor development. Carcinogenesis 7: 1845-1848.

De Baetseleier, P., E. Gorelik, Z. Eshhar, Y. Ron, S. Katzav, M. Feldman, y S. Segal. (1981).

Metastatic properties conferred on nonmetastatic tumors by hybridization of spleen B-lymphocytes with plasmacitoma cells.

J. Natl. Cancer Inst. 67: 1079-1087.

Doseva, D., K. Christov, y K. Christeva. (1984).

DNA content in reactive hyperplasia, precancerosis, and carcinomas of the oral cavity. A cytophotometric study. Acta histochem. 75: 113-119.

Erhardt, K., G. Auer, E. Björkholm, G. Forsslund, B. Moberger, C. Silfverswärd, G. Wicksell, y A.Zetterberg. (1984).

Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors.

Cancer Res. 44: 2198-2202.

Ewing, J. (1928).

Neoplastic disease, a treatise on tumors, 3rd edn. Saunders, Philadelphia, pp 77-89.

Fallenius, A.G., G.U. Auer, y J.M. Carstensen. (1988).

Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients.

Cancer 62: 331-341.

Fidler, I.J., y I.R. Hart. (1982).

Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.

Science 217: 998-1003.

Fidler, I.J., y G. Poste (1985).

The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy.

Seminars in Oncology 12: 207-221.

Fidler, I.J. (1985).

Genetic mechanisms in tumor progression, heterogeneity, and metastasis.

Jerusalem Symp. Quantum Chem. Biochem. 18: 221-231.

Frankfurt, O.S., J.L. Chin, L.S. Englander, W.R. Greco, J. Edson Pontes, y Y.M. Rustum. (1985).

Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer.

Cancer Res. 45: 1418-1423.

Friedlander, M.L., D.W. Hedley, I.W. Taylor, P. Russell, A.S. Coates y M.H.N. Tattersall. (1984).

Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer.

Cancer Res. 44: 397-400.

Fu, Y.S., J.W. Reagan, A.S. Fu, y K.E. Janiga. (1982).

Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix.

Cancer 49: 2571-2577.

Fuchs, A.G., R. Mariotto, y E.S. de Lustig. (1986).

Serum and tissue copper content in two mammary adenocarcinomas with different biological behavior.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22: 1347-1352.

Goldenberg, D.M., R.A. Pavia, y M.C. Tsao. (1974).

In vivo hybridisation of human tumour and normal hamster cells.

Nature 250: 649-651.

Gómez, D.E., E. Farías, L. Puricelli, E. Bal de Kier Joffé. (1989).

Correlación entre colágenasa tipo IV y capacidad metastásica en dos adenocarcinomas mamarios murinos.

9no Congreso Argentino y 9nas Jornadas Rioplatenses sobre Oncología Clínica. Buenos Aires, 31 de octubre al 3 de noviembre.

- Hecht, F., R. Morgan, y B.K. Hecht. (1988).
Robertsonian chromosome recombinant are rare in cancer.
Cancer Genet. Cytogenet.35: 79-81.
- Hedley, D.W., M.L. Friedlander, y I.W. Taylor. (1985).
Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded
archival material for the study of aneuploidy and its
clinical significance.
Cytometry 6: 327-333.
- Heim, S., y F. Mitelman. (1986).
Numerical chromosome aberrations in human neoplasia.
Cancer Genet. Cytogenet.22: 99-108.
- Heim, S., y F. Mitelman. (1987).
Cancer Cytogenetics. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Heppner, G.H., y B.E. Miller. (1983).
Tumor heterogeneity: biological implications and
therapeutic consequences.
Cancer Metastasis Reviews 2: 5-23.
- Holliday, R. (1989).
Chromosome error propagation and cancer.
Trends in Genetics 5: 42-45.
- Hstmark, J., T. Vigander, y E. Skaarland. (1985).
Characterization of pleural effusions by flow-cytometric
DNA analysis.
Eur. J. Respir. Dis. 66: 315-319.
- Iversen, O.E., y O.D. Laerum. (1985).
Ploidy disturbances in endometrial and ovarian
carcinomas.
Anal. Quant. Cytol. Histol. 7: 327-336.
- Jackson, L.G. (1978).
Chromosomes and cancer: current aspects.
Seminars in Oncology 5: 3-10.

- Johnson, T.S., L.J. Peters, y K.D. Williamson. (1985).
Cytogenetic, cytokinetic and morphologic features as predictors of tumor behavior and radiotherapy curability.
Treatment of Cancer in the Neck. A Clinical Symposium, March 6-8, 1985, Houston, Texas, p 11-12, 1985.
- Korenaga, D., T. Okamura, A.Saito, H. Baba, y Z. Sugimachi (1988).
DNA ploidy is linked to tumor invasion, lymph node metastasis, and prognosis in clinical gastric cancer.
Cancer 62: 309-313.
- Kovacs, G. (1985).
Premature chromosome condensation: evidence for in vivo cell fusion in human malignant tumours.
Int. J. Cancer 36: 637-641.
- Lagarde, A.E. (1986).
Sporadic somatic fusion between MDAY-D2 murine tumor cells and DBA/2 host cells: role in metastasis.
Int. J. Cancer 37: 905-910.
- Larizza, L., y V. Schirmacher. (1984).
Somatic cell fusion as a source of genetic rearrangement leading to metastatic variants.
Cancer Metastasis Reviews 3: 193-222.
- Ljungberg, B., R. Stenling, y G. Roos. (1986).
Prognostic value of deoxyribonucleic acid content in metastatic renal cell carcinoma.
J. Urol. 136: 801-804.
- Ljungberg, B., R. Stenling, y G. Roos. (1988).
Tumor spread and DNA content in human renal cell carcinoma.
Cancer Res. 48: 3165-3167.
- Melamed, M.R., Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, y T. Sharpless. (1977).
Cytology automation by flow cytometry.
Cancer Res. 37: 2806-2812.
- Míguez, M., L. Davel, y E.S. de Lustig. (1986).
Lymphocyte-induced angiogenesis: correlation with the metastatic incidence of two murine mammary adenocarcinomas.
Invasion Metastasis 6: 313-320.

Miller, F.R., D. Mc Inerney, C. Rogers, y B.E. Miller.
(1988).

Spontaneous fusion between metastatic mammary tumor
subpopulations.

J. Cell. Biochem. 36: 129-136.

Nicolson, G.L. (1984-a).

Tumor progression, oncogenes and the evolution of
metastatic phenotypic diversity.

Clin. Expl. Metastasis 2: 85-105.

Nicolson, G.L. (1984-b).

Generation of phenotypic diversity and progression in
metastatic tumor cells.

Cancer Metastasis Reviews 3: 25-42.

Nicolson, G.L. (1985).

The evolution of phenotypic diversity in metastatic
tumor cells.

Biol. Responses Cancer 4: 71-89.

Nicolson, G.L., y R. Lotan. (1986).

Preventing diversification of malignant tumor cells
during therapy.

Clin. Expl. Metastasis 4: 231-235.

Nowell, P.C. (1986).

Mechanisms of tumor progression.

Cancer Res. 46: 2203-2207.

Oshimura, M., y J.C. Barret. (1986).

Chemically induced aneuploidy in mammalian cells:
Mechanisms and biological significance in cancer.

Environ. Mutagenesis 8: 129-159.

Paget, S. (1889).

The distribution of secondary growth in cancer of the
breast.

Lancet I: 571-573.

Pereyra-Alfonso, S., y E. Bal de Kier Joffé. (1989).
Enhancement of urokinase-type plasminogen activator
activity during the growth of a murine mammary
adenocarcinoma.

Int. J. Cancer 43: 356-357.

Poste, G. (1982).

Cellular heterogeneity in malignant neoplasms and the
therapy of metastases.

Ann. New York Acad. Sci. 397: 34-48.

Puricelli, L., L.L. Colombo, E. Bal de Kier Joffé, y E.S.
de Lustig. (1984).

Invasiveness in vitro of two mammary adenocarcinomas
tumors with different metastasizing ability.

Invasion Metastasis 4: 238-246.

Saeter, G., P.E. Schwarze, J.M. Nesland, N. Juul, E.O.
Pettersen, y P.O. Seglen. (1988).

The polyploidizing growth pattern of normal rat liver
is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular
nodules and carcinomas.

Carcinogenesis 9: 939-945.

Sandberg, A.A. (1980).

The chromosomes in human cancer and leukemia.

Elsevier North Holland, Inc., New York., p. 434.

Sandberg, A.A. (1987).

Prophasing: What's in a name?

Cancer Genet. Cytogenet. 27: 181-183.

Seabright, M. (1971).

A rapid banding technique for human chromosomes.

Lancet I: 971-972.

Smets, L.A., J. Homan-Blok, A. Hart, G. de Vaan, H. Behrendt, K. Hählen, y F.J. de Waal. (1987).
Prognostic implication of hyperdiploidy as based on DNA flow cytometric measurement in childhood acute lymphocytic leukemia. A multicenter study.
Leukemia 1: 163-166.

Smith, H.S., L.A. Liotta, M.C. Hancock, S.R. Wolman, y A. J. Hackett. (1985).
Invasiveness and ploidy of human mammary carcinomas in short-term culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 1805-1809.

Spremulli, E.N., y D.L. Dexter. (1983).
Review Article. Human tumor cell heterogeneity and metastasis.
J. Clin. Oncol. 1: 496-509.

Summers, J.L., W.H. Falor, R.M. Ward, J. Fiorito, M.R. Brezler, y A. J. Abreu. (1983).
Identical genetic profiles in primary and metastatic bladder tumors.
J. Urol. 129: 827-828.

Talmadge, J.E., K. Benedict, J. Madsen, y I.J. Fidler. (1984).
Development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases.
Cancer Res. 44: 3801-3805.

Tribukait, B., H. Gustafson, y P. Esposti. (1979).
Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow-cytofluorometric DNA-analysis and its relation to histopathology and cytology.
Cancer 43: 1742-1751.

- Tribukait, B., H. Gustafson, y P.L. Esposti. (1982).
The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: a study of 100 untreated cases.
Brit. J. Urol. 54: 130-135.
- Tsutsui, T., H. Maizumi, J.A. Mc Lachlan, y J.C.Barrett. (1983).
Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis.
Cancer Res. 43: 3814-3821.
- Vig. B.K. (1983).
Review Article. Sequence of centromere separation: occurrence, possible significance, and control.
Cancer Genet. Cytogenet. 8: 249-274.
- Volm, M., J. Mattern, M. Vogt-Schaden, y K. Wayss. (1987).
Flow cytometric analysis of primary lung carcinomas and their lymph node metastases.
Anticancer Res. 7: 71-76.
- Weiss, L. (1980).
Metastasis: Differences between cancer cells in primary and secondary tumors.
Pathobiology Annual 10: 51-81.
- Wijström, H., I. Granberg-Öhman, y B. Tribukait. (1984).
Chromosomal and DNA patterns in transitional cell bladder carcinoma.
A comparative cytogenetic and flow-cytofluorometric DNA study.
Cancer 53: 1718-1723.
- Wolley, R.C., K. Schreiber, L.G. Koss, M. Karas, y A. Sherman. (1982).
DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior.
J. Natl. Cancer Inst. 69: 15-22.

Yunis, J.J. (1983).

The chromosomal basis of human neoplasia.

Science 221: 227-236

Zetterberg, A., G. Auer. (1984).

Degree of ploidy abnormality and grade of malignancy.

J. Cell. Biochem., (Suppl. 8A): 52.