

Tesis de Posgrado

Estudios biológicos, bioquímicos y genéticos de la línea IIB-MEL-J como modelo para el melanoma humano

Guerra, Liliana Noemí

1991

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:

Guerra, Liliana Noemí. (1991). Estudios biológicos, bioquímicos y genéticos de la línea IIB-MEL-J como modelo para el melanoma humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2384_Guerra.pdf

Cita tipo Chicago:

Guerra, Liliana Noemí. "Estudios biológicos, bioquímicos y genéticos de la línea IIB-MEL-J como modelo para el melanoma humano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2384_Guerra.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Registro

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**ESTUDIOS BIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS DE LA LÍNEA
IIB-MEL-J COMO MODELO PARA EL MELANOMA HUMANO.**

Autora: Lic. LILIANA GUERRA

Director: Dr. JOSE MORDOH

Codirectora: Dra. ESTELA MEDRANO

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires**

Tesis.
2384
y. 2

Vivimos una época rica en inteligencias creadoras, cuyas expresiones han de acrecentar considerablemente nuestras vidas. Aprendimos a volar y somos capaces de enviar mensajes y noticias sin dificultad alguna a los más remotos lugares del mundo, por medio de ondas eléctricas.

No obstante, la producción y distribución de bienes se halla por completo desorganizada, de manera que la mayoría ha de vivir temerosa ante la posibilidad de verse eliminada del ciclo económico y, sufrir así la falta de lo necesario. Además, los habitantes de las distintas naciones se matan entre sí a intervalos regulares, por lo que también, debido a esta causa debe sentir miedo y terror todo el que piense en el futuro.

Confío en que la posteridad lea estas afirmaciones con un sentido de justicia y la necesidad de un cambio en la situación.

Albert Einstein (1939)

A MIS PADRES
7

INTRODUCCION

Poco se sabe acerca de como es controlada la diferenciación, esto es, la producción de diferentes jerarquías celulares en el organismo o en un dado sistema.

En algunos sistemas la diferenciación es un camino de varios pasos, en donde algunos o todos son irreversibles. Así en el caso de irreversibilidad las células estarían determinadas hacia un dado estadio de diferenciación del cual solo saldrían para pasar al siguiente.

En muchos de los tejidos del cuerpo que se renuevan y poseen crecimiento autólogo, un limitado número de las células presentes son las que poseen la capacidad de repoblar el tejido. Ellas son las CELULAS MADRES, llamadas indiferenciadas o troncales, las cuales son capaces de iniciar un clon de descendientes compuesto por células funcionalmente diferenciadas, y al mismo tiempo mantienen su propia frecuencia de proliferación constante. Este es el caso típico de la piel donde una célula madre epitelial en la capa basal da lugar a células queratinizadas que se encuentran en la superficie (ref. 1). En el caso de la piel el tiempo de recambio de la epidermis es de 28 días.

Es importante señalar que la célula indiferenciada o madre puede ser pluripotencial, en el caso en que varios tipos de células diferenciadas se obtengan a partir de ella, o unipotencial en el caso en que se origine un solo tipo de célula diferenciada.

1.-DIFERENCIACION CELULAR DEL MELANOCITO

La piel consiste en dos tejidos principales: la epidermis, la cual tiene origen ectodérmico, y la dermis que deriva del mesodermo. Dispersas entre las células de la epidermis están las células del sistema dendrítico o pigmentado, llamadas en general MELANOCITOS (fig.1).

Los melanocitos migran desde la cresta neural durante las primeras etapas de la vida embrionaria, (fig.2). Las células que migran justo por debajo del ectodermo darán lugar a las células pigmentadas de la piel, mientras que las otras que van por el camino profundo son las precursoras del tejido nervioso y de las células pigmentadas de los órganos internos. En el ratón, al día 7 del desarrollo, los melanoblastos prirmordiales se alinean como se sugiere en la figura 2 y entre los días 8 y 12 migran y proliferan rápidamente (ref. 2). Los diferentes destinos de las células de la cresta neural están gobernados no por diferencias en las características iniciales de las mismas, sino simplemente por las diferentes posiciones iniciales que poseen dichas células.

En líneas generales, se puede decir que la célula madre migra a gran distancia de donde es originada hasta el lugar donde va a llevar a cabo su función en el adulto, y en ese lugar (microambiente) ocurre la diferenciación. La proliferación y no la diferenciación, coincide con este

movimiento de migración, así, el número de células madres aumenta por lo menos 100 veces durante la migración.

En el caso de los melanocitos, una vez en la epidermis, ellos poseen como función principal la producción de gránulos pigmentados de melanina, los cuales son dados a los queratinocitos.

Los melanocitos están situados principalmente en la capa basal de la epidermis como lo muestra la figura 1. Hay considerable evidencia que muestra que los melanocitos activos estarían confinados a la capa basal y que luego se moverían junto con los queratinocitos a la superficie de la piel.

Es interesante hacer notar que las células dendríticas no se encuentran unidas a sus vecinas por desmosomas y, por lo tanto, tienen una gran facilidad para migrar (ref.3). Se las llama dendríticas pues desde su cuerpo ellas extienden numerosas dendritas las cuales se ramifican entre las células epidérmicas, y es a través de estas dendritas que el pigmento que producen es transmitido a los queratinocitos.

En las áreas blancas las células dendríticas también están presentes, pero aunque son anatómicamente iguales no fabrican el pigmento. Se ha visto que el gen que codifica la enzima tirosinasa en los melanocitos amelanóticos está intacto y, que también su transcripción es perfecta, pero sin embargo no hay actividad de la enzima en dichas células, sugiriendo que el mecanismo que conduce a la ausencia de

actividad de la tirosinasa sería post-transcripcional, aunque todavía no se conoce cual es (ref. 4,5,6).

La biosíntesis de la melanina es iniciada por la oxidación de la tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA) por acción de la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1), siendo este primer paso seguido por oxidaciones sucesivas que dan lugar a la formación de dopacromo (fig 3). Como se puede ver en dicha figura, la enzima tirosinasa cataliza estas primeras reacciones, siendo la L-dopa el cofactor de las mismas. Las reacciones remanentes que conducen a la formación del polímero de melanina ocurrirían espontáneamente (ref. 7). El estudio de la síntesis de la melanina se ha llevado a cabo en melanocitos adultos, pues el precursor del melanocito en la piel aún no ha sido identificado (ref.8).

La identificación de la célula precursora del melanocito en la piel ha sido difícil puesto que no hay un marcador inmunológico o bioquímico específico para dicha célula epitelial. Además como generalmente las células epiteliales son lentas en el ciclado, no se marcan fácilmente con un pulso de timidina. En el adulto los melanocitos se dividen infrecuentemente, tal vez una vez al año (ref.9). Tradicionalmente toda célula que se marca con timidina en el epitelio se llama célula troncal (ref. 10).

La célula madre está por definición presente en todos los tejidos que tienen la capacidad de renovarse y juega un papel esencial en la homeostasis y tumorigénesis (ref 10).

El crecimiento y renovación de los tejidos del cuerpo está homeostáticamente controlado tal que cada componente se mantiene en su nicho. La inhibición por contacto frena el crecimiento indiscriminado. Los diferentes tipos celulares diferenciados deben mantenerse no solo en cantidad relativa correcta, sino también en posiciones relativas correctas.

El genoma de la célula madre se mantiene durante la evolución del tejido, pues las células estarían en nichos en los cuales permanecen en G₀. Algunas de estas células que están en G₀ salen a G₁ y entonces se produce la diferenciación o la proliferación. Para mantener el genoma tal cual se requiere que la célula permanezca por largos períodos en G₀. Bajo condiciones normales la célula madre finalmente se diferencia y se pierde como tal (ref. 11).

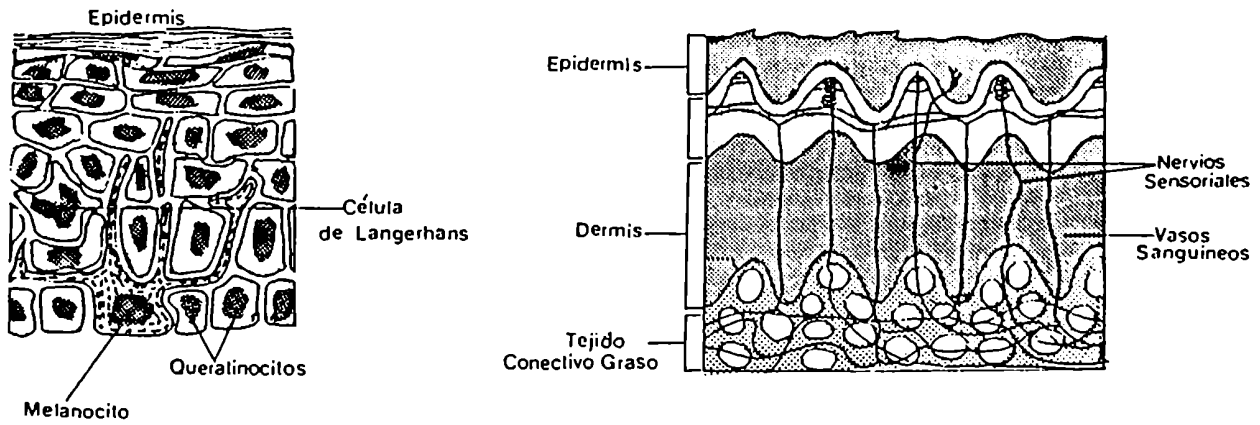


Figura 1.- Composición de la piel y epidermis (ref. 1)

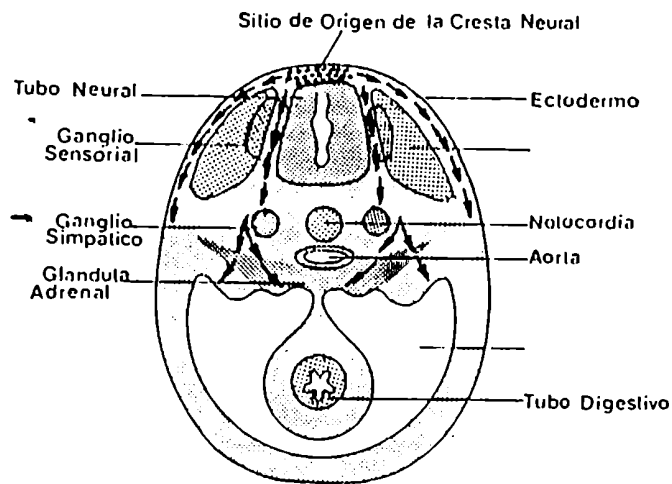


Figura 2.- Los caminos principales de migración de las células de la cresta neural en un embrión de pollo (ref. 1).

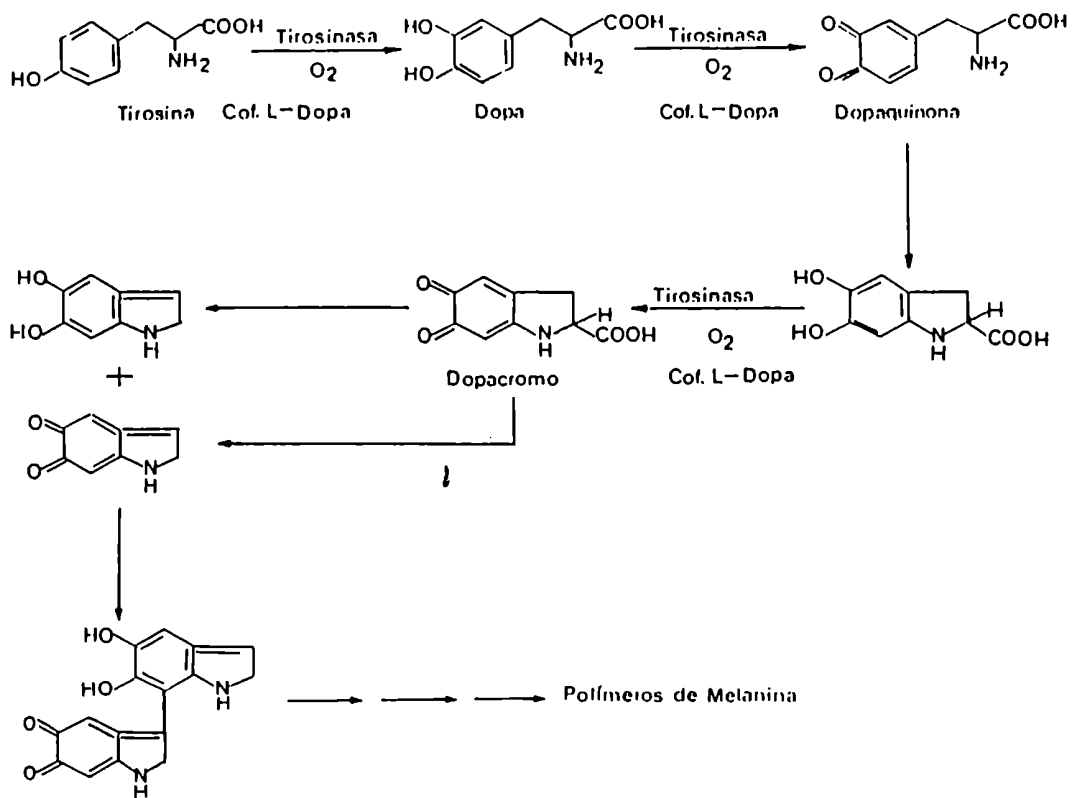


Figura 3.- Reacciones catalizadas por la tirosinasa en la biosíntesis de la melanina (de *Seminars in Oncology*, 15(6): 578-588, 1988).

2.-DIFERENCIACION CELULAR EN EL TUMOR

1 x 10¹⁶ divisiones celulares ocurren en el cuerpo humano durante al curso del tiempo de vida. Las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente de tiempo en tiempo, probablemente sean del orden de 1 x 10⁻⁶ por gen por célula en división, así, durante el tiempo de vida de un individuo un gen podría sufrir una mutación en cerca de 1 x 10¹⁰ ocasiones separadas. Además de estas mutaciones, las células somáticas muchas veces pueden proliferar fuera de los controles normales. Desde este punto de vista, el problema del cancer no resulta ser porqué ocurre, sino porqué ocurre tan infrecuentemente (Ref. 1).

Quando una mutación ocurre, para establecer un clon que persista la mutación debe originarse en una célula madre. De forma general, el cancer se desarrolla a partir de clones de células mutadas. Sin embargo, este hecho no es en si peligroso, puesto que la célula mutada puede simplemente proliferar más rapido que la normal en su propio nicho, y generar un tumor que se puede remover facilmente por cirugía. De tal forma, para ser peligrosa la célula madre mutada debe poder violar las restricciones de territorio que mantienen a las células normales en su propio lugar. O sea, ellas deben invadir y metastatizar. Así, los tumores malignos están compuestos de células que no solamente desafían los controles normales de la proliferación sino

también los controles normales de la posición.

Hace varios años se mostró que el melanoma es un sistema interesante para el estudio de la actividad metastásica, ultimamente se ha visto que el proceso de metástasis es secuencial y selectivo. Las células tumorales deben entrar en circulación, sobrevivir en la corriente sanguínea hasta llegar al órgano blanco, ahí extravasarse y luego de invadir el tejido proliferar en el sitio secundario (ref 12).

Aunque la primera descripción del melanoma fue en 1787, cómo ocurre la inducción y la progresión de la enfermedad es un problema biológico que todavía no ha sido elucidado (ref. 13).

Ya en 1964 Pierce había descrito la heterogeneidad que existía en el melanoma, heterogeneidad debida a la presencia de diferentes subpoblaciones celulares en el tumor (ref. 14). Los cambios en el comportamiento tumoral pueden ser descritos como una selección progresiva de las diferentes subpoblaciones del tumor. Así, diversas subpoblaciones se obtienen a partir del foco original de iniciación y, así mismo tumores de origen monoclonal se vuelven heterogéneos.

Diversas subpoblaciones pueden ser generadas por diferentes mecanismos, uno de ellos puede ser la alteración de la estructura química del DNA (la producción de una mutación), otro la fusión somática y por fin la diferenciación celular (ref. 14). No ha sido descrito hasta ahora un mecanismo general para explicar la interacción

entre las subpoblaciones de un tumor. La forma de interactuar entre las subpoblaciones depende tanto del potencial celular, como de la circunstancia en la cual se encuentran esas células. Las interacciones complican el estudio de la heterogeneidad tumoral puesto que mientras la heterogeneidad es detectada por aislamiento de estas subpoblaciones, las propiedades del tumor no pueden ser deducidas por una simple suma de las partes (ref. 15, 16). Pero el reconocimiento de dicha heterogeneidad celular es básica en cualquier teoría de desarrollo neoplásico o tratamiento clínico.

Fidler ha observado que las metástasis estarían formadas por subpoblaciones que son diferentes entre si en cuanto a su capacidad proliferativa y metastásica (ref. 17). Esta diversidad puede ser rápidamente generada aunque el tumor en su segundo sitio se origine de una sola célula (ref.18). Esta célula a partir de la cual se origina el tumor se la puede llamar célula madre (fig. 4). El concepto de célula madre surge de que para que ocurra el tumor basta que una célula se transforme. Por otro lado cuando ocurre la metástasis solo pocas células tienen la capacidad de penetrar los vasos sanguíneos o linfáticos, circular por ellos evadiendo el sistema inmune y luego de ello crecer en el sitio de penetración. Estas células serían las células madres o troncales(ref. 19).

Por otro lado se ha visto que las metástasis humanas de

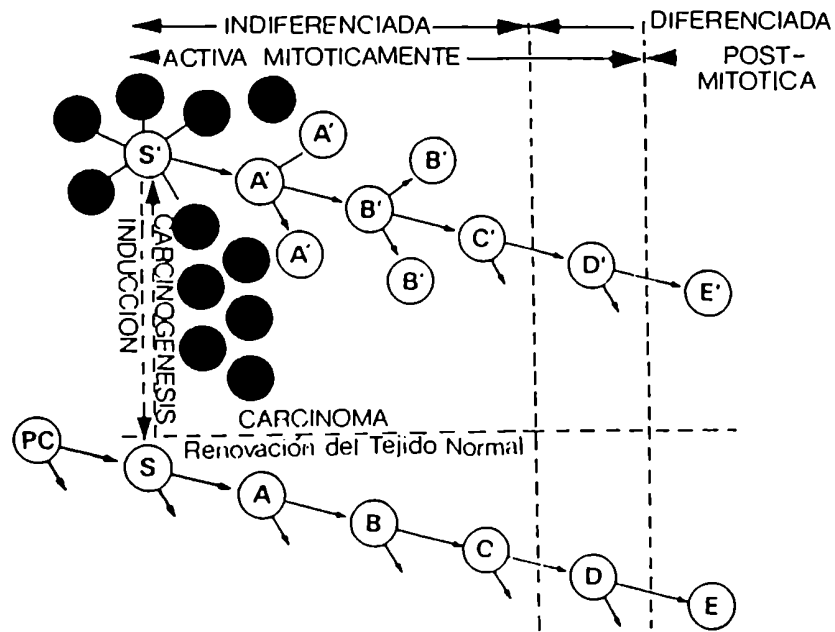


Figura 4.- Representación esquemática del linaje de células normales que se obtiene a partir de una células madre normal (S) y,de las hijas indiferenciadas y diferenciadas a partir de una célula madre maligna (S').

PC= célula precursora

A-E= descendientes de la célula madre cuando ocurre la renovación del tejido

A'-E'= descendientes de la célula madre maligna

(de Cancer Res.,48: 1996-2004, 1988)

melanoma difieren en cuanto a la expresión de antígenos aún cuando provengan de un mismo paciente (ref. 20). El grupo de Houghton ha dividido a las células de melanoma en tres estadios de diferenciación: temprano, intermedio y tardío, de acuerdo con la morfología, pigmentación y actividad de tirosinasa (ref. 21). En nuestro estudio, nosotros introdujimos la proliferación celular, como un nuevo parámetro, para determinar que células corresponden a cada estadio.

3.-ESTABLECIMIENTO DE LINEAS CELULARES

Se pueden definir tres tipos de Cultivos de tejidos: los llamados **CULTIVOS DE TEJIDOS** propiamente dichos, donde son los tejidos en pequeños pedazos, como explantos, a los que se intenta crecer; en este caso la organizacion tisular se pierde, pero las células constituyentes emergen en una zona de sobrecrecimiento donde sus actividades pueden ser directamente observadas. Por otro lado, el **CULTIVO DE ORGANOS**, donde el desarrollo embriológico y el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales son el objetivo principal, por lo cual la organización normal del tejido es lo más importante. Finalmente, los **CULTIVOS CELULARES** donde el tejido se rompe y el crecimiento de las poblaciones que existen dentro del tejido son el interés dominante, generalmente en este tipo de cultivo las células se desdiferencian y se vuelven parecidas con el tiempo (ref. 22). La gran ventaja desde el punto de vista experimental de trabajar con este tipo de sistemas, es que las células y los tejidos se encuentran aislados y lejos de las influencias que otros tejidos puedan ejercer sobre ellos.

OBJETIVOS

El melanoma ha resultado ser un buen modelo para el estudio de la diferenciación celular (ref 23, 24), ya que tiene marcadores fácilmente accesibles como son la producción de melanina y la actividad de las enzimas involucradas en la vía de obtención de la melanina.

El establecimiento de líneas celulares para estudiar la biología del cancer es tremendamente útil. El análisis de las mismas ha permitido obtener gran información sobre los antígenos asociados a la diferenciación (ref. 25), lo cual posibilita un mejor conocimiento del sistema y como consecuencia un mejor ataque al problema del crecimiento tumoral.

En nuestro trabajo nosotros tuvimos como objetivo estudiar el camino de la diferenciación del melanoma, y verificar la existencia de una subpoblación que tenga características de contener las células madres del tumor.

Aproximación al problema:

Existen diferentes vías para tratar de entender un fenómeno complejo como es la diferenciación celular. Dado que nuestro objetivo es encontrar una célula que tenga las características de CELULA MADRE dentro del tumor, utilizaremos como modelo una línea celular que establezcamos en nuestro laboratorio bajo condiciones que nosotros estipulemos. Es importante hacer notar que las células indiferenciadas son menos exigentes en sus requerimientos nutritivos que la mayor parte de las células diferenciadas,

por lo que son seleccionadas preferentemente en el medio adecuado, esto es, cuando se intentan crecer en cultivo. Así, los estudios de la diferenciación de células en cultivo son los estudios de un modelo del estado natural y no del estado natural mismo (ref 26).

Utilizaremos un enfoque reduccionista para estudiar la diferenciación, el cual consiste en dividir al problema global en varios problemas menores, que serán: a) proliferación, b) generación de subpoblaciones unas a partir de otras, c) pigmentación.

Los parámetros en que nos basaremos serán los conocidos y ya anteriormente usados como son la pigmentación y la morfología (ref. 21) y, algunos que se usarán por primera vez como criterio para estudiar el camino de diferenciación en el melanoma como son la proliferación y la generación de subpoblaciones diferenciadas a partir de subpoblaciones indiferenciadas (ref. 27).

Definimos entonces que las células madres del tumor serán aquellas que tengan una gran capacidad de proliferar y puedan generar a las otras células que existen en el tumor, independientemente de su morfología o pigmentación.

MATERIALES Y METODOS

1.- OBTENCION DE CELULAS TUMORALES

1.a.- CULTIVOS PRIMARIOS

En el caso de las células tumorales que se usaron para los ensayos de crecimiento in vitro, todas las células provenían de metástasis ganglionares. El método utilizado para el crecimiento se describe en Resultados.

En el caso de la línea IIB-MEL-J, el tumor provino de una metástasis pulmonar de un paciente hombre caucasiano, de 64 años, que desarrolló un melanoma primario en la espalda en noviembre de 1985. Luego de la extirpación quirúrgica del tumor, el paciente se mantuvo en observación hasta octubre de 1987, cuando desarrolló la metástasis pulmonar de la cual derivó la línea celular. En este caso, el tumor fue disgregado con tijera y bisturí, luego se realizó un tratamiento con 0,14% colagenasa (tipo I, Sigma Co) y 0,03% DNAsa (Sigma Co) en medio Dulbecco/F-12 (1:1) (2ml por gramo de tejido), suplementado con 20nM selenito de sodio, 100 μ M ácido ascórbico, 0,3mg/ml de galactosa, 0,15mg/ml de piruvato de sodio y FBS (suero fetal bovino FLOW) al 10%. Después de dos horas a 37C, la suspensión fue aspirada y disociada por sucesivos pasajes por pipeta Pasteur. Los agregados celulares remanentes se dejaron decantar y el sobrenadante fue centrifugado a 400g por 5 minutos. El precipitado fue resuspendido en Dulbecco/F-12 suplementado como se describió anteriormente más el agregado de 5 μ g/ml de Insulina (Sigma Co), 5 μ g/ml de Transferrina (Sigma Co) y 5ng/ml de EGF (Collaborative Research), a este medio se lo denominó Medio Completo (ref. 28).

1.b.- PROCESAMIENTO DEL TEJIDO TUMORAL.

1.b.i.- Disgregación mecánica:

Las muestras se obtienen bajo condiciones estériles y se recogen en medio Hank's, al cual se le agrega EDTA al 0,1%. Se corta el tumor en pequeños fragmentos y se lo deja 30 a

60 minutos con agitación continua a 37C. La suspensión celular así obtenida se centrifuga a 400g, las células se lavan con PBS y se congelan. En todos los casos el congelamiento (ref. 29) se realiza en medio con 10% DMSO y 10% de suero fetal bovino (FLOW Co).

1.b.ii.- Disgregación enzimática:

Una vez realizada la disgregación mecánica, lo que queda del tumor es sometido a una disgregación enzimática con colagenasa I (Sigma Co) al 0,14% y, DNAsa (Sigma Co) al 0,03%, se permite la acción de las mismas por 2 horas a 37C en atmósfera controlada a pH = 7 y pCO₂ = 5% (ref. 30). Estas células se congelan o se usan en el momento. En todos los casos, el congelamiento se realiza en medio con 10% DMSO y 10% de suero fetal bovino(FLOW Co).

1.c.- CORTES HISTOLOGICOS

Para estudiar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos, se realizaron cortes histológicos de biopsias tumorales de metástasis ganglionares y dérmicas de melanoma, así como de melanomas primarios. El trozo de tumor se fijó con formaldehído al 4% en PBS por 18 horas, luego de deshidratar el tejido y realizar los baños de parafina necesarios se hace la inclusion obteniendose el taco listo para el corte, utilizando un micrótopo se realizan cortes de 5 μ m de espesor.

2.- UTILIZACION DE GRADIENTES PARA LA PURIFICACION DE CELULAS TUMORALES Y DE LAS SUBPOBLACIONES TUMORALES

2.a.- GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE

2.a.i.- Línea IIB-MEL-J:

En el caso de la línea IIB-MEL-J, 10ml de la suspensión celular, obtenida como fue descrito anteriormente, fue sembrada en la cima de un colchón de Ficoll-Hypaque obtenido

luego de mezclar 7,2ml de Ficoll (al 8%) con 3ml de Hypaque (al 33%) y se centrifugó a 800g por 30 minutos (ref. 31). La interfase conteniendo las células tumorales fue aspirada, diluida con medio completo y centrifugada a 400g por 10 minutos, las células recuperadas tienen un 90% de viabilidad (utilizando como criterio de viabilidad la exclusión al azul tripán, ref. 32). El precipitado fue resuspendido en medio completo y las células fueron sembradas en un frasco de 25 cm² (Corning). Las células se permiten crecer en una estufa gaseada con humedad controlada, y un porcentaje aire-CO₂ (95%-5%), pH=7 y temperatura de 37C.

2.a.ii.- Anticuerpos monoclonales:

En el caso de las células tumorales metastásicas usadas para la obtención de los anticuerpos monoclonales, se descongelan células que provienen de la disgregación enzimática o mecánica, y se las purifica por gradiente de Ficoll-Hypaque, sembrándose $1,5 \times 10^6$ células por gradiente. Se recuperan las células tumorales con un porcentaje de viabilidad del 90% (utilizando como criterio de viabilidad la exclusión al azul tripán).

2.b.- GRADIENTE DE PERCOLL

En los estudios de la heterogeneidad tumoral y purificación de las subpoblaciones que componen el tumor se realizaron gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia Co) usando soluciones stock de densidades 1,035; 1,040; 1,050; 1,060; 1,070; 1,080 y 1,090 gr/ml. La centrifugación se realizó a 400g por 45 minutos (refs. 33-35). En todos los casos las muestras fueron metástasis ganglionares de melanoma humano exceptuando en el caso de la línea IIB-MEL-J que se obtuvo a partir de una metástasis pulmonar. La obtención de la línea IIB-MEL-J fue descrita arriba, en el resto de los tumores usados para este estudio se realizaron disgregaciones mecánicas o enzimáticas de los tejidos, y se trabajó posteriormente con las células provenientes de estos

tratamientos.

3.- CARACTERIZACION DE LAS CELULAS DE MELANOMA

3.a.- DETECCION DE ANTIGENOS TUMORALES POR INMUNOCITOQUIMICA

24 horas después de sembrarse 1×10^5 células de la línea IIB-MEL-J en caja de petri de 35mm de diámetro, el medio fue aspirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol frío por 10 minutos. Después de bloquear la peroxidasa endógena, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-S100 (Dakopatts Co) o el antisuero anti-queratinas (Dakopatts Co) por 1 hora, por otro lado se realizaron incubaciones con los anticuerpos monoclonales IIB-106 , IIB- 115 y IIB-127 por 18 horas a 4C. La visualización de la reacción fue realizada con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC) siguiendo la técnica que recomienda el Laboratorio Vector, Burlingame, Ca. Las células fueron contrastadas con hematoxilina de Harris y montadas con glicerol. La detección de los gangliósidos GD₃ y GD₂ fue realizada con los anticuerpos monoclonales R24 y 3F8 respectivamente (gentilmente cedidos por el Dr. A.Houghton) según previamente ha sido descrito (ref. 36).

3.b.- ANALISIS CITOGENETICO

Cultivos creciendo exponencialmente fueron expuestos a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de colchicina por 1 hora. Los cromosomas fueron teñidos con Giemsa y se realizó el bandeo según protocolo de Seabright, 1971 (ref. 37). La identificación de los cromosomas fue hecha según el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana.

3.c.- DETECCION DE MELANINA

3.c.i- Determinación al microscopio:

Ella fue realizada según descripción anterior de Lerner (ref. 38), brevemente: los cultivos fueron incubados con 0,1% DOPA en 0,1M solución tampón de fosfato, pH= 7,4 por 1 hora a 37C. Con posterioridad las células fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol 96% a 4C por 10 minutos, lavadas y contrastadas con hematoxilina de Mayer.

3.c.ii.- Medición de melanina por espectrofotómetro:

El contenido de melanina fue medido por solubilización de 1×10^6 células con 1ml de Hidroxido de Sodio 1M y dimetil sulfoxido al 10%, por 30 minutos. La absorbancia fue leída a 470 nm y el contenido de melanina expresado como μg de melanina por 1×10^6 células (ref. 39).

3.d.- ESTIMACION DE LA ACTIVIDAD TIROSINASA

Fue realizada según Burnet et al.(ref. 40), brevemente: se lavan las células con PBS, se las despega del frasco y se las centrifuga a 400g por 2 a 3 minutos. El precipitado se resuspende en 1ml de solución tampón PBS con 0,5% Tritón X 100. Se realizan dos sonicaciones de 15 segundos cada una y luego se centrifugan a 1000g en frío por 15 minutos. La actividad enzimática se mide en el sobrenadante y en el precipitado. La reacción de actividad es la siguiente: Se hace reaccionar 0,45 mg/ml de tirosina + solución tampón de fosfato de potasio pH= 6,8 + extracto celular por 1 hora a 30C, se mide la coloración obtenida a 475 nm. La actividad enzimática se expresa en unidades, 1 unidad se define como la cantidad de enzima que produce absorbancia (475 nm)= 1 a una concentración de proteína de 1 mg/ml por minuto a 30C.

4.- OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

4.a.- OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la caracterización de la línea celular IIB-MEL-J son obtenidos

según el protocolo clásico de Milstein y col (ref. 41). Se inyectan células de melanoma, purificadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, en ratones de 6 semanas de la cepa endocriada Balb/c, se realizan 4 inyecciones cada tres semanas vía intraperitoneal. Cada inyección consiste en una mezcla de células de tres diferentes metástasis de diferentes orígenes, a una concentración de 1×10^6 células viables. Se detecta la presencia de anticuerpo en el suero de los ratones inmunizados utilizando la técnica de inmunocitoquímica como ensayo. Cuando la dilución de suero 1/1000 es positiva se realiza la fusión. La fusión se realiza usando una relación células de mieloma:células de bazo de 1:10. Se trabaja con 16×10^6 células de mieloma (90% viables) y 100×10^6 células de bazo (94% viables). La línea de mieloma que se usa fue la X63Ag8.

Antes de la fusión se realizan dos controles:

- 1.- No presencia de micoplasma en las células de mieloma a usar X63Ag8 (ref 42).
- 2.- Muerte de las células de la línea X63Ag8 en medio HAT.

A la semana de la fusión ya se observa un 70% de crecimiento. A los 14 días se realiza la primera detección de anticuerpo secretado por los hibridomas, para lo cual se ensayan sobrenadantes de 49 hibridomas sobre células de dos tumores de melanoma de diferentes origen, en los dos casos las células son amelanóticas puesto que la visualización de la reacción es coloreada, en particular marrón si es positiva. De los 49 sobrenadantes ensayados sólo 18 son positivos para los dos tumores. De estos 18 sólo 7 dan reacción positiva con el 90%-100% de las células del preparado y son éstos los hibridomas clonados.

Primer clonado:

Para este primer clonado se realizan cuatro diluciones: 10; 1; 0,3 y 0,1 células/pocillo. Los hibridomas clonados se rotulan como 2, 10, 22, 24, 33, 35 y 39. A los 16 días hay

clones suficientemente crecidos para ensayar (Tabla 1).

Tabla 1.-Crecimiento de clones

No. de clon	Dilución	
	1célula/pocillo	0,3célula/pocillo
2	33%	5%
10	11%	5%
22	11%	17%
24	33%	-
33	63%	33%
35	48%	66%
39	22%	33%

Se realiza entonces una segunda detección de anticuerpo secretado, se prueban 65 sobrenadantes sobre dos tumores diferentes. Sólo se ensayan sobrenadantes que provengan de las diluciones 1; 0,3 y 0,1 células/pocillo. Nuevamente, sólo se clonan aquellos hibridomas que dan positivo sobre ambos tumores y en un 90% de las células del preparado por lo menos. Se seleccionan así 7 clones. En este primer clonado se pierde la positividad de los hibridomas 24 y 39.

Segundo clonado:

En el segundo clonado se trabaja con una dilución de 0,3células/pocillo, sembrando 96 pocillos para cada clon. Los hibridomas así clonados por segunda vez se rotulan como 2.7; 10.2; 22.1; 22.2; 33.1; 33.2 y 35.1, donde el primer número corresponde al hibridoma original de la fusión y el segundo número al clon obtenido en el primer clonado. A los 20 días ya se tienen clones que provienen del segundo clonado (Tabla 2) y se realiza la detección de anticuerpo final contra células de melanoma provenientes en este caso de un solo tumor.

Tabla 2.-

No. de clon	Crecimiento de clones.
2.7	21%
10.2	4%
22.1	-
22.2	7%
33.1	19%
33.2	3%
35.1	-

Se ensayan 135 sobrenadantes, de los cuales solo 22 son positivos.

Se obtiene positividad con los subclones rotulados como:

51 y 63 que vienen del clon 2.7

46,47 y 49 que vienen del clon 10.2

12, 14, 15, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 33, 34, 35 y

40 que vienen del clon 33.1

6 que vienen del clon 33.2

Los clones 22.1 y 35.1 no crecen.

El clon 22.2 pierde la positividad.

Expansión:

El medio de cultivo para crecimiento de los hibridomas en esta etapa es Dulbecco + 5% FBS + 5 mg/ml de piruvato de sodio. A los tres meses solo se mantienen los clones 6 (33.2.6), 15 (33.1.15), 27 (33.1.27) y 47 (10.2.47).

Para los estudios en donde se utilizan estos anticuerpos monoclonales se trabaja con sobrenadante de hibridoma concentrado 20 veces respecto del valor original, para lo cual se concentran los sobrenadantes con sulfato de amonio al 40% final (ref. 43). Se trabaja con una dilución 1/10 de este concentrado para los ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, con una dilución 1/5 para la fijación de complemento, y sin diluir para los ensayos de inmunoprecipitación y revelado de proteínas transferidas a nitrocelulosa.

4.b.- MARCACION DE INMUNOGLOBULINAS

Se siembran 5×10^6 células/ml en el medio en que crecen normalmente los hibridomas, pero que carece de metionina, se incuban con (^{35}S)metionina en una concentración final de $50\mu\text{Ci/ml}$ por 3,5 horas. Luego de la incubación se centrifugan las células y se toma el sobrenadante, el cual se congela a -70C hasta su estudio. Para determinar el isotipo de la inmunoglobulina se realiza un gel reductor de poliacrilamida al 10% (explicado en 5b).

4.c.- LISIS POR COMPLEMENTO

Se lava la monocapa de la línea IIB-MEL-J con PBS, y luego se la trata con EDTA 5% por 25 minutos en estufa gaseada a 37C , con posterioridad se lavan las células y se determina la viabilidad de las mismas. Se tratan 230000 células con el anticuerpo monoclonal por 60 minutos y posteriormente se agrega el complemento (ref. 44). Se cuentan las células viables utilizando como criterio la exclusión al azul tripán.

5.- ENSAYOS PARA CARACTERIZAR PROTEINAS CELULARES DE LA LINEA IIB- MEL-J POR GELES

5.a.- OBTENCION DE EXTRACTOS CELULARES

Se incuban monocapas de la línea IIB-MEL-J con una solución que contiene: NP40 al 1% (peso/volumen), solución tampón de fosfato monosódico 10mM - fosfato disódico 10mM $\text{pH}=7,4$, EDTA 10mM, cloruro de sodio 10mM y PMSF 1mM, por 20 minutos a temperatura ambiente, de esta forma se lisan las células y se recogen los extractos que se centrifugan, el sobrenadante se utiliza para el ensayo.

5.b.- GEL REDUCTOR DE POLIACRILAMIDA

En todos los ensayos se realiza un gel de poliacrilamida 10% (acrilamida 30% + bisacrilamida 0,8%), el preparado a sembrar se mezcla con solución tampón de muestra 1x (DTT 0,77gr + 10ml de SDS 10% + 4ml de Tris-HCl 1M pH=6,8 + 5ml de glicerol + 1ml de BPP 2% + agua csp 50ml) y se siembra en el gel, se realiza una electroforesis vertical segun fue descrito (ref. 45), por 18horas a 5mA. Se tiñe el gel con 0,25% Azul de Coomasie en una mezcla de metanol:acético:agua (5:1:5) por una hora con agitación. Se utiliza para decolorar el gel una solución que consiste en 200ml de metanol+ 50ml de ácido acético+ agua csp 1000ml.

5.c.- INMUNOPRECIPITACION

10×10^5 células se siembran en una caja de petri de 35mm de diámetro, cuando las células se encuentran en crecimiento exponencial se cambia su medio de cultivo a un medio que no contiene metionina y se incuban con $200\mu\text{Ci}$ de (^{35}S)metionina por caja durante 18horas. El medio de cultivo y las células son recogidas para realizar el ensayo. Se trabaja con 2 a 5×10^6 cpm como mínimo por ensayo. Se toman 100λ del extracto celular o del medio condicionado y se mezclan con 30λ de BI 5x (BI 5x= Tris 500mM pH=8 + ClNa 2,5M + NP40 5% + BSA 5% + PMSF 5mM) y 15λ del anticuerpo monoclonal. Se permite que la reacción ocurra por 1 hora a temperatura ambiente y luego por 15-18 horas a 4C. Con posterioridad se agrega 50λ de proteína A sepharosa (Immuno-precipitin formalin-fixed Staph A cells BRL) que está resuspendida en BI 1x, y se mezcla durante 2horas a 4C, se centrifuga y el precipitado se lava con WB (Tris 100mM pH=8,6 + LiCl 500mM + NP40 1%) hasta que la radioactividad baje a 0 (ref. 46). Se siembra la preparación en un gel reductor de poliacrilamida al 10% , el resultado se visualiza por autorradiografía.

5.d.- TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A NITROCELULOSA Y DETECCION DE LAS MISMAS

Se realiza un gel reductor de poliacrilamida 10% en donde se siembran los extractos celulares obtenidos según explicación en 5.a. Luego de ello, se transfieren las proteínas según ha sido descrito anteriormente (ref. 47), brevemente: se coloca el gel y la nitrocelulosa en un aparato de transferencia, con una solución electrolito que consiste en 25mM Tris + 192 mM glicina + 20% (v/v) metanol pH= 8,3, se permite la transferencia por 18horas a 200mA, luego de ello se lava la hoja de nitrocelulosa en TTBS=0,1% (vol/vol) Tween 20 + 100mM Tris + 0,9 % NaCl pH= 7,5 por 30minutos con agitación. Se transfiere la membrana a la solución del anticuerpo a ensayar y se incuba 3 horas a temperatura ambiente. Luego se lava 3 veces con TTBS 15 minutos cada vez. Se hace reaccionar entonces con el complejo avidina-biotina (VECTASTAIN ABC) siguiendo la técnica que recomienda el laboratorio Vector, Burlingame, Ca. El revelado se realiza usando como sustrato diaminobencidina (DAB) preparada de la siguiente manera: se agrega a 5ml de Tris 100mM pH=7,5, 100λ de DAB (40mg/ml) y 15λ de agua oxigenada al 3%. Se permite desarrollar el color por 15 minutos como máximo. Se lava dos veces con agua destilada y se deja secar la membrana al aire.

6.- ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se preparan las células de melanoma a ensayar sobre vidrio, se las lava dos veces con PBS y se las incuba con el anticuerpo monoclonal a 4C por 3 horas, se lava 1 vez con PBS en frío y se revela usando un anticuerpo anti-raton unido a isotiocianato de fluoresceína, se lava dos veces con PBS y se fija con metanol, se monta en N-propilgalato. La positividad se ve como una coloración verde cuando se

ilumina el preparado con luz UV.

7.- ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Se siembran células en Medio Completo sin suero por 18 horas, luego de ello el medio es tomado y se ensaya la actividad enzimática usando hemoglobina como sustrato (ref. 48), en un ensayo colorimétrico, en el cual la mezcla de reacción consiste en hemoglobina 1,2% en solución tampón de citrato (pH= 3,2) + 0,1ml de medio condicionado + solución tampón csp 2ml. Se deja que la reacción ocurra por 20 minutos a 37C y se frena con TCA 10%. Se centrifuga a 400g por 10 minutos y se filtra el sobrenadante por papel Whatman calidad 1. Se mide la absorbancia de este sobrenadante a 280nm.

Alternativamente se utiliza (metil-¹⁴C)metilhemoglobina como sustrato (ref. 49). El medio condicionado se acidifica con ácido cítrico llevándolo a pH= 5. La reacción se inicia con el agregado de 100λ de medio condicionado previamente acidificado a 100 μg de metilhemoglobina / 10 λ + metilhemoglobina marcada (total aproximado 2000cpm) con una actividad específica de 0,028mCi/mg y se permite que la reacción ocurra a 37C durante el tiempo de ensayo. Se finaliza con TCA 10%, el material TCA soluble se cuenta en un contador de centelleo líquido.

8.- ENSAYOS DE PROLIFERACION

8.a.- MARCACION CON (³H)TIMIDINA Y PRECIPITACION DEL DNA

En el caso de células que no crecen *in vitro*, ellas se incuban con 10μCi/ml de (³H)timidina (actividad específica= 50 - 80 Ci/mmol) por dos horas en estufa gaseada pCO₂= 5% a 37C. En el caso de la línea celular IIB-MEL-J la marcación se realiza con 5μCi/ml de timidina para un pulso de dos

horas. El número de células utilizado para cada experimento es de 2×10^6 .

En los ensayos de seguimiento de marca se lavan las células una vez terminada la incubación con el radioactivo y se dejan crecer los cultivos los tiempos indicados según el experimento.

En todos los casos, las células se rompen agregando 1ml de agua + 0,1ml de fósforo inorgánico al 0,1M + 0,2ml de DNA de espermatozoos de salmón (2,5mg/ml), luego se agrega 0,25ml de TCA al 12,5% y se deja reposar en frío por 5 minutos para precipitar el DNA, se centrifuga a 800g por 5 minutos y se aspira el sobrenadante. Se resuspende el precipitado en 0,5ml de NaOH 0,2N hasta que esté bien disuelto, se repite el agregado de TCA y finalmente se redissuelve el precipitado de DNA en 0,2ml de solvente, se agrega 1ml de tolueno-omnifluor y se cuenta en un contador de centelleo líquido (ref. 50). Alternativamente se precipita el DNA con TCA al 10% por 30 minutos, se filtra el ácido nucleico por fibra de vidrio, el filtro se lava y se deja secar bajo lámpara infrarroja, se agrega 1ml de tolueno-omnifluor y se cuenta en contador.

8b.- DETERMINACION DEL INDICE MITOTICO POR MARCACION CON TIMIDINA (TLI)

Una vez obtenidas las células se las incuban con (3 H)timidina $1\mu\text{Ci/ml}$ (actividad específica = 50-80 Ci/mmol) por 18 horas. Al finalizar la incubación se las centrifuga y se las lava con PBS, luego de ello se las siembra sobre un gradiente de Percoll para separar las subpoblaciones. Se procesan las muestras fijando las células con etanol 96%, luego se las lava con TCA al 5% y agua, se sumergen entonces en una emulsión KODAK NTB3 en cuarto oscuro y se deja exponiendo por 15 días a 4°C en oscuridad, se revela y se contrasta con hematoxilina (ref. 51). Se cuentan entre 300 a 400 células por cada determinación.

8.c.- DETERMINACION DEL INDICE CLONOGENICO

La habilidad de las células IIB-MEL-J para producir colonias independiente del sustrato es estimada por el método de crecimiento en agar (ref. 52). Se cubren cajas de petri con una capa de agar al 0,5% y arriba se siembran 1×10^4 células en una capa superior de agar al 0,3%. Los cultivos se incuban por 14 días, posteriormente las colonias, definidas como agregados de mas de 30 células son contadas.

8.d.- CURVAS DE CRECIMIENTO

Se siembran 150×10^4 , 80×10^4 , ó 50×10^4 células en cajas de petri de 35mm de diámetro según el experimento. En el caso de las curvas de crecimiento realizadas para determinar el tiempo de generación de la línea IIB-MEL-J las células se crecen en Medio Completo; en el caso del estudio de diferenciación con Tirosina (ref. 53), a las 24 horas de sembrar las células en Medio Completo se agrega L-Tirosina a una concentración final de 3mM. Los cultivos son incubados por 15 días, y a los diferentes tiempos indicados se tripsinizan, siendo el número de células estimado con una cámara de Neubauer.

9.- CLONADO POR DILUCION LIMITE

Células que provienen de las diferentes fracciones obtenidas cuando se realiza el gradiente de Percoll para la línea IIB-MEL-J se clonan por dilución límite en una relación 0,3células/pocillo (placas de 96 pocillos).

RESULTADOS

1.- ESTABLECIMIENTO DE LINEAS CELULARES - CULTIVOS PRIMARIOS

El primer intento que se realizó para establecer una línea celular fue con un tumor aparentemente amelanótico (a simple vista) que se disgregó mecánicamente, estas células se sembraron directamente, sin ningún intento de purificar las células tumorales de las del resto que componen la metástasis ganglionar utilizada. El medio usado fue una mezcla Dulbecco:F12 en una relación 1:1 al cual se le agregó suero fetal bovino (FLOW Co.), insulina y transferrina, puesto que el requerimiento de estos factores por parte de las células de melanoma fue descrito (ref. 54,55). Se intentaron crecer las células en dos condiciones: 1.-Dulbecco + F12 + INSULINA (5 μ g/ml) + TRANSFERRINA (5 μ g/ml) 2.-Dulbecco + F12 + INSULINA (5 μ g/ml) Las células se mantuvieron durante tres días en cultivo (fig. 5a), posteriormente se observó la aparición de una malla negra en ambas condiciones que estimamos sería debida a la oxidación celular y producción de pigmentos característicos de estas células, uno de ellos posiblemente la melanina, que se ha demostrado resulta ser tóxica(ref. 56). Luego de esta observación las células no crecieron.

Paralelamente, pensamos que el método de disgregación podría dañar las células y entonces intentamos hacer cultivo de un explanto derivado de un melanoma amelanótico (fig. 5b). A las 24horas se ven células pegadas que se mantienen

por 8 días y crecen, pero que cuando se tripsinizan para expandir se pierden.

En un tercer intento descongelamos las células que provenían de la disgregación mecánica (fig. 6a) de un tumor y las purificamos por Ficoll-Hypaque (fig. 6b), en este caso usamos la condición 2 para el crecimiento, las células no se pegaron al sustrato, tampoco crecieron adecuadamente aunque se mantenían viables en el tiempo (determinado por exclusión al azul tripán), al caracterizarlas se vio que eran positivas para el marcador S100 en un 100% de las células del preparado.

Dado que las células que descongelábamos se mantenían vivas en el tiempo, decidimos encarar la búsqueda del medio más adecuado para crecerlas. Para ello trabajamos con un melanoma amelanótico (al microscopio óptico). Como se ve en la Tabla I, Dulbeco+F12 en una relación 1:1 resultó ser un medio apropiado para el crecimiento, al cual se lo suplementa con suero fetal bovino al 10%, con galactosa 0,3mg/ml y piruvato de sodio 0,15mg/ml. Después de 10 días en cultivo, en algunos casos, se observa la aparición de grumos negros, igual que anteriormente.

Tabla I.-

Día	RPMI	RPMI/F12	DULBECO	DULBECO/F12
1	1,8±0,2 _a (29%) _b	1,9±0,6 (30%)	1,5±0,5 (55%)	1,3±0,2 (57%)
3	1,2±0,03 (40%)	0,9±0,1 (66%)	0,5±0,1 (73%)	1,0±,01 (73%)
5	1,6±0,01 (44%)	1,7±0,1 (44%)	1,4±0,02 (58%)	2,3±0,2 (57%)
7	1,4±0,02 (50%)	1,2±0,2 (40%)	1,8±0,2 (58%)	1,9±,07 (61%)
9	1,1±0,08 (57%)	1,0±0,08 (61%)	0,8±0,01 (70)	0,6±0,1 (70%)
11	0,8±0,3 (31%)	0,5±0,01 (82%) _c	1,2±,01 (79%)	1,4±,06 (80%)

- a) No. de células $\times 10^{-5}$. El dato corresponde a un valor promedio de dos determinaciones.
- b) El dato corresponde al porcentaje de células viables.
- c) Apareció una malla negra este día en el cultivo.

El medio elegido permitía un mayor porcentaje de viabilidad de las células en cultivo durante el tiempo de estudio, pero a pesar de ello las células no proliferaban, ni tampoco se pegaban al sustrato, siendo que todas las líneas descritas hasta el momento para melanoma son de células que crecen pegadas al sustrato. Dado que ha sido descrito que el EGF ayuda al crecimiento de células tumorales humanas en cultivo, utilizamos 5ng/ml en los ensayos siguientes (ref. 57).

Finalmente trabajamos con un tumor melanótico disgregado mecánicamente para el cultivo primario, y como resultado obtuvimos células que se oscurecieron luego de 5 días en cultivo. Como se puede ver en la figura 7, las células tumorales están pegadas (fig. 7a) y al cabo de 5 días se oscurecen (fig. 7c), se redondean y se despegan (fig. 7d). Decidimos entonces usar antioxidantes, y al medio de cultivo mencionado anteriormente se lo suplementó con selenito de sodio 20nM y ácido ascórbico 100 μ M (ref. 25).

Después de estos diversos experimentos decidimos que la manera óptima de crecimiento de las células sería realizar una disgregación enzimática del tejido, las células que soportaran una disgregación enzimática si crecían serían

capaces de sobrellevar la posterior tripsinización necesaria para mantener el cultivo.

Ensayos previos nos mostraron que las células que se purificaban por el gradiente de Ficoll-Hypaque tenían buena viabilidad. Dado que el método de purificación nos brindaba células puras de melanoma y vivas, intentamos confirmar su buena actividad metabólica, para lo cual realizamos marcaciones *in vitro* usando (3 H)timidina según fue explicado en Materiales y Métodos. El resultado obtenido fue repetido tres veces y a modo de ejemplo cito uno:

Células de la interfase	7207 cpm/10 ⁵ células viables
Células del precipitado	266 cpm/10 ⁵ células viables

Determinamos la presencia de S100 y de queratinas tanto para la interfase como para el precipitado de Ficoll-Hypaque, viendo que el 100% de las células de la banda de la interfase eran positivas para S100 (115/115) mientras solo el 30% lo eran en el precipitado (33/102).

En el caso del tumor que dio lugar a la línea IIB-MEL-J se obtuvieron tres tipos de suspensiones celulares que llamamos: PRIMERAS HORAS que corresponde a las células obtenidas durante la disgregación enzimática previa purificación por gradiente de Ficoll-Hypaque, que se mantuvieron en cultivo por 4 meses (fig. 8); PELLET que provinieron del precipitado del gradiente de Ficol- Hypaque,

eran morfológicamente parecidos a fibroblastos y tuvieron al principio un crecimiento muy agresivo, manteniéndose en cultivo por 5 meses, llegando al pasaje No. 40 (fig. 9) y; CELULAS PURAS de melanoma que provinieron de la interfase del gradiente de Ficoll-Hypaque y resultaron en la línea celular IIB-Mel-J que han llegado al pasaje 180 (fig. 10).

A partir de una segunda biopsia se realizó el protocolo anteriormente descrito, pero no se purificaron las células en el mismo día de la disgregación, o sea, se las cultivó por 15 días y luego se realizó el gradiente de Ficoll-Hypaque, pudiéndose obtener las CELULAS PURAS de este tumor que resultaron en la línea celular IIB-Mel-T (fig. 11).

Luego de realizar un mínimo estudio de caracterización, proliferación y citogenética de ambos cultivos primarios IIB-MEL-J e IIB-MEL-T, como se puede ver en la Tabla II, decidimos restringir el estudio a la línea IIB-Mel-J debido a su gran heterogeneidad morfológica y cariotípica.

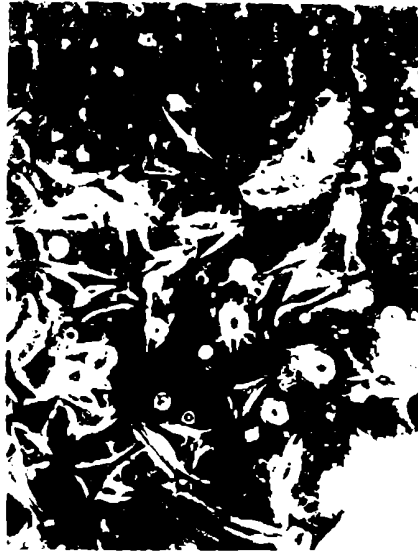
Tabla II.-

	Línea IIB-MEL-J	Línea IIB-MEL-T
Modificaciones en el Cariotipo (ver 3d)	Cromosomas 1,6,7	Delección en cromosoma 15
Tiempo de generación	72 hs.	96 hs.
Morfología	Heterogénea, epitelioide	Homogénea, fibroblastoide
TLI(células totales)	34,5%	12%
TLI(subp. I) ^a	5,6%	14,5%
TLI(subp. II)	10,9%	11,5%
TLI(subp. III)	24,5%	8 %
TLI(subp. IV)	27,0%	

^a)subp.=subpoblación



5



5

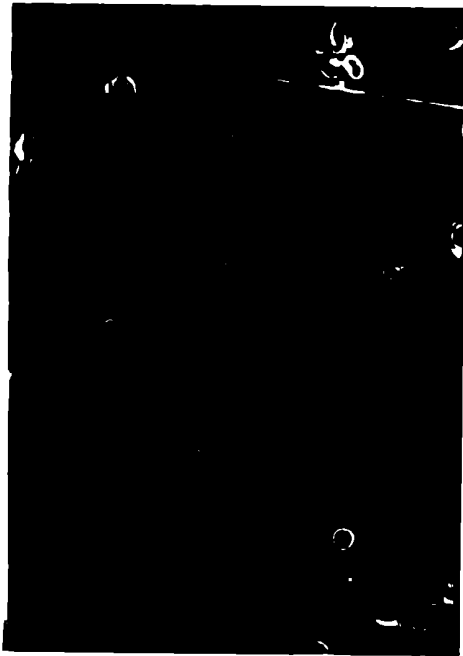
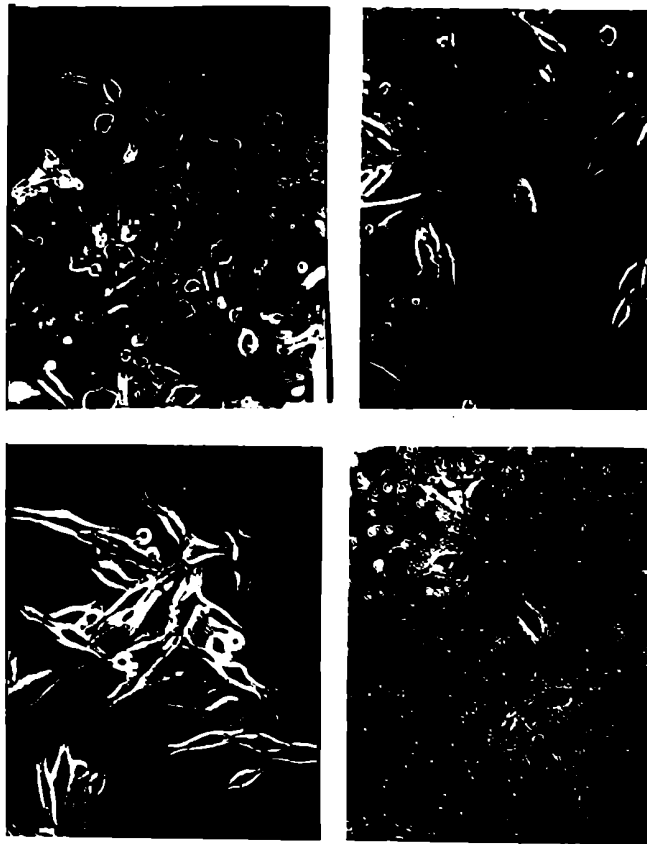


Figura 5.- Cultivos primarios de melanoma humano (aumento 100x)

Figura 6.- Células de melanoma al microscopio óptico teñidas con azul tripan (aumento 400x).



8

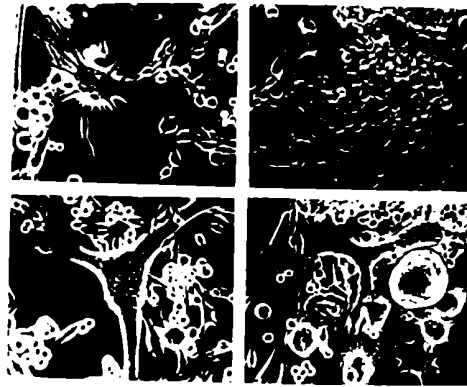


9

Figura 7.- Cultivo primario de un melanoma melanótico. (aumento 100x).

Figura 8.- Cultivo primario llamado PRIMERAS HORAS (aumento 100x)

**Figura 9.- Cultivo primario llamado PELLET (aumento 100x).
VER EXPLICACION EN RESULTADOS.**



10



11

Figura 10.- Línea IIB-MEL-J en cultivo (aumento 100x)
Figura 11.- Línea IIB-MEL-T en cultivo (aumento 100x)

2.- CARACTERIZACION DE LA LINEA IIB-MEL-J

2a.- DETECCION DE ANTIGENOS TUMORALES

Empezamos nuestro estudio de caracterización usando un anticuerpo que reconocía la proteína S100, la cual es una proteína característica de células de glía y Schwann y, ha sido descrita como marcador característico de melanoma humano (ref. 58) aunque no todas las células dentro del tumor la expresan (ref. 59). Por otro lado, fue demostrado por Trejdosiewicz et al. (ref. 60), que varias líneas de melanoma expresaban S100, pero solo la línea M5 expresaba filamentos intermediarios tipo citoqueratinas. La expresión de ambas proteínas fue analizada para la línea IIB-Mel-J y, encontramos que todas las células expresaban dichas proteínas (figs. 12a, 12b).

Dado que los gangliósidos son constituyentes prominentes de la superficie celular del melanoma su expresión fue investigada, en particular buscamos el GD₂ y GD₃. La detección fue realizada con los anticuerpos monoclonales 3F8 (ref. 61) que reconoce GD₂ y, R24 (ref. 36) dirigido contra GD₃. Estos experimentos mostraron que no todas las células presentaban positividad, 72,4±0,3% de las células fueron positivas para GD₂ mientras 75,0±0,5% lo fueron para GD₃ (fig. 12c,12d).

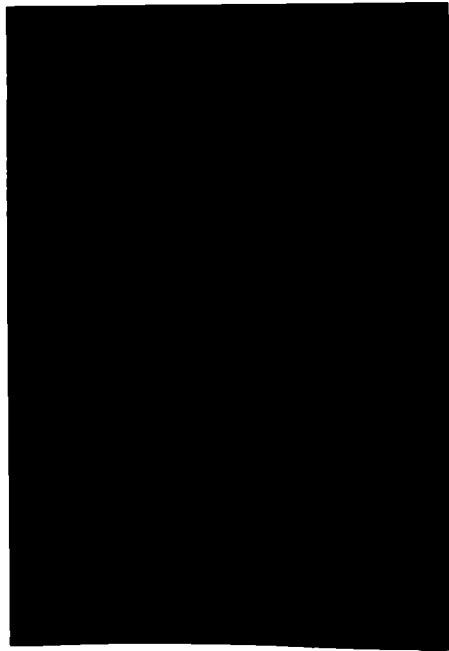
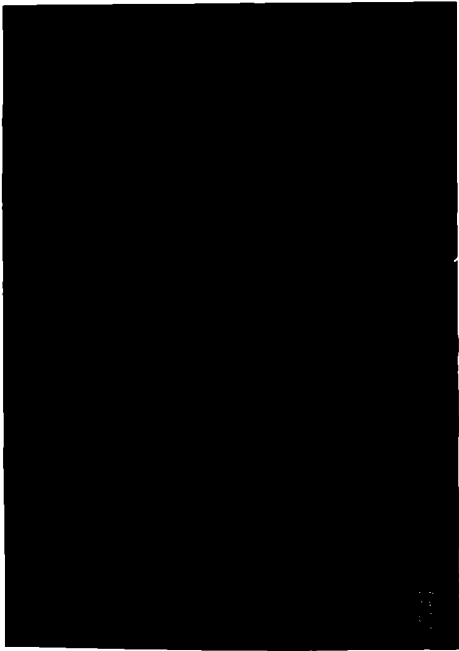


Figura 12.- Marcadores tumorales presentes en la línea IIB-MEL-J. a)S100, b)citoqueratinas, c)GD3, d)GD2.(aumento 400x)

2b.- USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES GENERADOS EN NUESTRO LABORATORIO

Con la expectativa de confirmar nuestros datos anteriores decidimos preparar nuestros propios anticuerpos monoclonales que reconocieran las células de melanoma. Como fue descrito en Materiales y Métodos se obtuvieron cuatro clones que fueron expandidos. La reactividad de los anticuerpos producidos por estos clones se estudió sobre melanomas primarios de diferentes tipos e índices de Clark (tabla IV), y sobre un total de nueve metástasis ganglionares y dérmicas, como se muestra en la figura 13. Solo los anticuerpos provenientes de los clones 33.2.6, 33.1.15 y 33.1.27 dieron reacción positiva contra estos preparados y por lo tanto ellos fueron seleccionados para los siguientes estudios, se los rotuló como IIB-106, IIB-115 y IIB-127 respectivamente.

Tabla III.-

Valores de inmunoreactividad	
Intensidad de la reacción (I):	Porcentaje de células teñidas (P):
+++ Intensa	+++ 60 al 90 %
++ Moderada	++ 30 al 60 %
+ Baja	+ 5 al 30 %

Tabla IV.-

		Estudio sobre cortes de tejido (fig. 14)							
		Anticuerpo							
Histología		IIB-106		IIB-115		IIB-127		anti-S100	
		P	I	P	I	P	I	P	I
Melanoma con extensión superficial									
Ind. Clark I		+	++	++	+	+++	++	++	++
Ind. Clark II		+++	++	+	+	+	+	+++	+++
Ind. Clark V		-	-	-	-	+	+	+	++

Melanoma maligno

nodular:

Ind. Clark II	+	+	+	+	-	-	+	+
Ind. Clark III	++	+	++	++	++	+	+++	+++
Ind. Clark III	+	+	++	++	+	++	+++	+++
Ind. Clark IV	++	++	+++	++	+++	++	-	-

Por otro lado se determinó si estos anticuerpos eran capaces de reconocer no sólo células tumorales sino también nevus (tabla V).

Tabla V.-

Histología	Estudios sobre nevus							
	Anticuerpo							
	IIB-106		IIB-115		IIB-127		anti-S100	
	I	P	I	P	I	P	I	P
1. Intradérmico	-		-		-		+	+
2. "	+	+	-		-		+	+
3. "	-		-		-		+	+
4. "	-		-		-		+	+
5. "	-		-		-		+	+
1. Compuesto	+	++	+	+	+	+	+	+
2. "	-		-		-		+	+
1. De Unión	+	++	+	+	+	++	+	+
2. "	+	++	-		+	+	+	+
3. "	+	+	-		-		+	+

Por último para determinar la especificidad de estos anticuerpos se los enfrentó a tejido normal y tejido tumoral de diferentes orígenes (tabla VI).

Tabla VI.-

TEJIDO TUMORAL	Anticuerpo		
	IIB-106	IIB-115	IIB-127
Ca. de mama	+	+	+
Ca. de laringe	+	+	+
Ca. de colon	-	+	+
Leiomioma	-	+	+
Rabdomiosarcoma	-	-	-

TEJIDO NORMAL	IIB-106	IIB-115	IIB-127	anti-S100
Piel	-	+	+	+
Cerebro y cerebelo	-	-	-	+
Médula ósea y ganglios	-	-	-	-
Higado y riñon	-	-	-	-
Pulmon y bronquios	-	-	-	-
Ovario y cuello uterino	-	-	-	-
Colon	-	+	-	-
Testículo	-	+	-	-
Pancreas	+	+	+	-
Glándula tiroidea	+	+	-	-

En la fig. 14 se muestra la reactividad del anticuerpo IIB-106 sobre cerebelo. Por otro lado, como se muestra en la figura 15 los anticuerpos generados en nuestro laboratorio fueron positivos con la línea IIB-MEL-J, usando como técnica inmunocitoquímica.

Con posterioridad se intentó determinar cual era el antígeno reconocido por dichos anticuerpos. No pudimos averiguar cual era el antígeno reconocido por los anticuerpos IIB-127 y IIB-115, ni con ensayos de inmunoprecipitación o de transferencia de proteínas a nitrocelulosa. El anticuerpo IIB-106 reconoce péptidos de peso molecular de 72kd y 59kd a juzgar por el ensayo de inmunoprecipitación (fig. 16a).

Intentamos conocer la localización subcelular de esta proteína reconocida por el anticuerpo IIB-106, y ensayos de inmunofluorescencia trabajando con células no fijadas, mostraron que este anticuerpo reconocía alguna proteína en la membrana (fig. 16b,c). Por otro lado, ensayos de fijación de complemento dieron como resultado un 9% de lisis de las

células IIB-MEL-J cuando eran tratadas con el anticuerpo.

Tabla VII.-

Lisis por complemento		Células lisadas
Sin anticuerpo		26%
Sin anticuerpo + 10% complemento		29%
Antic. R24 + 10% complemento		55%
Antic. IIB-106 + 10% complemento		38%
Sin anticuerpo + 20% complemento		27%
Antic. R24 + 20% complemento		66%
Antic. IIB-106 + 20% complemento		32%

Dicho anticuerpo sería una Ig M (fig. 17), a juzgar por el ensayo de marcación realizado con el hibridoma que produce este anticuerpo.

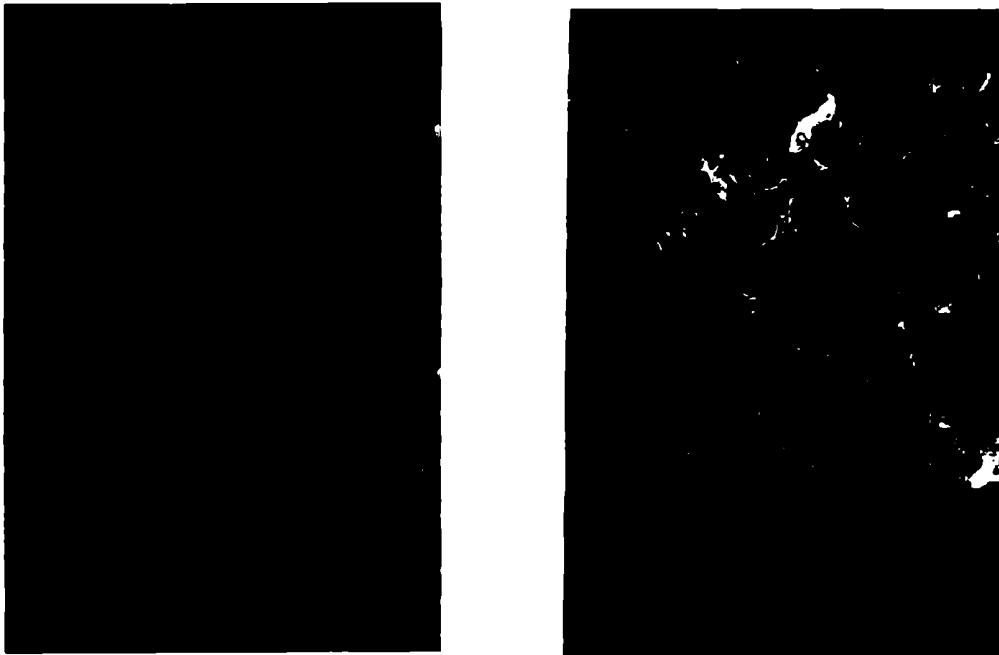


Figura 13.- Reactividad del anticuerpo IIB-106 sobre metástasis de melanoma a) dérmica, b) ganglionar.(aumento 400x)

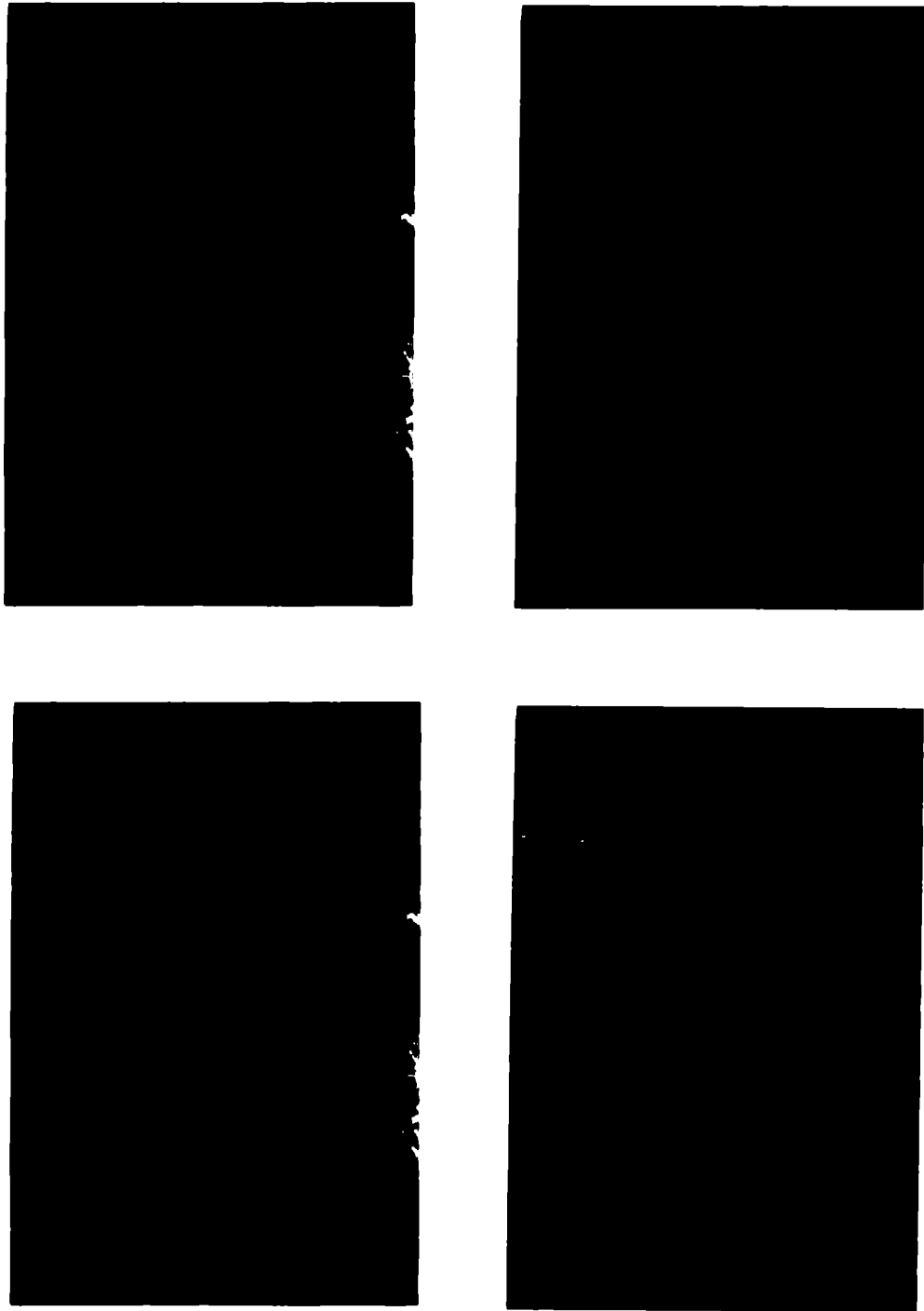


Figura 14.- Reactividad del anticuerpo IIB-106. Melanoma primario:a)IIB-106, b) control negativo. Cerebelo:c) anticuerpo anti-S100, d) IIB-106. (aumento 400x).

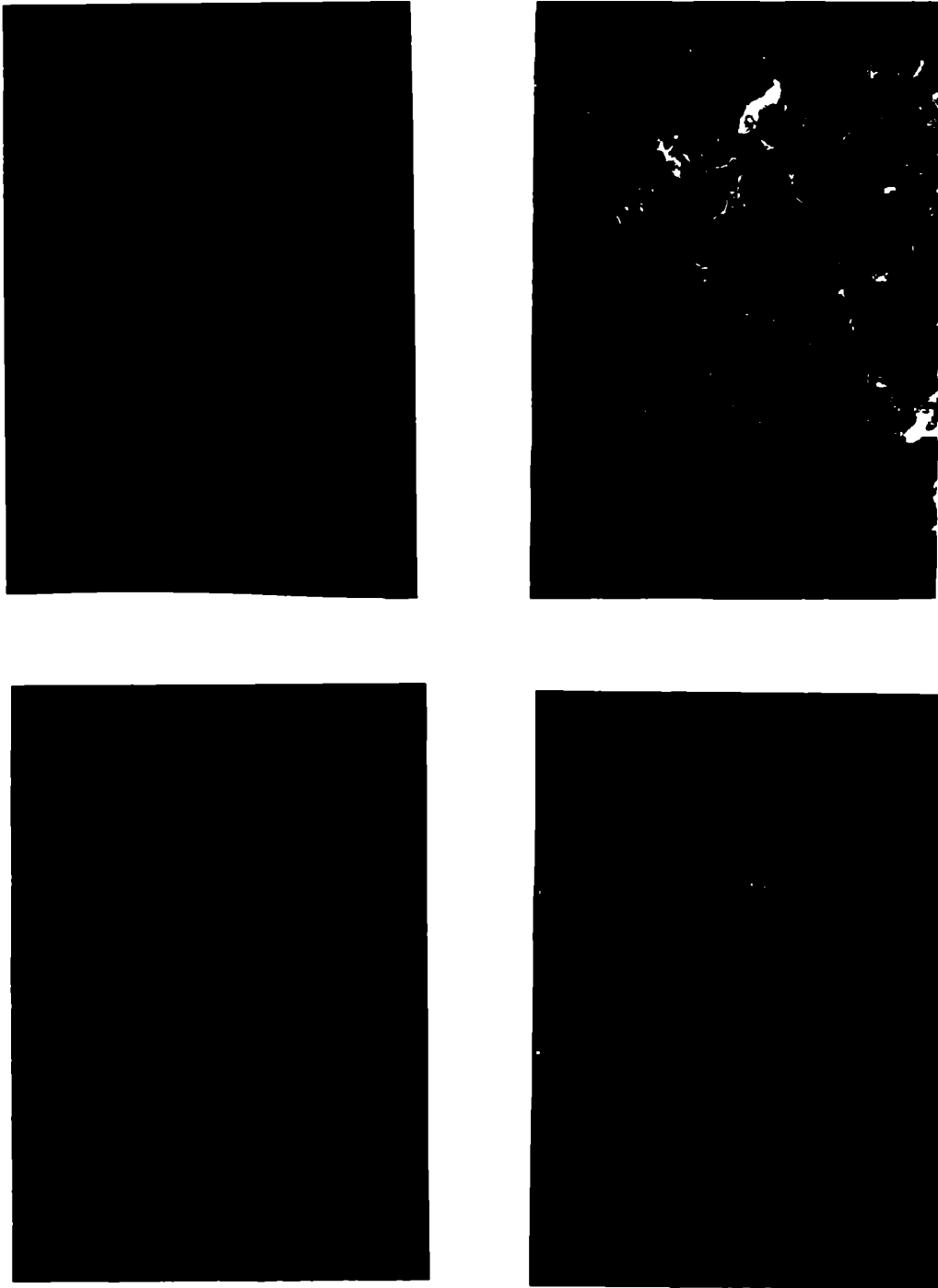


Figura 15.- Reactividad de los anticuerpos IIB sobre la línea IIB-MEI-J. a) IIB-106, c) IIB-115, d) IIB-127 (aumento 100x). b) IIB-106 (aumento 400x).

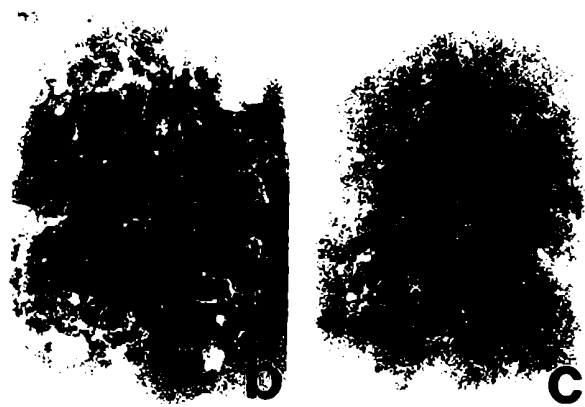
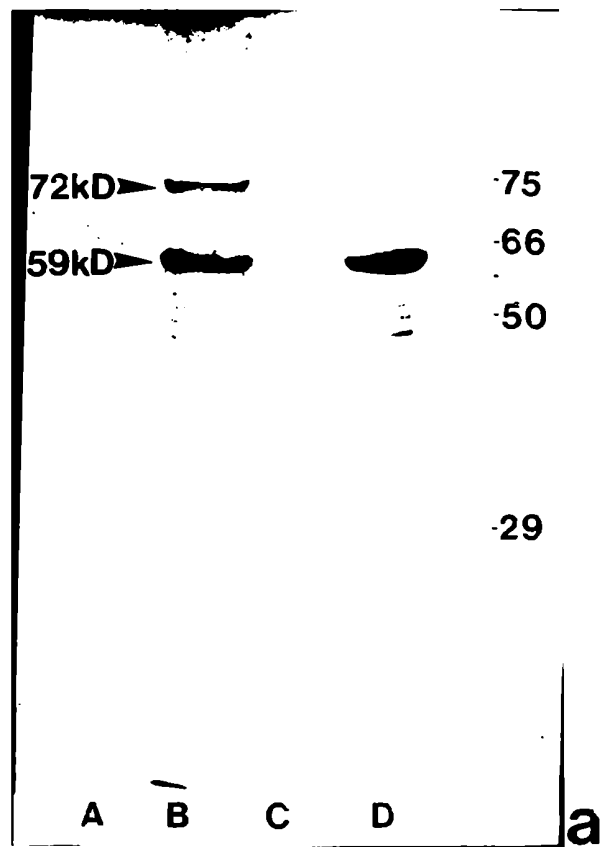


Figura 16.-

a)Inmunoprecipitación del antígeno reconocido por el anticuerpo IIB-106.

Ensayo de inmunofluorescencia sobre la línea IIB-MEL-J

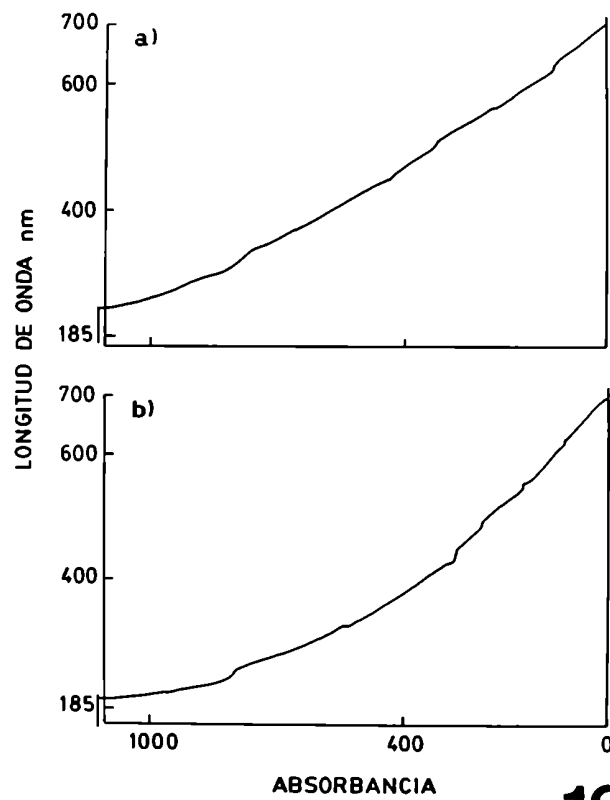
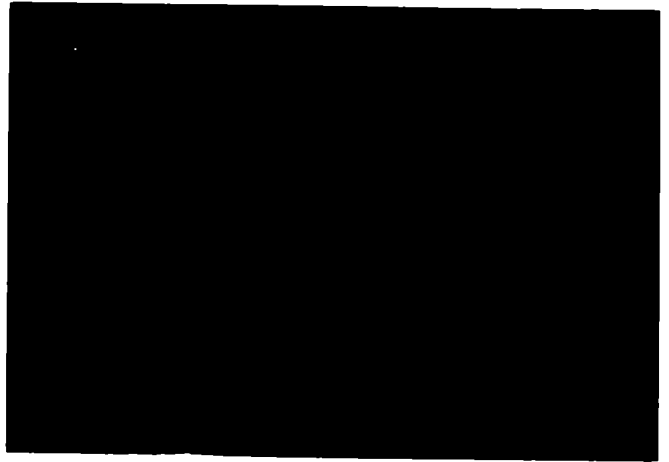
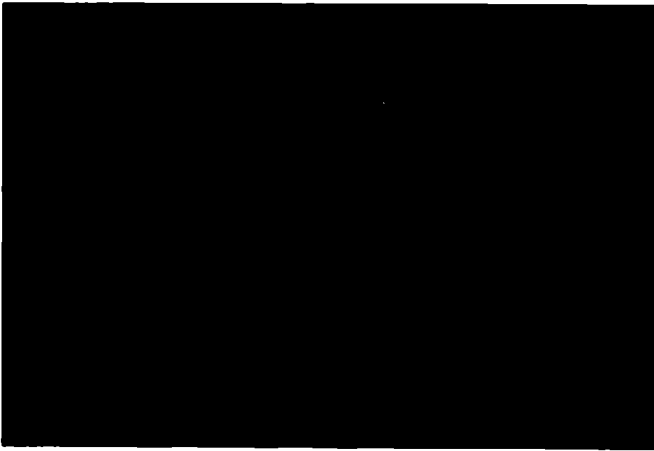
b)IIB-106, c)control negativo.



Figura 17.- Ensayo de marcación de proteínas secretadas por A) línea X63Ag8, B) línea IIB-106.

2c.- PIGMENTACION

La línea IIB-MEL-J es amelanótica, y solo cuando llega a la fase estacionaria se observa que la producción de melanina aumenta. Al microscopio se observan células pigmentadas, constituyendo un 8% de las células totales (fig. 18b). Si se determina la concentración de melanina, en crecimiento exponencial hay $6,5\mu\text{g}$ de melanina/ 10^6 células, mientras en fase estacionaria el valor observado es de $10,2\mu\text{g}/10^6$ células. Esta determinación se realiza espectrofotométricamente a 470nm (fig 19). Como se puede observar hay un leve incremento en la producción de melanina en fase estacionaria, pero mas importante que ello, es notar que las células en fase exponencial que serian amelanóticas según el microscopio óptico producen melanina. Asi decidimos ver que actividad tirosinasa presentaban estas células en crecimiento exponencial, siendo el valor obtenido de: $(0,85\pm 0,02) \times 10^{-3}$ unidades.



19

Figura 18.- Línea IIB-MEL-J en fase exponencial (a) y en fase estacionaria (b), tinción para detectar melanina al microscopio óptico.

Figura 19.- Espectro de la melanina a) línea IIB-MEL-J, b) sintética.

2d.- GENETICA

Los estudios citogenéticos revelan una gran cantidad de alteraciones cromosomales que incluyen rearrreglos, pérdidas, ganancias, isocromosomas y dobles diminutos. Un total de 30 células fueron estudiadas, y se realizó bandeo G en 17 metafases. Como se puede ver en la tabla VIII no hay un número cromosómico predominante.

Tabla VIII.-

Se cuentan 30 metafases.

No de cél:	2	1	1	3	2	1	1	2	1	2	4	1	2	2	1	4
No de crom:	39	42	45	47	52	66	74	79	80	83	85	87	89	93	94	>100

Tabla IX.-

El bandeo se realiza en 17 metafases.

No del cromosoma	Ganancia	Pérdidas	Marcadores
1			i(1q)
4		+	
6		+	i(6p) del(6)(q21)
7			del(7)(q21) i(7p) i(7q)
9			der(9)t(9;?)(p24;?)
11		+	
13		+	
14		+	
15		+	
16		+	
17		+	
18		+	
20		+	
21			i(21q)

Cuando el bandeo G fue realizado se encontró que los cromosomas No. 1, 6, 7, 9 y 21 fueron los que mas frecuentemente estaban involucrados en rearrreglos (tabla IX). En el 15% de las metafases se observaron DMs (fig. 20).



Figura 20.- Metafase de la línea IIB-MEL-J, donde se pueden observar los DMs. (aumento 1200x).

2e.- CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO

Como se puede observar en la tabla X el tumor del cual proviene la línea incorpora poca timidina, pero cuando la línea crece en cultivo su TLI aumenta, lo que significa que el medio de crecimiento es adecuado y permite una buena proliferación celular.

Tabla X.-

LINEA IIB-MEL-J	
TLI	4,4% (células tumorales frescas)
TLI	34,5%(células tumorales en cultivo)
Indice clonogénico	7,1% (células tumorales en cultivo)

En la figura 21a se puede ver al microscopio óptico las células marcadas con timidina. El tiempo de generación para la línea IIB-Mel-J es de 72horas (fig 21b).

Es interesante comentar el efecto de los factores de crecimiento que utilizamos para el crecimiento del cultivo. Para ello se sembraron células y por privación de suero se las permitió llegar a quiescencia (Go), en esas condiciones se probaron los factores de crecimiento para ver si eran capaces de hacer proliferar a las células. Por lo que vemos en la Tabla XI el medio suplementado con suero y factores sacan de quiescencia a las células, siendo dichos factores necesarios para que ellas crezcan; sin embargo si células que vienen creciendo en medio completo simplemente se lavan y se las incuba en un medio suplementado con suero la presencia o ausencia de factores no afecta a la proliferación (tabla XII).

Tabla XI.-

Se siembran 4000 células/ml, se las hace entrar en quiescencia. Se agrega lo indicado y se cuenta.

	No. células/ml	
	48horas	72horas
Cel. quiescentes(CQ) ^a	4400±500	5300±1000
CQ + suero	4900±250	6000± 500
CQ + suero + factores*	9300±550	17300±2000
CQ + insulina	8420±250	4700± 500
CQ + EGF	5125±825	8600± 500
CQ + transferina	6900±500	12000±3000

^a)Se mantienen en medio sin suero ni factores.

*Se trabaja con la mezcla de factores con la cual se crecen las células a las concentraciones mencionadas en el texto.

Tabla XII.-

Se siembran 12500 células/ml en el medio descrito y se cuenta a los tiempos indicados.

	No. células/ml	
	48horas	72horas
Cel.+suero	11900±2500	23900±4800
Cel.+suero + factores*	16500±2500	25100±4800
Cel.+insulina	14700±2000	29600±3600
Cel.+transferrina	13300±3000	25300±6600
Cel.+EGF	12800± 500	33600±3900
Cel.+insulina + transferrina	13900±2300	20000±2200
Cel.+insulina + EGF	12200±1900	19400±2800
Cel.+transferrina + EGF	16700±2100	14000±3200

*Se trabaja con la mezcla de factores con la cual se crecen las células a las concentraciones mencionadas en el texto.

2f.- METASTASIS

Liotta ha descrito que la invasión por parte de las células tumorales durante la metástasis se divide en tres pasos, uno de los cuales es la secreción de enzimas proteolíticas. Los primeros estudios mostraron que el medio condicionado por parte de la línea IIB-MEL-J poseía actividad proteolítica, para ello trabajamos en tres tiempos diferentes como puede ser observado en la fig 22a, las

determinaciones fueron llevadas a cabo en el rango linear del ensayo, hasta tener una absorbancia máxima de 0,3 D0. En la dicha figura se puede observar la correlación entre la actividad y el volumen de medio que se usa en el ensayo. No fuimos capaces de usar mayor cantidad de sustrato debido al alto valor de D0 para los blancos, por lo tanto decidimos usar sustrato marcado para corroborar la actividad enzimática, estos resultados se ven en la tabla XIII.

Tabla XIII.-

Actividad proteolítica del medio condicionado de IIB-MEL-J.		
Tiempo	Marca liberada	
-minutos-	-cpm-	-Porcentaje del total-
0	58 ± 2,5	
60	199 ± 1	7,8 ± 0,1
120	385 ± 87	18,1 ± 4,8
Marca total= 1805 ± 21 cpm.		

Ya había sido descrito por parte del grupo de Rochefort la presencia de Catepsina D en el melanoma humano (ref.62), nosotros nos interesamos en investigar si la línea IIB-MEL-J presentaba dicha enzima. Buscamos la Catepsina D en el medio condicionado de la línea realizando ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal D5F8 (gentilmente cedido por la Dra. Françoise Capony), que reconoce esta enzima. Como se puede ver en la fig 22b el anticuerpo reconoce en el medio condicionado por la línea la proCatepsina D de PM 52kD. Por otro lado, en las células se puede encontrar la forma madura de la Catepsina D de PM 34kD.

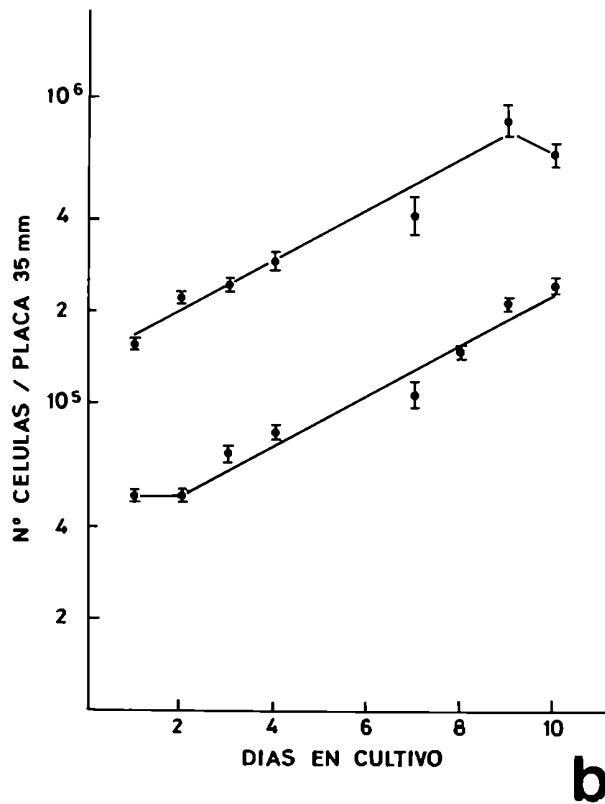
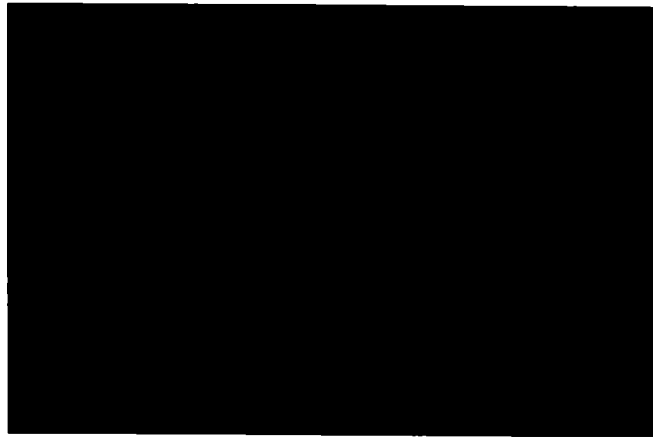
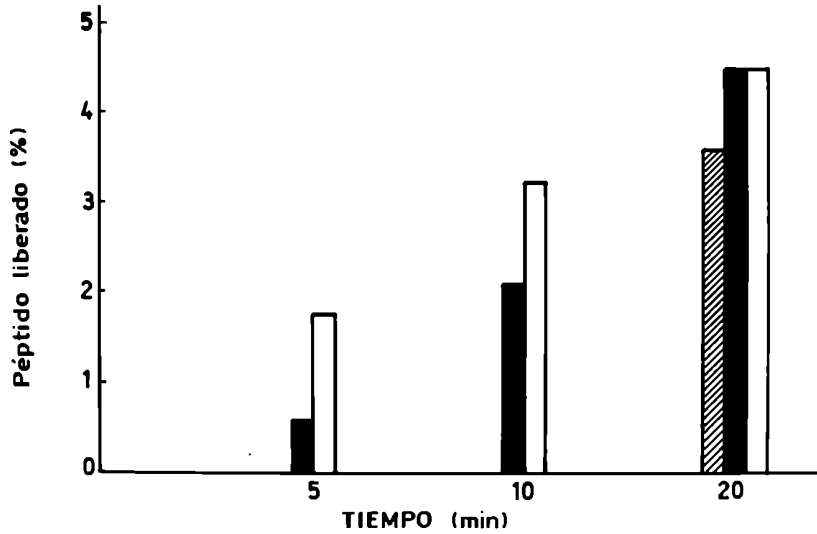


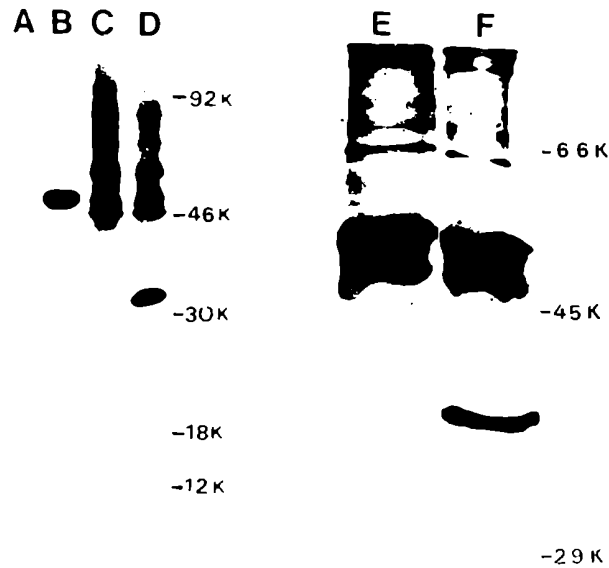
Figura 21.-

a) Marcación con (3H)timidina de la línea IIB-MEL-J (aumento 100x).

b) Características del crecimiento de la línea IIB-MEL-J. Se sembraron 50000 y 150000 células por placa de petri. A los tiempos indicados los cultivos fueron tripsinizados y se contaron las células en cámara de Newbauer. El resultado mostrado es el promedio \pm SD de dos experimentos.



a



b

Figura 22.-

a) Actividad proteolítica del medio condicionado por la línea IIB-MEL-J. Los péptidos liberados fueron determinados en los tiempos indicados usando hemoglobina como sustrato. Volumen de medio condicionado.-Barras negras:0,5ml. Barras blancas:0,25ml. Barras rayadas:0,1ml.

b) Inmunoprecipitación de las proteínas reconocidas por el anticuerpo D5F8.

Después de marcar con (³⁵S)metionina las células de la línea IIB-MEL-J, el medio condicionado (A,B) y el extracto celular (C,D,E,F) fueron obtenidos y se los enfrentó al anticuerpo D5F8 (B,D,F) o a PBS (A,C,E) para el ensayo de inmunoprecipitación.

3.- BUSQUEDA DE LA CELULA TRONCAL

3a.- METASTASIS GANGLIONARES

Con el fin de separar las subpoblaciones que forman parte del tumor, encaramos la purificación de las células tumorales usando gradientes de Ficoll-Hypaque y luego de este proceso se pasaron estas células por gradientes de Percoll para separar las subpoblaciones celulares. Se descongelan células provenientes de metástasis ganglionares y se realizan gradientes de Ficoll-Hypaque para purificar las células tumorales, una vez obtenidas se las lava con PBS y se las deja recuperarse por 12 horas en estufa gaseada, luego se realiza el gradiente de Percoll; la recuperación final es de solo el 6% de las células totales. De esta manera, el resultado que se obtuvo fue de tan pocas células tumorales que difícilmente pudimos realizar suficientes ensayos. Por lo tanto, dejamos de lado esta aproximación al problema y decidimos trabajar con todas las células que provenían de la metástasis. En una segunda etapa trabajaríamos con células tumorales purificadas y líneas celulares.

Así, en esta primera etapa, al trabajar con todas las células que provenían de las metástasis y sembrarlas en el gradiente directamente obtuvimos un porcentaje de recuperación del 60 al 70 %, vimos que podíamos separar diversas subpoblaciones que al caracterizarlas dieron positivas para S100 de manera heterogénea, esto es, en el

preparado no todas las células eran positivas para S100, mientras todas las células fueron positivas para queratinas (Tabla XIV). En la figura 23 se pueden ver los perfiles obtenidos de los gradientes hechos para cada tumor, cada una de las subpoblaciones se rotula con Nos. romanos de 0 a V, según la densidad en la que bandean las células.

Tabla XIV.-

Subpoblación	Densidad(g/ml)
0	1,03
I	1,04
II	1,05
III	1,06
IV	1,07
V	1,08

QUERATINAS:

Todas las subpoblaciones son positivas en un 100%.

S100:

Porcentaje de células positivas en cada subpoblación

	0	I	II	III	IV	V
Tumor 1	100	100	100	100	No hay	No hay
Tumor 2	0	100	6	100	100	No hay
Tumor 3	No hay	ND	100	100	100	100
Tumor 4	30	30	100	100	100	No hay

Se realizaron dos controles para asegurar que la heterogeneidad que veíamos no era debida a un artefacto: El primero de ellos fue trabajar con células descongeladas de un mismo tumor que proviniera de la disgregación enzimática y de la mecánica, en el caso del tumor 1 vemos que se obtienen perfiles parecidos en un caso y en el otro (figs. 23a y 23e), lo que nos lleva a decir que la forma de disgregación del tumor no afecta el tipo de subpoblaciones

que se obtienen. El segundo consistió en realizar un gradiente para el mismo tumor con las células frescas y descongeladas, como vemos en el caso del tumor 3 (figs. 23c y 23f) el perfil es aproximadamente el mismo en ambos casos, lo cual nos dice que el descongelamiento no produce ninguna alteración en cuanto al tipo de subpoblaciones que se obtienen. Así podemos asegurar que la heterogeneidad que vemos es propia del tumor.

En algunos casos se tuvieron dificultades para realizar el gradiente debido a la facilidad que tienen estas células en agruparse, en ese caso la experiencia se descartó puesto que es importante que la suspensión celular esté compuesta por células aisladas.

3b.- LINEA IIB-MEL-J

Estudiamos la presencia de subpoblaciones tanto en el tumor fresco como en la línea en cultivo: al disgregar la células provenientes del tumor fresco se realizó un TLI con el objetivo de ver que subpoblación puede preferentemente proliferar in vivo, como vemos la fracción III tiene un TLI que es doble del que se obtiene con las células del resto de las subpoblaciones (Tabla XV), inclusive mayor que el TLI que se obtiene con las células totales, así, en esa densidad sedimentan células que están proliferando de manera preferencial al resto.

Tabla XV.-

Subpoblación	TLI tumor fresco	TLI IIB-MEL-J	No. células marcadas IIB-MEL-J
I	2,4%	5,6%	2240
II	3,7%	10,9%	41420
III	11,0%	24,5%	254800
IV	2,7%	27,0%	145800

Al realizar el gradiente de la línea IIB-MEL-J se observó que había presentes cuatro subpoblaciones (fig. 24a), aunque una de ellas, la I fue en un principio despreciada debido al bajo porcentaje de células que la formaban. La subpoblación III es la que se encuentra en mayor porcentaje (Tabla XVI).

Tabla XVI.-

Subpoblación	I	II	III	IV
No. de células.	2%	19%	52%	27%

Al realizar el TLI con la línea celular solo el 24,5% (Tabla XV) de las células de la banda III se marcan en un ensayo de 18 horas, lo que corresponde a 254.800 células marcadas sobre un total de 2×10^6 células, por lo que si bien el mayor número de células marcadas se ve en la banda III, no todas las células que están en esa banda se marcan, ni todas las células marcadas de la línea van a esa banda. Cuando se realiza un ensayo en donde se precipita el DNA luego de la incorporación de la timidina, trabajando con la línea celular IIB-MEL-J se puede observar que la fracción III es la que se marca preferencialmente (fig. 24b).

En cuanto a la caracterización de las subpoblaciones que componen esta línea, se realizaron estudios trabajando con anticuerpos anti-S100, anti-queratinas (filamentos intermedios tipo queratinas = IF), anti-GD₃ y anti-GD₂. En la Tabla XVII se puede observar el resultado obtenido.

Tabla XVII.-

Subpoblacion	S100	IF	GD ₂	GD ₃
	(porcentaje, promedio \pm SD)			
I	100	100		97,3 \pm 1,0
II	100	100	1,7 \pm 0,3	1,9 \pm 0,9
III	100	100	78,0 \pm 2,6	80,8 \pm 3,5
IV	100	100	89,6 \pm 0,3	75,0 \pm 0,5
Cel.totales	100	100	72,4 \pm 0,5	75,0 \pm 0,5

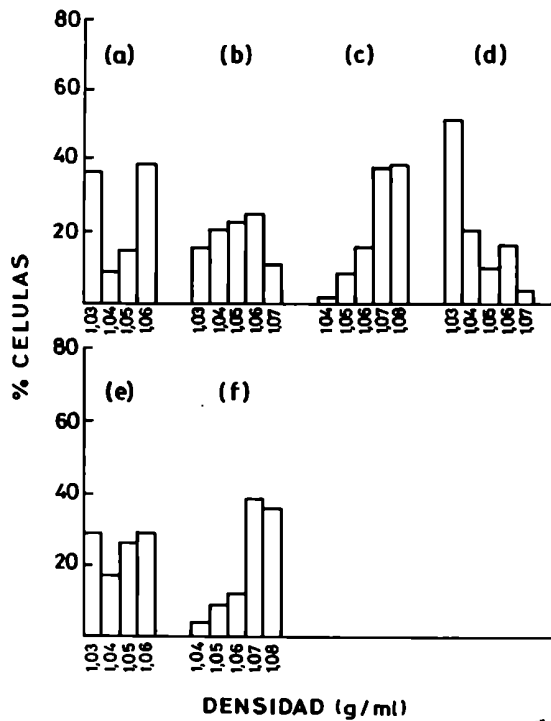
Buscando que subpoblación es la que contiene las células madres del tumor, realizamos dos tipos de aproximaciones, una fue trabajar con la línea como un todo, y la otra trabajar con las subpoblaciones por separado.

3c.-PRIMERA APROXIMACION

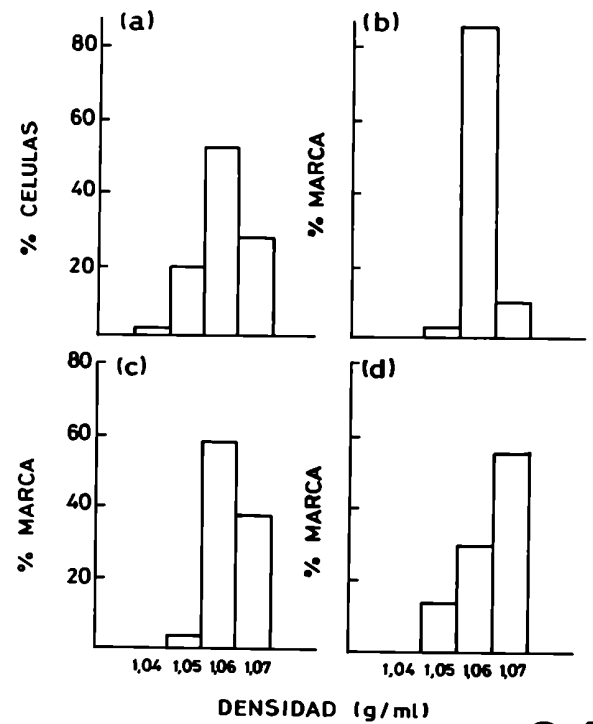
En cuanto a la primera aproximación realizamos dos tipos de ensayos:

3ci.- Ensayo de pulso y caza:

Como podemos ver en la figura 24, la marca que se encontraba en la fracción III pasa al resto de las fracciones durante el período de una semana en que la línea se mantiene en cultivo. Este estudio fue realizado separando las subpoblaciones en gradientes de Percoll.



23



24

Figura 23.- Perfil de los gradientes de percoll realizados con células provenientes de una disgregación enzimática de metástasis ganglionares: a) Tumor 1, b) Tumor 2, c) Tumor 3, d) Tumor 4. e) Disgregación mecánica-Tumor 1, f) Células no congeladas-Tumor 3.

VER EXPLICACION EN RESULTADOS

Figura 24.- Perfil del gradiente de percoll realizado con la línea IIB-MEL-J.

a) No. de células por subpoblación

Ensayo de pulso y caza: b) marca incorporada por subpoblación a tiempo= 0, c) marca remanente a tiempo= 4 días, d) marca remanente a tiempo= 7 días.

3cii.- Diferenciación con agente externo:

Tratamos las células con un agente diferenciante, como es la L-Tirosina y vimos que efecto producía en el patrón de las subpoblaciones. El efecto de agregar diferentes concentraciones de tirosina sobre la línea IIB-MEL-J fue ensayado en experimentos preliminares. Después del agregado de la tirosina, el pH fue ajustado a 7,6 para evitar la diferenciación debido a un aumento del pH extracelular (ref. 63). Después de 4 días en cultivo se pudo observar que 1mM de tirosina no causó diferencias con respecto al cultivo control, 3mM de tirosina como concentración final ocasionó algunos cambios morfológicos en las células (fig. 25), a concentraciones igual a 7,5mM o mayores se inducía lisis celular generalizada. El efecto de la tirosina 3mM sobre el crecimiento del cultivo fue estudiado en detalle y se observó que después de una pérdida inicial de células se produjo una drástica disminución en la velocidad de crecimiento (fig. 26). Dado que no se observaron células muertas flotando en el medio como consecuencia de la acción de la tirosina, es poco probable que el frenado del crecimiento se deba a pérdida celular.

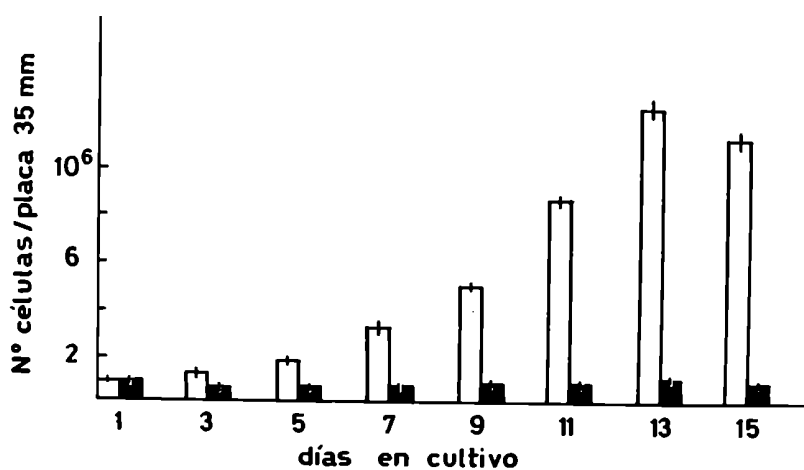
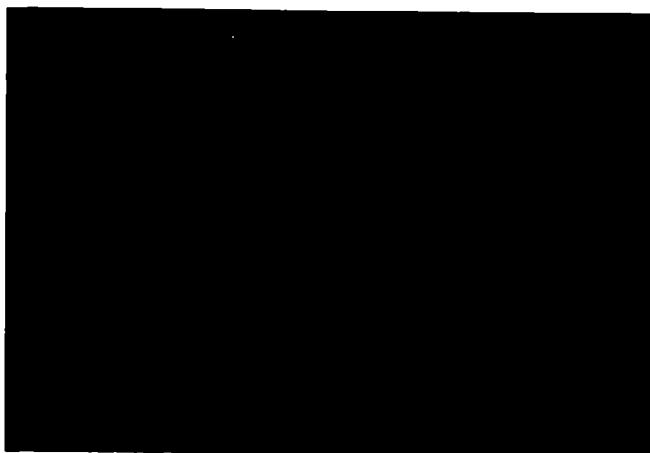
El efecto del tratamiento con L-Tirosina sobre el equilibrio de las subpoblaciones de la línea IIB-MEL-J fue estudiado utilizando la técnica de gradientes de Percoll. Después del tratamiento ocurrió una disminución progresiva de la subpoblación III (fig. 27).

Debido a que la tirosina produce un profundo cambio en la velocidad de crecimiento y morfología de la línea IIB-MEL-J fue considerado conveniente medir la expresión de un marcador antigénico accesible, como ser GD₃, con la expectativa de ver si por lo menos alguna de las características de la línea se mantenía constante. La expresión de gangliósidos GD₂ y GD₃ está frecuentemente aumentada en el melanoma humano y en nuestro laboratorio mostramos que todas las subpoblaciones de la línea IIB-MEL-J, con excepción de la subpoblación II, los expresan (ver sección 3.b.). Así, se determinó la expresión de dicho marcador en las subpoblaciones aisladas antes de tratar la línea con L-tirosina y después del tratamiento,

Como se puede observar en la tabla XVIII el tratamiento con L-tirosina no altera esta característica.

Tabla XVIII.-

	Subpoblaciones			
	I	II	III	IV
Control	97,3±1,0	1,9±0,9	80,0±3,5	97,3±0,9
L-Tirosina (14 días)	97,6±2,4	7,0±0,3	89,0±3,0	67,5±0,5



26

Figura 25.- Efecto de la L-Tirosina sobre la línea IIB-MEL-J. Tratamiento realizado por 14 días (aumento 400x). Comparar la morfología con la fig. 18.

Figura 26.- Efecto de la L-Tirosina sobre el crecimiento de la línea IIB-MEL-J. Las células fueron cultivadas en ausencia (Barras blancas) o presencia (Barras negras) de L-Tirosina 3mM concentración final. A los tiempos indicados los cultivos fueron tripsinizados y el número de células fue determinado en cámara de Neubauer. El resultado mostrado es el promedio \pm SD de dos experimentos diferentes.

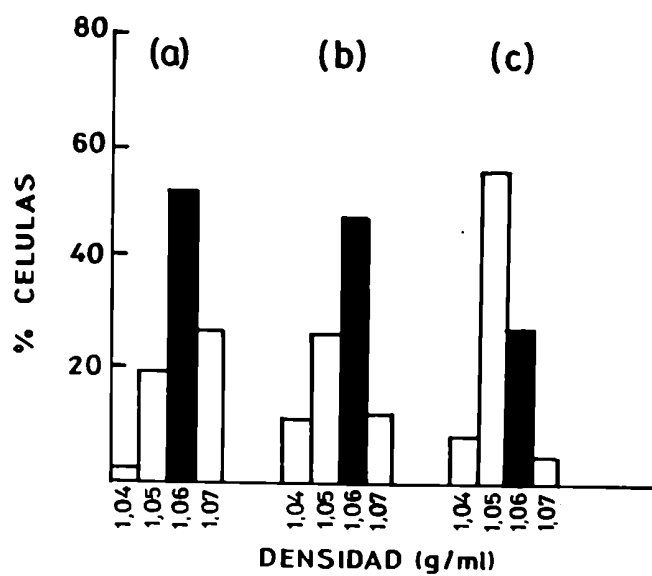


Figura 27.- Perfil de los gradientes de percoll de la línea IIB-MEL-J en a) crecimiento exponencial, b) tratada con L-Tirosina 3mM por 7 días, c) tratada con L-Tirosina 3mM por 14 días.

3d.- SEGUNDA APROXIMACION

En cuanto a la segunda aproximación, en ensayos preliminares intentamos corroborar el modelo en donde la III sería la subpoblación que contiene las células madre. Sembramos la subpoblación III aislada y, después de una o dos semanas de cultivo se realizaron gradientes de Percoll (fig. 28), como se puede observar solo a las dos semanas se reproduce el patrón original. El tratamiento con L-tirosina de esta subpoblación inhibe su crecimiento: al sembrar 1×10^6 células en medio completo al que se le agregó L-Tirosina, se obtuvieron 945000 células luego de dos semanas de cultivo, mientras que cuando se sembraron 200000 células en medio completo (control) se obtuvieron al final de las dos semanas de cultivo $2,9 \times 10^6$ células. Por otro lado, el tratamiento provoca un incremento de la subpoblación II respecto del control (fig. 28).

Con posterioridad se realizó el clonado de cada subpoblación, ello fue realizado en agar o por dilución límite.

3di.-Clonado en agar:

En primer término se intentó crecer en agar las células totales, como resultado se obtuvo que un $7,1 \pm 0,7$ % de las células sembradas generaron colonias formadas por más de 30 células (fig. 29a). Al estudiar la capacidad de formar colonias por parte de las subpoblaciones aisladas (Tabla XIX), vemos que la subpoblación III sería la que posee mayor

índice clonogénico y, la subpoblación I la que tiene menor capacidad de crecer en agar.

Tabla XIX.-

	Promedio del No. de colonias \pm SD			
Subpoblación	I	II	III	IV
No. de colonias	3,0 \pm 04 α	7,7 \pm 0,5	16,8 \pm 2,1	10,1 \pm 04

α) Los resultados estan expresados como porcentajes del número de células que desarrollan colonias.

Para investigar si la L-tirosina modificaba la capacidad de las subpoblaciones formar colonias en agar se realizaron dos tipos de ensayos:

a) Efecto de la L-Tirosina 3mM sobre las subpoblaciones separadas y sobre las células totales no fraccionadas. Se sembraron las células en el agar y se trató con el reactivo, como se puede observar en la tabla XXA una importante pérdida de la capacidad clonogénica ocurre tanto en las células no fraccionadas como en las subpoblaciones aisladas, observándose un efecto máximo en las subpoblaciones II y III y mínimo en la subpoblación IV.

b) Por otro lado, se analizó la reversibilidad (Tabla XXB) del efecto de la L-tirosina, en este caso los cultivos se permitieron crecer por 15 días en presencia de L-tirosina 3mM, y luego de ello las diferentes subpoblaciones se sembraron en agar sin el agregado extra de tirosina. La inhibición del índice clonogénico fue entre el 72 y 100%, por lo que puede concluirse que bajo estas condiciones el

efecto de la L-tirosina es irreversible(fig. 29b,c).

Tabla XX.-

Subpoblación	A		B	
	Número de colonias	Inhib. (%)	Número de colonias	Inhib. (%)
I	1,9±0,1	33	0,25±0,1	92
II	2,6±0,1	66	0,9±0,2	88
III	7,0±0,9	58	4,7±0,3	72
IV	9,9±0,1	2	0	100
Cel. totales	4,7±0,4	34	1,0±0,1	86

A) Las células fueron sembradas en agar y tratadas con 3mM L- Tirosina a partir del día 0. Dos experimentos fueron realizados en duplicado.

B) Cultivos que crecían exponencialmente fueron tratados con 3mM L-Tirosina por 15 días, despues de ello, las subpoblaciones fueron separadas y sembradas en agar sin agregado de L- Tirosina. Dos experimentos fueron realizados en duplicado.

3dii.- Clonado por dilución límite:

En segundo término se realizó el ensayo de clonado por dilución límite de cada subpoblación. Para ello, se sembraron las células con medio fresco y medio condicionado de la línea IIB-MEL-J en una relación 1:1 para evitar problemas con el condicionamiento del medio, puesto que el medio a usar tendría que ser aquel que fuese común a todas las células de la línea. El crecimiento se permitió por dos meses, al cabo de los cuales se realizó un gradiente de los clones que crecieron, solo crecieron clones en los pocillos donde se sembraron células provenientes de la subpoblación III y, como se observa en la figura 30 los tres clones dieron el mismo tipo de patrón para las subpoblaciones que

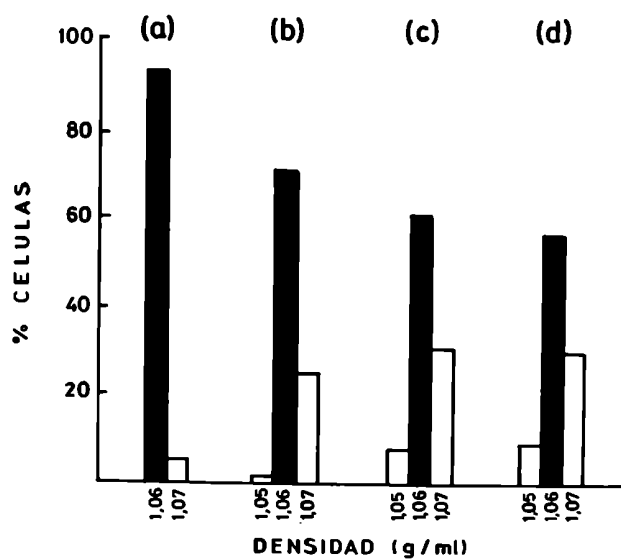
cuando se cultivan las células totales. Es interesante notar que en algunos pocillos se obtuvieron células con morfología de dendrita y pigmentadas, lo cual nos dice sobre la capacidad de estas células para generar melanina (fig. 31) aún estando clonadas.

4.- IMPORTANCIA DE LA MELANINA EN EL MODELO

Al estudiar la heterogeneidad celular del tumor nos pareció importante considerar la pigmentación del mismo, dado que hasta hoy se ha definido arbitrariamente que melanomas pigmentados serían diferenciados mientras que los no pigmentados serían indiferenciados y, esta característica se correlaciona con la capacidad proliferativa (ref. 64). En nuestro caso, al separar las subpoblaciones por Percoll nos encontramos que la fracción IV poseía un gran número de células pigmentadas (18%) mientras que las subpoblaciones II y III apenas tenían 1,1% y 5,6% respectivamente, de células pigmentadas. En estado estacionario la pigmentación se hacía visible al microscopio óptico, por lo que decidimos realizar un gradiente de la línea en estado estacionario y como se puede observar en la figura 30b la subpoblación IV alcanza a ser un 55,3% de las células totales.

Aunque ha sido descripto que el agregado de L-Tirosina al medio de cultivo de líneas de melanoma produce un aumento de

la producción de melanina (ref. 65), en nuestro caso no fue así (fig. 25). La actividad de la enzima tirosinasa fue medida y luego de 14 días de tratamiento con L-tirosina solo se observó un incremento de 1,5 veces de la actividad enzimática respecto de las células no tratadas (células tratadas = $[1,25 \pm 0,05] \times 10^{-3}$; células control = $[0,85 \pm 0,02] \times 10^{-3}$). En el caso de la subpoblación III, cuando la línea se encuentra en fase estacionaria o luego del tratamiento con tirosina, no se observa incremento del número de células pigmentadas en ella respecto de cuando la línea está en crecimiento exponencial.



28



Figura 28.- Perfil de gradientes de percoll de la subpoblación III en cultivo. la subpoblación III se siembra y luego de a) una semana o b) dos semanas, se realiza el gradiente.

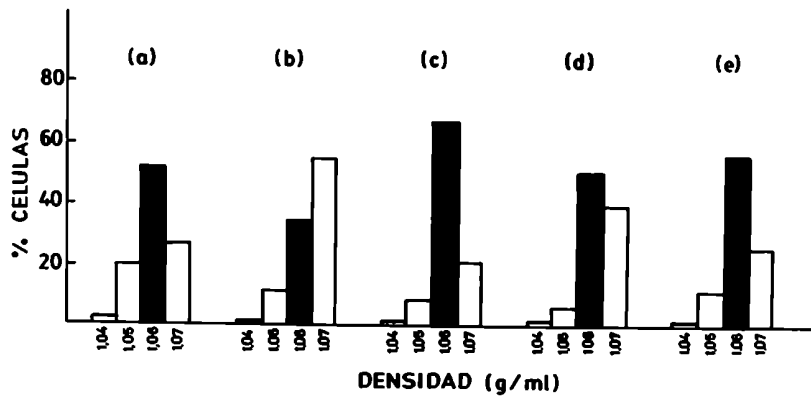
La subpoblación III se siembra y se incuba con L-Tirosina 3mM por a) una semana o b) dos semanas ,posteriormente se realiza el gradiente.

Figura 29.- Colonias en agar formadas por la línea IIB-MEL-J.

Las fotografías fueron tomadas a los 15 días de sembrarse las células .

a y b) Las células sembradas fueron tomadas de cultivos en crecimiento exponencial.

c) Las células sembradas fueron tomadas de cultivos tratados por 14 días con L-Tirosina 3mM.



30

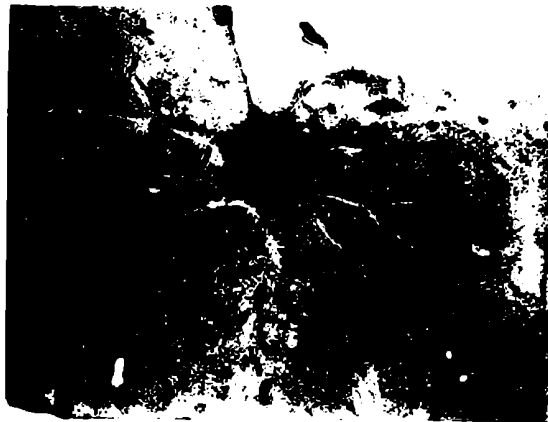


Figura 30.- Perfil de los gradientes de percoll para la línea IIB-MEL-J en a) crecimiento exponencial, b) fase estacionaria.

La subpoblación III fue clonada y las líneas obtenidas dieron los perfiles observados en la figura (c=clon 1, d=clon 2, e=clon 3)

Figura 31.- Célula obtenida luego del clonado de la subpoblacion III, de este pocillo no se pudo obtener ninguna línea (aumento 100x).

DISCUSSION

Aunque varias líneas celulares de melanoma humano han sido descritas (ref. 21,66) hasta ahora, ellas tienden a ser homogéneas desde el punto de vista morfológico.

En esta tesis describo una nueva línea de melanoma humano que presenta heterogeneidad morfológica reproducible. Dado que múltiples fenotipos celulares fueron observados inmediatamente después de sembrar las células en el frasco de cultivo, dicha heterogeneidad se encontraría en el tumor original y no como consecuencia de mutaciones que frecuentemente aparecen después de largos períodos de crecimiento *in vitro*. Esta línea celular fue llamada IIB-MEL-J.

Durante el tiempo en que se realizó esta tesis se establecieron dos líneas celulares, que llamamos IIB-MEL-J e IIB-MEL-T.

Comparando las figuras que corresponden a dichas líneas se puede observar la diferencia de morfología entre ellas observada al microscopio óptico, estas diferencias fueron coincidentes con el comportamiento del tumor *in vivo*. En el caso de la línea IIB-MEL-T donde las células son parecidas a fibroblastos las metástasis del paciente eran de tipo fibroso derivando la línea de una metástasis subcutánea, mientras que para la línea IIB-MEL-J se veían células gigantes en el tumor cuando se realizó la disgregación, así como se observan en cultivo.

Debido a la gran heterogeneidad morfológica y cromosómica

que presentó la línea celular IIB-MEL-J nos remitimos a estudiar solo esta línea como modelo del melanoma humano, como ya fue comentado en RESULTADOS. Por lo tanto, en esta discusión solo se comentarán los resultados obtenidos con esta línea celular.

Se puede observar que la línea celular IIB-MEL-J expresa tanto filamentos intermedios de queratina como la proteína S100. Resultados similares fueron obtenidos previamente con la línea de melanoma humano M5 por Trejdosiewicz et al (ref.60), quien sugirió que las células de melanoma pueden expresar queratina debido a una reversión parcial a la forma embrionaria. En cuanto a la proteína S100, ella ha sido descrita como marcador característico de melanoma (ref. 59). Es un marcador antigénico que se usa como rutina en el laboratorio de patología para el melanoma humano, aunque se ha mostrado que existen células dentro de cada tumor que no expresan esta proteína. La proteína S100 se encontró en diferentes cantidades en el lisado de seis líneas de melanoma que fueron analizadas, mientras que no fue detectada en siete líneas de carcinoma de origen no neuroectodérmico (ref. 67). La proteína S100 también se secreta al medio de cultivo (refs. 68). En realidad S100 forma una familia de proteínas que se encuentran en células de glía, epiteliales y de estirpe melanocítica. Muchas de las proteínas de la familia son expresadas en una fase

particular del ciclo celular y en eventos que incluyen la diferenciación del tipo celular y/o la diferenciación morfológica de un determinado tipo celular, algunos grupos han mostrado que la expresión de algunas de ellas están relacionadas con la diferenciación en el sistema nervioso(ref. 69). En el melanoma no se ha mostrado ninguna correlación sobre su expresión y diferenciación celular del tumor.

Los gangliósidos podrían favorecer el crecimiento de los implantes primarios y de las metástasis de melanoma (ref. 70). Recientemente se mostró la correlación entre diferentes parámetros de la enfermedad, como son: sitio de la metástasis , tamaño y pigmentación de la misma, así como histopatología del tumor primario con la presencia de gangliósidos en las células de melanoma. Este estudio realizado en 52 pacientes y 28 líneas celulares mostró que GM₃ y GD₃ serían los gangliósidos expresados preferencialmente en el tumor (ref. 71). Comparando tejidos normales y neoplásicos se observa que en los melanocitos normales la expresión de GM₃ es de 90% mientras que el GD₃ solo se expresa un 2%, siendo para los melanomas la relación GD₃:GM₃ de 60% : 30% (ref. 72). Así, alta concentración de GM₃ correlacionaría con un buen pronóstico de la enfermedad. Por otro lado, no habría preferencias en cuanto a la expresión de los gangliósidos según de donde haya sido tomada la metástasis (nódulo linfático o tejido subcutáneo).

Los gangliósidos GD₂ y GD₃ (ref. 73) son altamente expresados por la mayoría de las células de la línea, con excepción de la subpoblación II, cuyo significado todavía no es claro.

Diferentes grupos han estudiado los antígenos marcadores presentes en las células de melanoma (ref. 74).

El receptor de EGF (ref. 24) se ha planteado como posible marcador de la diferenciación celular, este estudio se realizó creciendo líneas celulares de melanoma en un medio libre de suero que solo contenía insulina, transferrina y selenito, dando como resultado que el receptor de EGF se expresaría en líneas celulares del tipo indiferenciadas. Sin embargo, este resultado deja dudas dado que como criterio de diferenciación se utiliza exclusivamente pigmentación y morfología. Un estudio muy interesante fue el realizado por Herlyn en 1987, donde mostró que melanocitos normales capaces de dividirse en cultivo pueden producir los antígenos que se encuentran en las células de melanoma, dichos antígenos fueron el receptor del factor de crecimiento nervioso, el proteoglicano, el receptor de transferrina, los gangliósidos GD₂ y GD₃, y también HLA-DR, los cuales no se expresan en cortes de tejidos de melanocitos normales (ref. 75)

Durante el curso de esta tesis se obtuvieron anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes metástasis de melanoma, no distinguiendo sin embargo diferentes niveles de

Clark ni tipos celulares de melanoma primario. Ellos también reconocen células névicas y en un 100% a las células de la línea IIB- MEL-J. Aunque el antígeno reconocido por dichos anticuerpos se encuentra presente en tejidos de origen no neuroectodérmico, no está en los mismos tejidos en que se encuentra la proteína S100. Así, no hemos descripto un buen marcador para la diferenciación del melanoma maligno, sin embargo, consideramos que puede ser útil para el diagnóstico diferencial de la enfermedad la utilización del anticuerpo anti-S100 en conjunto con los anticuerpos IIB para el diagnóstico del melanoma maligno.

Ya en 1984 Koprowski comentó que en su laboratorio de 10000 hibridomas generados después de la inmunización de ratones con células de melanoma, solo 61 clones se unieron a las células de melanoma(ref. 76). Es de destacar que el marcador que nosotros describimos sería nuevo para el melanoma maligno (ver refs.77-80). Este antígeno se expresa en todas las células de la línea IIB-MEL-J, tanto cuando ellas están en estado exponencial como cuando se las diferencia con L-Tirosina, sugiriendo que no sería un antígeno implicado en la diferenciación ni relacionado con una etapa particular del ciclo celular. De hecho, nuestro anticuerpo no reconoció todos los melanomas que se probaron, pero ello difícilmente pueda correlacionarse con el estadio de diferenciación del tumor (ref. 81).

Es interesante notar que la línea IIB-MEL-J secreta al

medio de cultivo pro-Catepsina D, una proteasa que podría ser importante en la capacidad metastásica del tumor. Ya ha sido mostrado por diferentes autores la importancia de la secreción de proteasas durante el proceso metastásico. La catepsina D es una enzima altamente distribuida en las células humanas, ha sido encontrada en eritrocitos, hígado y tiroide, tanto asociada a lisosomas como a la membrana celular (ref. 82). Por otro lado, la enzima es secretada al medio de cultivo por parte de cultivos primarios de mama, fibroadenomas y carcinomas (ref. 83). En nuestro caso la proteína secretada tiene un peso molecular de 52kD, que anteriormente ya fue descrito para el precursor de la Catepsina D por el grupo de Rochefort, para la línea celular MCF-7. Este precursor no se encontró en los extractos celulares y es secretado por la línea MCF-7. La enzima madura, con un peso molecular de 34kD se encuentra en los extractos celulares, tanto en la línea IIB-MEL-J como en la línea MCF-7. Tanto la proenzima como la enzima madura pueden ser reconocidas con el anticuerpo monoclonal D5F8 (ref. 84). La posibilidad de que esta proteasa actúe *in vivo* todavía queda por ser estudiada, ya que se ha planteado que estas proteasas actuarían en un bolsillo tumoral degradando las proteínas de la matriz extracelular, la cual es atravesada por las células tumorales durante la metástasis (ref. 85). Experimentos en el sentido de comprobar la acción de la enzima secretada por parte de la línea MCF-7 fueron llevados

a cabo por Capony et al.(ref. 86) mostrando la actividad proteolítica de la misma sobre matriz extracelular de endotelio bovino.

El análisis citogenético de la línea IIB-MEL-J reveló diversas aberraciones comunes y no comunes asociadas a melanoma humano. Se ha mostrado que estudiando células de melanoma maligno de diferentes lesiones metastásicas del mismo paciente y del tumor primario, las anomalías características del tumor primario aparecen en las metástasis, siendo que en las metástasis aparecen además nuevas alteraciones (ref. 87). Las alteraciones características del tumor primario del melanoma son en los cromosomas 1 y 6, mientras que en las metástasis están ubicadas en los cromosomas 1, 6, y 7 (refs. 88,89). Los estudios de cariotipo realizados muestran que los cromosomas mas frecuentemente involucrados en rearrreglos en la línea IIB-MEL-J correlaciona con los ya descriptos anteriormente tanto en melanomas primarios como en lesiones metastáticas.

Los rearrreglos en el cromosoma 6 y en especial los isocromosomas de tipo 6p han sido descriptos en varias oportunidades. Se ha sugerido que los puntos de ruptura cercano al MHC, que mapea en el 6p21, pueden contribuir a la persistencia de este tumor y a las alteraciones que se observan en los antígenos HLA, siendo conocido que las células de melanoma expresan HLA-DR (refs. 90,91).

La expresión de oncogenes celulares no correlacionaría con el fenotipo metastásico en el melanoma maligno, aunque Albino ha mostrado que el oncogen H-ras (cromosoma 11) es importante en el desarrollo del melanoma. La actividad del H-ras aparece como resultado mas que como causa de la transformación, puesto que melanocitos transformados con el oncogen poseen ciertas características de células tumorales como ser capacidad de crecimiento en agar e hiperdiploidia, pero no otras como ser tumorigenicidad, independencia de crecimiento en cultivo libre de factores de crecimiento y expresión de antígenos relacionados con el melanoma (ref. 92). Nosotros no estudiamos ni posible amplificación de oncogenes ni su expresión en esta línea. Se encontraron pérdidas del cromosoma 6 y deleciones 6q21 donde está localizado el oncogen MYB (ref. 93), sugiriendo que este oncogen no es esencial para el desarrollo de la enfermedad en este paciente.

Esta línea presenta cromosomas dobles diminutos como manifestación de la amplificación génica (ref. 94), y dado que el paciente del cual se obtuvieron las células no recibió terapia antes de retirar la lesión metastásica, lo observado se puede deber a una manifestación espontánea de mutación relacionada con la alta inestabilidad cromosómica. Además, entre los cromosomas que están aumentados se encuentra aquel que contiene el receptor del EGF, el cual tiene su gen localizado en 7p13-q22 y 7p12-pter (ref. 95),

aunque su rol en el melanoma maligno todavía no es claro (ref. 96). En nuestro caso, se puede especular que su presencia está relacionada con la dependencia de las células con el EGF para salir de quiescencia.

El requerimiento de factores de crecimiento por parte de la línea IIB-MEL-J fue estudiado por nuestro laboratorio. Se reserva el término factor de crecimiento para sustancias que estimulan el crecimiento pero no son nutrientes, los que se definen como sustancias que se usan dentro de la célula como substratos metabólicos o cofactores. Gey y Thalhimer fueron los primeros que mostraron que la insulina ayudaba a mantener el crecimiento de las células *in vitro*. Se ha mostrado que sobre fibroblastos humanos 40ng/ml de insulina y 2ng/ml de EGF inducen la iniciación de la síntesis de DNA. Resultados similares se han visto en otros tipos celulares, donde dichos factores de crecimiento inducen la proliferación (ref.97).

En nuestro caso vimos que para poder sacar las células de quiescencia se necesita la presencia de los factores de crecimiento EGF, transferrina e insulina en conjunto con el suero, aunque ellas pueden prescindir de dichos factores por algún tiempo si es que se encuentran en crecimiento exponencial. Esto sugiere que las células producirían sus propios factores de crecimiento que las ayudan a crecer. Los requerimientos de factores de crecimiento y suero en el medio en que crece la línea IIB-MEL-J, obtenida a partir de

una metástasis pulmonar 24 meses después de extirpado el tumor primario, contradicen los resultados obtenidos por Kath et al.(ref. 98) y sugiere la presencia de formas maduras de melanocitos dentro de las subpoblaciones que presenta esta línea y que todavía son dependientes de la acción de factores de crecimiento.

La línea de melanoma humano aquí descrita presenta una heterogeneidad morfológica relacionada con los tres estadios de diferenciación del melanocito (ref. 99). Esa heterogeneidad podría deberse a la presencia de varios clones y/o a la existencia de varios grados de diferenciación dentro de un solo clon. Las células tumorales clonadas pueden ser inestables; por el contrario, el comportamiento de líneas tumorales establecidas sin clonar y, que por consiguiente tienen la diversidad parental del tumor son mucho mas estables. Estas líneas "mezcladas" pueden transmitir mucho mejor sus características de comportamiento a sus descendientes y sucesivas generaciones (ref. 16). La línea celular IIB-MEL-J se mantiene en cultivo sin clonar.

Hasta ahora gran parte del desarrollo y avance en el estudio de esta enfermedad dependió de la pigmentación de las células porque no hay marcadores adecuados. Diferentes grupos han estudiado el tema de la diferenciación celular,

pero todos ellos se han basado en la morfología y pigmentación como criterio de diferenciación, aunque los datos no correlacionaran con la capacidad de proliferar. El grupo de Houghton et al (ref. 21) ha planteado como criterios de diferenciación: morfología, pigmentación y actividad de tirosinasa. Ha preparado diferentes anticuerpos monoclonales y estudiado la expresión de los antígenos que presentan diferentes líneas celulares establecidas en su laboratorio. Dichas líneas fueron obtenidas a partir de clones separados y son homogéneas en cuanto a morfología y capacidad de pigmentación. Se ha considerado que la célula no pigmentada y con morfología epitelioide corresponde a un tipo de célula indiferenciada o mejor dicho desdiferenciada que presenta marcadores únicos, mientras que la célula con morfología fibroblastoide y pigmentada sería diferenciada expresando marcadores que también están presentes en el melanocito normal maduro. Sin embargo, estos criterios no se correlacionaron con la proliferación celular. En un trabajo de Pezzuto (ref. 66) la actividad de tirosinasa no correlacionó con la capacidad de proliferación, puesto que líneas que tenían diferentes valores de actividad de la enzima mostraron el mismo tiempo de duplicación *in vitro* y la misma capacidad de generar tumor en ratones desnudos. Nosotros estudiamos la capacidad de pigmentación por parte de la línea IIB-MEL-J y observamos que, aunque la línea es amelanótica al microscopio óptico, es capaz de producir

melanina. Cuando la línea llega al estado estacionario la melanina ya puede ser observada a simple vista y con una simple tinción se evidencian las células que la acumulan. Por otro lado, cuando la línea se diferencia con un agente externo como ser la L-Tirosina no hay producción aumentada de la melanina. Este último resultado contradice el criterio utilizado hasta el momento como parámetro de diferenciación del melanoma maligno.

Ha sido planteado por Bennet que la capacidad de diferenciación de la línea celular de melanoma murino B16C3 corresponde a un modelo estocástico donde la célula se encuentra originalmente en un estado indiferenciado del cual puede pasar al estado diferenciado. En el estado diferenciado ella sería capaz de producir melanina y, por otro lado un inhibidor de la proliferación (ref. 23). Células pigmentadas obtenidas a partir de la línea amelanótica podían generar colonias no pigmentadas, mostrando que habría dos programas separados para la proliferación y la pigmentación. Esta fue la primera vez en que se sugirió que la producción de melanina podría ser un evento separado de la capacidad proliferativa.

Las células antes de entrar en la fase S del ciclo celular producen proteínas, algunas de las cuales son importantes para hacer que las células vayan de G1 a S. Si estas proteínas no se acumulan las células irían de de G1 a G0 (ref. 100). En el caso del melanoma maligno hay cada vez mas

evidencias que apoyan la hipótesis de que esta proteína no sería la melanina (ref. 101).

En nuestro caso los resultados obtenidos indican que la pigmentación no correlaciona con la capacidad de proliferación del melanoma. Cuando ocurre la diferenciación con un agente externo como es la L-Tirosina, precursor de la melanina, no hay producción aumentada de melanina. De esta manera, se modifica el programa para la división celular pero se mantiene el programa para la producción de un metabolito característico de la célula de melanoma como es la melanina. Así, entonces se puede decir que dichos programas son independientes y que el agente externo solo afecta el programa de proliferación en el tumor. En dos condiciones de no crecimiento, como ser estado estacionario y diferenciación por L-Tirosina, la línea se comporta de modo diferente respecto de la capacidad de producir melanina. Es interesante notar que las células de melanoma no sintetizan la enzima tirosinasa en un medio que contiene glucosa cuando se encuentran en estado estacionario, pero sí lo hacen si la glucosa es reemplazada por galactosa, o galactosa es agregada al medio de cultivo. Por lo tanto, el gen de la tirosinasa es activado o inactivado dependiendo del tipo de azúcar que exista en el medio de cultivo (ref. 102). En nuestro caso es importante puntualizar que el medio de cultivo fue suplementado con galactosa de tal forma que las células serían capaces de sintetizar la enzima.

Estudios anteriores (ref. 103) han mostrado que células de melanoma de hamster que son amelanóticas *in vivo*, al ser transferidas a un frasco de cultivo en un medio similar al que nosotros trabajamos, ven aumentada la actividad de tirosinasa al principio. En los primeros días se observa la aparición de melanina como consecuencia de la presencia de melanosomas, después de que se vuelven fuertemente pigmentadas se despegan del frasco de cultivo y las células despegadas no son capaces de proliferar. Las pocas células que quedan pegadas dan lugar a líneas amelanóticas con una baja cantidad de melanina en comparación con el cultivo primario. Esta variabilidad de las células de melanoma de hamster detectada solamente *in vitro* se atribuye a la heterogeneidad preexistente en los tumores transplantados *in vivo* en el hamster.

La posibilidad de correlacionar pigmentación con proliferación resulta difícil frente a los resultados que se encuentran en la literatura y nuestros propios resultados. Se puede sugerir que la producción de melanina no guarda una relación de causa o efecto con la proliferación celular.

De esta forma, nosotros decidimos introducir un nuevo criterio como parámetro para la diferenciación celular del melanoma, el mismo consistió en la capacidad de proliferación. La línea celular IIB-MEL.-J posee un alto TLI, comparado con los valores informados para el melanoma humano (ref. 104), así como un alto índice clonogénico y, estos

fueron los ensayos utilizados para estudiar la proliferación de la misma.

En nuestro laboratorio se ha estudiado anteriormente la diferenciación en tumor de mama humano y se ha comprobado la teoría que postula una probable célula madre o troncal como responsable del crecimiento agresivo del tumor (ref. 28). La célula madre o troncal se define operacionalmente como aquella que es capaz de ser clonada y que puede crecer en agar. Nosotros agregamos a esta definición que la célula troncal también sería capaz de generar subpoblaciones mas diferenciadas que ella, que formarían parte del tumor.

En otros tipos de tumores, como ser el carcinoma escamoso, se ha comprobado la diferenciación celular en el tumor. A ratas con tumor transplantado se les dió (3H)timidina y se siguió la marca por autorradiografía, cuando se examinaron los tumores dos horas después de la inyección, la mayoría de las células marcadas eran células indiferenciadas puesto que tenían alta capacidad de proliferación; 96 horas después la marca se ve en los queratinocitos, ellos serían las células diferenciadas que derivaron de las células marcadas inicialmente. Cuando se transplantaron dichos queratinocitos, no fueron capaces de generar un tumor. Los queratinocitos del tumor se diferencian a partir de las células indiferenciadas, son postmitóticos y no tumorigénicos (ref. 105).

En nuestro estudio trabajamos en un principio con metástasis ganglionares, y pudimos observar que ellas estaban compuestas por varias subpoblaciones separables en función de la densidad de flotación de las células que contenían. Estas subpoblaciones eran heterogéneas en cuanto a la expresión de la proteína S100, aunque homogéneas en cuanto a la presencia de citoqueratinas. La metástasis pulmonar que dió lugar a la línea IIB-MEL-J también contenía subpoblaciones de diferentes densidades de flotación. Cuando se estudió la capacidad de proliferación del tumor se observó que la subpoblación III de esta metástasis se marcaba preferencialmente con (3H)timidina, sugiriendo una diferencia en cuanto a la capacidad de proliferación por parte de las subpoblaciones entre si. Una vez establecida la línea IIB-MEL-J observamos subpoblaciones de las mismas densidades de flotación que en el tumor fresco. Ya no se observaron diferencias en cuanto al TLI que poseían estas subpoblaciones, aunque la subpoblación III era la que contenía la mayor cantidad de células marcadas. Este resultado se puede correlacionar con el hecho de que es esta subpoblación la que se encuentra en mayor proporción en cuanto al número de células en la línea en crecimiento exponencial. Estas subpoblaciones fueron heterogéneas en cuanto a la expresión de algunos marcadores y homogéneas en cuanto a la expresión de otros. No podemos sacar ninguna conclusión con respecto a este resultado, ya que como se

comentó anteriormente no hay un buen antígeno marcador para la diferenciación celular en el melanoma, ni nosotros tampoco pudimos reconocer alguno con los anticuerpos monoclonales que obtuvimos.

Nuestra primera especulación fue que esta subpoblación III contendría las células madres del tumor. Intentamos comprobar esta idea por dos aproximaciones diferentes.

Cuando trabajamos con la línea celular como un todo, en crecimiento exponencial (desdiferenciada) se pueden separar subpoblaciones con diferentes capacidades de proliferación. La marca de timidina que se encuentra en la subpoblación III pasa a las subpoblaciones II y IV a lo largo de una semana de cultivo.

El otro estudio realizado con la línea como un todo fue su diferenciación con un agente externo. Se ha mostrado que factores del medio ambiente afectan el crecimiento del tumor. Cuando se inyectan células de melanoma en la piel de un embrión, las células tumorales mueren (ref.106). El medio condicionado de la piel del embrión disminuye el crecimiento de la línea tumoral, y se postula que este efecto se debe a que las células tumorales se diferencian. Los factores de diferenciación serían responsables de frenar la proliferación celular, pero no de producir la lisis celular, por lo menos a una dosis dada. La dosis óptima de agente diferenciante se define como aquella que causa máxima inducción a la mínima toxicidad (ref. 107). Aparentemente el

agente diferenciante actuaría sin afectar la síntesis de RNA, que sería fundamental para la transcripción de la información asociada a la diferenciación. En nuestro caso el agente externo fue la L-tirosina, que provocó que la línea no creciera *in vitro* y perdiera la capacidad de crecer en agar. La formación de colonias en agar es un ensayo que se ha utilizado desde hace mucho tiempo para demostrar la tumorigenicidad de un cultivo celular (ref. 108). Un resultado negativo sugiere que el cultivo ensayado no es tumorigénico y está formado por células diferenciadas terminales . Podemos sugerir de esta forma, que la L-Tirosina provoca la diferenciación de la línea celular dado que frena su crecimiento y evita la formación de colonias en agar.

Al estudiar el perfil de las subpoblaciones que se obtienen luego del tratamiento con L-Tirosina, se observa que la subpoblación III disminuye drásticamente. Dado que esta es la subpoblación que se marca preferencialmente con un precursor del DNA, podría ser considerada como responsable del frenado del crecimiento de la línea celular. La disminución de la subpoblación III ocurre con un aumento concomitante de las subpoblaciones I y II, lo cual puede ser asumido como que estas subpoblaciones contienen las células más diferenciadas. Esta presunción está avalada por los estudios realizados con las subpoblaciones por separado, ya que las subpoblaciones I y II tienen menor índice

clonogénico que las subpoblaciones III y IV. Se puede atribuir el crecimiento en agar de las subpoblaciones I y II a la reversibilidad en la diferenciación o a que las células diferenciadas no terminales pueden crecer en agar.

Un resultado muy importante fue el obtenido al realizar el clonado por dilución límite de cada subpoblación. Solo la subpoblación III pudo ser clonada a la densidad celular con la que trabajamos, y ella generó el mismo patrón de subpoblaciones que se observaron en la línea como un todo.

De esta manera, podemos decir que en la subpoblación III se encuentran las células madres del tumor. Sin embargo, no se puede asegurar que todas las células que existen en esta subpoblación sean células troncales, ya que no todas las células que bandean a la densidad de la subpoblación III se marcan con timidina ni tampoco todas generan colonias en agar. Esto sugiere que las células madres están impurificadas en la subpoblación III. Solo por clonado *in vitro* (a dilución límite) se pueden obtener células troncales puras.

En estudios anteriores se separaron las subpoblaciones de un tumor de ratón Balb/cFC3H y se observó la coexistencia de dichas subpoblaciones dentro del tumor por prolongados periodos (ref. 109), lo cual sugiere la existencia de mecanismos que mantienen la heterogeneidad y que habría fuerzas selectivas actuando con potenciales de crecimiento diferentes.

Por otro lado, trabajando con la línea M3, se mostró que las diferentes subpoblaciones que la componen no presentan diferencias significativas en cuanto a su capacidad metastatizante. Sin embargo, las subpoblaciones de menor densidad (alrededor de 1,04 g/ml) fueron menos tumorigénicas (ref. 110).

Finalmente, por clonado, se pueden obtener diferentes líneas celulares. Así se han obtenido líneas de melanoma murino B16-F1 al B16-F10 (ref. 111); cada línea provendría de un clon, y todas las líneas contendrían un solo tipo de subpoblación. La mezcla de varios clones de melanoma murino resultó en la estabilización de las propiedades metastásicas del tumor. La naturaleza del mecanismo de estabilización no es clara, aunque se ha sugerido que señales célula-célula pueden ser intercambiadas entre las poblaciones celulares. Estos resultados sugieren que la comunicación célula-célula puede ser uno de los procesos involucrados en estabilizar la generación de la diversidad celular y ello puede explicar la gran diversificación fenotípica existente cuando las células se separan y se permite la proliferación de las mismas por separado. Se ha propuesto que los mecanismos que producen la inestabilidad celular del tumor y la diversificación celular aseguran que los neoplasmas malignos contengan subpoblaciones fenotípicamente heterogéneas.

La línea IIB-MEL-J estaría compuesta por varias

subpoblaciones, que derivarían de las células madres que se encuentran en la subpoblación III. Esta línea estaría formada por un clon cuyas células troncales bandearían a la densidad de flotación de la subpoblación III, dado que solo las células de esta subpoblación se marcan preferencialmente con timidina y crecen cuando se clonan por dilución límite. Las células que se encuentran en las otras subpoblaciones, aunque son capaces de generar colonias en agar, no son capaces de generar líneas y por lo tanto no se las podría considerar clones diferentes.

CONCLUSIONES

Durante el período de esta TESIS se estableció una nueva línea celular, que llamamos IIB-MEL-J (ref. 28).

Ella fue un buen modelo para estudiar diferenciación en el melanoma humano. Por sus características pudo ser utilizada para estudiar la heterogeneidad tumoral y pudimos demostrar por primera vez, la no correlación entre pigmentación y proliferación celular (ref. 53).

Por otro lado, y no menos importante, pudimos mostrar la existencia de una subpoblación que contiene las células madres del tumor. Ellas tendrían alto índice de proliferación y serían capaces de generar las otras subpoblaciones que se encuentran en la línea. De esta manera se comprueba por primera vez para el melanoma la hipótesis que plantea que todo tumor estaría formado por célula madre y descendientes (ref. 108).

Finalmente, diferentes grupos han estudiado los marcadores que presenta el melanoma humano y, varios anticuerpos monoclonales han sido obtenidos contra los antígenos tumorales. Nosotros produjimos un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno no descrito hasta hoy para el melanoma maligno, que podría ser utilizado para el diagnóstico diferencial de esta enfermedad (ref. 81). Apoyamos la utilización de las citoqueratinas y la catepsina D (ref. 112) como marcadores tumorales, antígenos que solo recientemente se comienzan a utilizar en el diagnóstico del melanoma maligno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Capítulo 16, en *Molecular Biology of the Cell*, B. Alberts et al, Editorial Garland Publishing, Inc., 1986.
- 2.- Stem cell is a stem cell. A. Hall, *Cell*, 33: 11-12, 1983.
- 3.- Capítulo 12, SKIN, C. Cruickshank, en *Cells and Tissue Culture Methods, Biology and Physiology Volumen 2*, Editado por E.N.Willmer, Academic Press, London, 1965.
- 4.- Multiple transcripts of the mouse tyrosinase gene are generated by alternative splicing. S.Ruppert et al, *EMBO J.*, 7(9): 2715-2722, 1988.
- 5.- Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcript. G.Muller et al, *EMBO J.*, 7(9): 2723-2730, 1988.
- 6.- Isolation and sequence of cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. B.Kwon et al, *Proc. of Nat. Academy of Science USA*, 84: 7473-7477, 1987.
- 7.- Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. A.Korner and J.Pawelek, *Science*, 217: 1163-1165, 1982.
- 8.- Surface antigens of melanocytes and melanomas, markers of melanocytes differentiation and melanoma subsets. A.N.Houghton et al, *J. Exp. Med.*, 156: 1755-1766, 1982.
- 9.- Melanoma cells. J.Pawelek, *Methods in Enzymology*, LVIII: 564- 570, 1979.
- 10.- A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. C.Potten, R.Schofield and L.Iajtha, *BBA*, 560: 281-299, 1979.
- 11.- Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. G. Cotsarelis, *Cell*, 57: 201-209, 1989.
- 12.- Evidence that the process of murine melanoma metastasis is a sequential and selective and contains stochastic elements. J.Price, S.Aukerman and I.Fidler, *Cancer Res.*, 46: 5172-5178, 1986.

- 13.- Editorial. T. Das Gupta, M. Mastrangelo, *Seminars in Oncology*, 15: 493, 1988.
- 14.- Relationship between growth and differentiation of melanoma in vivo. Gray and Pierce, *J.Natl.Cancer Inst.*, 32: 1201-1211, 1964.
- 15.- Tumor subpopulation interaction in neoplasm. G.Hepner, B.Miller and F.Miller, *BBA*, 695: 215-226, 1983.
- 16.- Tumor heterogeneity. G.Hepner, *Cancer Res.*, 44: 2259-2265, 1984.
- 17.- The implication of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. I.Hart and I.Fidler, *BBA*, 651: 37-50, 1981.
- 18.- Biological diversity in metastatic neoplasm: origins and implications. I.Fidler and I.Hart, *Science*, 217: 998-1003, 1982.
- 19.- The clonal evolution of tumor cell populations. P.Nowell, *Science*, 194: 23-28, 1976.
- 20.- Immunophenotype of human melanoma cells in different metastases. J.Bystryń, P.Bernstein and F.Valentine, *Cancer Res.*, 45: 5603-5607, 1985.
- 21.- Surface antigens of melanocytes and melanomas. A.Houghton et al, *J. Exp. Med.*, 156: 1755-1766, 1982.
- 22.- Capitulo 1, en *Cells and Tissue Culture Methods*, Volumen 2, Editado por E.N.Willmer, Academic Press, London, 1965.
- 23.- Differentiation in mouse melanoma cells: initial reversibility and on-off stochastic model. D.Bennet, *Cell*, 34: 445-453, 1983.
- 24.- Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. F.X.Real et al, *Cancer Res.*, 46: 4726-4731, 1986.
- 25.- Surface antigens of human melanoma cells cultured in serum-free medium: induction of expression of major histocompatibility complex class II antigens. F.X.Real,

- B.Fliegel and A.N.Houghton, *Cancer Res.*, 48: 686- 693, 1988.
- 26.- Diferenciación celular, J.M.Ashworth, Ediciones Omega, 1976.
- 27.- Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated cellular subpopulations of human breast cancer. O.Podhacer et al, *Cancer*, 58: 720-729, 1986.
- 28.- Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogeneous human melanoma cell line. L.Guerra et al, *Pigment Cell Res.*, 2: 504-509, 1989.
- 29.- Preservation, Storage and Shipment. L.Coriell, *Methods in Enzymology*, LVIII: 29-34, 1979
- 30.- Dispersion and disruption of tissues. *Methods in enzymology*, LVIII: 119-131, 1979.
- 31.- Isolation of tumor cells from patient with osteosarcoma and analysis of their sensitivity to methotrexate. J.Mordoh, R.Chacon and J.Filmus. *Cancer Res.*, 41: 3621-3628, 1981.
- 32.- Measurement of growth and viability of cells in culture. M.Patterson, *Methods in Enzymology* LVIII: 141-152, 1979.
- 33.- A rapid method for the isolation of metastasizing tumour cells from internal organs with the help of isopycnic density-gradient centrifugation in percoll. K.Bosslet et al, *Br. J. Cancer*, 44: 356-362, 1981.
- 34.- A rapid method for the separation of large and small thymocytes from rats and mice. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1: 341-347, 1979.
- 35.- Rapid isolation of mouse Leydic cells by centrifugation in percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. M.Schumacher, *FEBS Letters*, 91 (2): 333-338, 1978.
- 36.- GD3, a prominent ganglioside of human melanoma: detection and characterization by mouse monoclonal antibody. C.Pukel et al, *J. Exp. Med.*, 155: 1133-1147, 1982.

- 37.- Rapid banding technique for human chromosomes, M.Seabright, Lancet 2: 971-972, 1971.
- 38.- Mammalian tyrosinase. A.Lerner, en Methods in Enzymology II: 827-831, 1955.
- 39.- Melanina content and hydroperoxide metabolism in human melanoma cells. J.Bustamante, L.Guerra, J.Mordoh and A.Boveris, Experimental Cell Research, 1991. Trabajo enviado para su publicación.
- 40.- J. B. Burnet, H. Seilter and I.V. Brown, Cancer Res., 27: 880-887, 1967.
- 41.- Preparation of Monoclonal Antibodies: strategies and procedures. G.Galfre and C.Milstein, Methods in enzymology, 73: 3-46, 1981.
- 42.- In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. T.Chen, Experimental Cell Res., 104: 255-262, 1977.
- 43.- Capitulo 7, K.Heide and H.Schwick, en Handbook of Experimental Immunology, Vol 1, Editado por D.M.Weir, 1978.
- 44.- Capitulo 5A, P.Lachman and M.Hobart, en Handbook of Experimental Immunology, Vol 1, Editado por D.M.Weir, 1978.
- 45.- pags. 38-47, C.Williams and M.Chase, en Methods in Immunology and Immunochemistry Vol 2, Editorial New York Academic Press, 1968.
- 46.- Purification and first characterization of the secreted and cellular 52KDa proteins regulated by estrogens in human-breast cancer cells. F.Capony et al, Eur. J. Biochem., 161: 505- 512, 1986.
- 47.- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. H.Towbin, T.Staelhelin and J.Gordon, Proc. of Nat. Academy of Science USA, 76: 4350-4354, 1979.
- 48.- Cathepsine D from porcine and bovine spleen. T.Takahashi, J.Tang, Methods in Enzymology, 80: 565-581, 1981.
- 49.- Phosphorylation, glycosylation and proteolytic activity

of the 52kDa estrogen-induced protein secreted by MCF-7 cells. F.Capony et al, *The Journal of Cell Biology*, 104: 253- 262, 1987.

50.- *Cancer* 39: 2524-2532, 1977.

51.- Cellular heterogeneity in human ovarian carcinoma studied by density gradient fractionation. W.Mackillop and R.Buick, *Stem Cells*, 1: 355-366, 1981.

52.- Primary bioassay of human tumor stem cells. Hamburger and Salmon, *Science*, 97: 461-463, 1977.

53.- Differentiating effect of L-Tyrosine on the human melanoma cell line IIB-MEL-J. L.Guerra, LBover and J.Mordoh, *Experimental Cell Res.*, 188: 61-65, 1990.

54.- Effect of insulin on glucose transporters and metabolic patterns in Harding-Passey melanoma cells. E.Delicado, M.Torres and M.Miras-Portugal, *Cancer Res.*, 46: 3762-3767, 1986.

55.- Effect of monoclonal anti-transferrin receptor antibodies on in vitro growth of human solid tumor cells. R.Taetle and J.Honeysett, *Cancer Res.*, 47: 2040-2044, 1987.

56.- An unexpected role for tyrosine in melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. A.Korner and J.Pawelek, in *Cell proliferation, Cancer and Cancer therapy. A conference in honor of Anna Goldfeder-Annals of the New York Academy of Sciences* 397:298,1982.

57.- Biological effect of epidermal growth factor on the in vitro growth of human tumors. S.Singletary et al, *Cancer Res.*, 47: 403-406, 1987.

58.- S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. R.Gaynor et al, *Nature*, 286: 400-401, 1980.

59.- Neurone specific enolase and S100 protein as possible prognostic indicators in melanoma. J.Rode and A.Dhillon, *Histopathology*, 8(6): 1041-1052, 1984.

60.- Phenotypic analysis of cultured melanoma cells, expression of cytokeratin-type intermediate filaments by the M5 human melanoma cell line. L.Trejdosiewick et al,

Experimental Cell Res., 164: 388-398, 1986.

61.- Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic system with mouse monoclonal antibodies. W.Dippold, K.Lloyd and L.Old, Proc. of Nat. Academy of Science USA, 77: 6114-6118, 1980.

62.- Distribution of MR 52000 estrogen-regulated protein in benign breast diseases and other tissues by immunohistochemistry, M. Garcia et al, Cancer Res., 46: 3734-3738, 1986.

63.- Identification of a distinct phase during melanogenesis that is sensitive to extracellular pH and ionic strength. J.Laskin, Journal of Cellular Physiology, 103: 467-474, 1980.

64.- Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. S.Ronau, M.Hau and T.Das Gupta, Seminars in Oncology, 15(6): 558-565, 1988.

65.- Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrate of the melanogenic pathway, L-Tyrosine and L-Dopa. A.Slominsky et al, Journal of Cell Science, 89: 287-296, 1988.

66.- Approaches for drug development in treatment of advance melanoma. J.Pezzuto et al, Seminars in Oncology, 15(6): 578-588, 1988.

67.- S100 protein expression in human melanoma cells: Comparison of levels of expression among different cell lines and individual cells in different phases of the cell cycle. A.Marks et al, Experimental Cell Res., 187: 59-64, 1990.

68.- A soluble protein characteristic of nervous system. B.Moore, B.B.R.C., 19(6): 739-744, 1965.

69.- The S100 protein family. D.Kligman and D.Hilt, TIBS, 13: 437-443, 1988.

70.- Gangliosides enhanced growth of transplanted tumors and metastasis. G.Alessandri et al, Proc. of Am. Assoc. of Cancer Res., 28: No.222, 1987.

- 71.- Gangliosides of human melanoma. T.Tsuchida et al, Cancer, 63: 1166-1174, 1989.
- 72.- Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. J.Carubiol, R.Yu and J.M.Varga, BBRC, 120: 500-504, 1984.
- 73.- Biosíntesis de los glicolípidos, pags. 683-691. H.Maccioni, F.Cumar, en Bioquímica General, Ediciones EL ATENEO, 1985.
- 74.- Antigen repertoire of human melanoma, pags. 343-360. R.Reisfeld, Advance in Pigment Cell Res., Editado por Alan R. Liss, 1988.
- 75.- Expression of melanoma-associated antigens in rapidly dividing human melanocytes in culture. M.Herlyn et al, Cancer Res., 47: 3057-3061, 1987.
- 76.- Human tumor antigens. H.Koprowski, The transformed phenotype-Cancer Cells (Cold Spring Harbor), 1: 293-297, 1984.
- 77.- In vitro differentiation of human melanoma cells analyzed with monoclonal antibodies. H.Ziegler-Heitbrock, Cancer Res., 45: 1344-1350, 1985.
- 78.- Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulation of melanocytes. A.Gown, American Journal of Pathology, pags. 195-203, 1986.
- 79.- Cancer Immunology: the search for specificity - G. H. A. Clowes Memorial Lecture. L.J.Old, Cancer Res., 41: 361-375, 1981.
- 80.- Phenotypic characteristic of cells derived from precursors of human melanoma. M.Herlyn et al, Cancer Res., 43: 5502-5508, 1983.
- 81.- New melanoma antigens characterized with monoclonal antibodies in the IIB-MEL-J cell line. L.Guerra et al, II Congress of the Latin American Association of Immunology (ALAI), No. 27, 1990.
- 82.- Cathepsine D and other carboxyl proteinases, pags. 209-254. A.J.Barret, en Proteinases in Mammalian Cells and

Tissue, Editado por Elsevier-North Holland Biomedical Press, 1977.

83.- Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue. A.D.Recklies et al, Cancer Res., 40: 550-556, 1980

84.- A secreted glycoprotein induced by estrogens in human breast cancer cell lines. B.Westley and H.Rochefort, Cell, 20: 353-362, 1980.

85.- Molecular aspect of the metastatic cascade. I.Hart, N. Goode and R. Wilson, BBA, 989: 65-84, 1989.

86.- In vitro degradation of extracellular matrix with MR 52000 Cathetpsine D secreted by breast cancer cells. P. Briozzo, M.Morisset, F.Capony and H.Rochefort, Cancer Res., 48: 3688-3692, 1988.

87.- Human melanoma: Development and progression. M.Herlyn, Cancer and Metastasis Reviews, 9: 101-102, 1990.

88.- Serial cytogenetic analysis of a recurrent malignant melanoma. H.Ochi et al, Cancer Genet. and Cytogenet., 11: 175- 183, 1984.

89.- Chromosome changes in metastatic human melanoma. J.Limon et al, Cancer Genet. and Cytogenet., 30: 201-211, 1988.

90.- The invlovement of 6p in melanoma. J.Cowan et al, Cancer Genetics and Cytogenesis, 13: 255-261, 1986.

91.- Classes I and II HLA and melanoma-associated antigen expression and modulation on melanoma cells isolated from primary and metastatic lesions. D.Taramelli et al, Cancer Res., 46: 433-439, 1986.

92.- Paradox of ras oncogen in malignant melanoma. A.P.Albino, Pigment Cell Res. Supplement, 1: 169-179, 1988.

93.- Molecular mapping of oncogen MYB and rearrangements in malignant melanoma. E.Meese et al., Genes, chromosomes and cancer, 1: 88-94, 1989.

94.- Gene amplification, drug resistance and cancer. M. Schimke, Cancer Res., 44: 1735-1742, 1984.

- 95.- Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7. I. Kondo and N.Shimizu, *Cytogen. Cell Genet.*, 35: 9-14, 1983.
- 96.- Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. H.Koprowski, M.Herlyn, G.Balaban and P. Nowell, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 11: 297-302, 1985.
- 97.- Epidermal growth factor-induced stimulation of epidermal growth factor-receptor synthesis in human cytotrophoblast and A431 carcinoma cells. L de Palo and M. Das, *Cancer Res.*,48: 1105- 1109, 1988.
- 98.- Characterization of primary and metastatic melanoma cell lines derived simultaneously from each patient. R. Kath, U.Rodeck and M.Herlyn, *Proc. of Am. Assoc. of Cancer Res.*, 29: No.53, 1988.
- 99.- Melanoma associated differentiation antigens: investigation with monoclonal antibodies, pags. 585-595. S. Carrel, M.Schreyer and L.Giuffre, en *Advances in Pigment Cell Research*, editado por Alan R. Liss, New York, 1988.
- 100.- Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. B.Pierce and W.Speers, *Cancer Res.*, 48: 1996-2004, 1988.
- 101.- B.Bouchard, S.Vijaysardhi and A.Houghton, *Proc. of Am. Assoc. of Cancer Res.*, 30: No.352, 1989.
- 102.- Synthesis and degradation of tyrosinase in cultured melanoma cells. H.Saeki and A.Oiakawa, *Journal of Cellular Physiology*, 104: 171-175, 1980.
- 103.- Phenotypic changes of Ab hamster melanoma during long-term culture. A.Slominski and A.Bomirski, *Anticancer Res.*, 5: 403- 410, 1985.
- 104.-Cell kinetic measurements of human tumors. J.Meyer, *Human Pathology*, 13: 874-877, 1982.
- 105.- Stem cells in differentiation and neoplasia. *Journal of Cellular Physiology Supplement*, 1: 3-11, 1982.
- 106.- Regulation of melanoma by the embrionic skin. M.

Gerscheson, K.Graves and G.Pierce, Proc. of Nat. Academy of Science, 83: 7307-7310, 1986.

107.- Induced cell differentiation in cancer therapy. A. Bloch, Cancer Treatment Reports, 68: 199-205, 1984.

108.- Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogens. R.Buick and M.Pollak, Cancer Res., 44: 4909- 4918, 1984.

109.- Growth interaction in vivo between tumor subpopulations derived from a single mouse mamary tumor. B. Miller, J.Leith and G.Heppner, Cancer Res., 40: 3977-3981, 1980.

110.- In vivo and in vitro characterization of subpopulations of different cell density from a murine mammary adenocarcinoma. L.Puricelli et al, J. Exp. Clin. Cancer Res., 3(2): 175-184, 1984.

111.- The pathogenesis of cancer metastasis. G.Poste and I. Fidler, Nature, 238: 139-146, 1980.

112.- IIB-MEL-J, a new human melanoma cell line secretes proCathepsine D. L.Guerra, F.Capony and J.Mordoh, Trabajo en preparación.

ABREVIATURAS

BPP: Azul de bromo-fenol

BSA: Seroalbúmina bovina

DNA: Acido Desoxirribonucleico

DNAsa: Enzima cuyo sustrato es el DNA

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DO: Densidad óptica

DOPA: Dihidroxifenilalanina

EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

Fases del ciclo celular: G₀, G₁, S.

FBS: Suero fetal bovino

HAT: Medio Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (para ver su composición ver ref. 41)

NP 40: Detergente

PBS: Solución tampón de fosfatos pH=7,4

PMSF: Inhibidor de proteasas

RNA: Acido ribonucleico

SDS: Dodecilsulfato de sodio

Tris-HCl: Solución tampón pH=8

TCA: Acido tricloroacético

AGRADECIMIENTOS

Desde el punto de vista profesional, muchas personas me han ayudado en la realización de esta TESIS.

Quiero agradecer:

A mi Director y Co-directora por haberme permitido realizar este trabajo, de ellos aprendí mucho en el transcurso de esta Tesis.

Al Consejo Directivo de la Fundación Campomar por permitirme realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al CONICET que me ayudó económicamente durante la realización de esta Tesis.

A mis compañeros de trabajo, con los cuales compartí muchos momentos buenos y malos: Cecilia Ballaré, Marcela Barrios, Laura Bover, Juanita Bustamante, Oscar Campetella, Mariana Capurro, Pedro Galarza, Hilda Gasparoli, Susana Giambiagi, Eduardo Guillén, Claudia Kairiyama, Silvia Leis, Verónica Morvillo, Monica Nembrot, Isabel Ponce, Osvaldo Sujin, Pablo Wapner.

A los Dres. Ines Bravo, Celia Coto, Irene Larripa, Osvaldo Podhacer, Reis do Salva, Irma Slavutsky, por la ayuda que me brindaron en diversos experimentos presentados en esta Tesis.

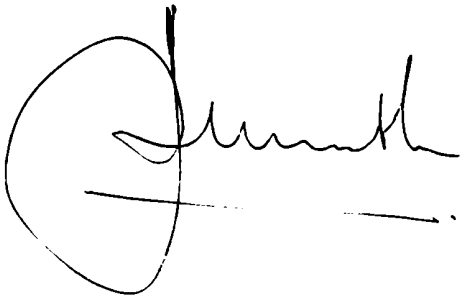
A los Dres. Oscar Burrone, Hector Carminatti, Clara Krisman, Silvia Moreno, Luis Quesada, Pedro Salas y, Ricardo Wolosiuk, por la ayuda que me brindaron de forma totalmente desinteresada y por las buenas discusiones que mantuve con ellos durante el desarrollo de esta Tesis.

A todos los integrantes del Instituto de Investigaciones Bioquímicas que me ayudaron en todo momento, al personal de administración, biblioteca y, mantenimiento.

Finalmente, quiero agradecer al Sr. Luis Millara que realizó todas las fotografías de esta Tesis.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y METODOS	20
RESULTADOS	35
DISCUSION	80
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFIA	104
ABREVIATURAS	111
AGRADECIMIENTOS	112

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized initial 'D' followed by a cursive name and a horizontal line underneath.