

Tesis de Posgrado

Factores inductores del estado de tumor dormido

Di Gianni, Pedro D.

1996

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Di Gianni, Pedro D.. (1996). Factores inductores del estado de tumor dormido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2811_DiGianni.pdf

Cita tipo Chicago:

Di Gianni, Pedro D.. "Factores inductores del estado de tumor dormido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2811_DiGianni.pdf

TRABAJO DE TESIS
PARA LA OBTENCIÓN DEL DOCTORADO DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TITULO :

FACOTRES INDUCTORES DEL ESTADO DE TUMOR DORMIDO

AUTOR : Lic. PEDRO D. di GIANNI

DIRECTOR : Dr. RAÚL RUGGIERO

Buenos Aires, 1996

H 2

TITLE:

FACTORS INDUCING THE TUMOR DORMANT STATE

Key words: Tumor, concomitant resistance, dormant state, anti-tumor factor.

AUTHOR: Lic. PEDRO D. di GIANNI

DIRECTOR: Dr. RAUL RUGGIERO

Buenos Aires, 1996

*A mi Mamá, mi Papá y
a mi hermano, Carlos*

x P. C.

x R. V. M.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. C. D. Pasqualini, por facilitar mi incorporación a la División Medicina Experimental.

A las Dras. Isabel Piazon e Irene Neponasky, por su apoyo constante para la concreción de esta tesis.

A la Dra. Katty, por su enorme aporte técnico y afectivo.

A mis compañeros de la División Medicina Experimental, especialmente a Don Antonio, Don Juan, los Segovia, Julio y Pato, por tanto cariño y afecto.

Muy especialmente agradezco al Dr. Raúl Ruggiero, por su dirección en el trabajo y su amistad sin condicionamientos.

Al Dr. Oscar Bustuoabad, por ser mi maestro mas allá de la ciencia.

A los amigos, Diego, Coqui, Freddy y Marilina, el Ruso, y tantos otros.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION GENERAL	
1. CONCEPTO DE NEOPLASIA.....	1
1.1. Tumor.....	2
1.2. Clasificación.....	2
2. METASTASIS.....	3
2.1. Definición.....	3
2.2. Incidencia y mecanismo.....	3
3. VASCULARIZACION.....	4
3.1. Introducción.....	4
3.2 Factores inductores e inhibidores.....	7
4. MECANISMOS RESPONSABLES DEL ESTADO DE TUMOR DORMIDO.....	11
4.1. Definición.....	11
4.2. Mecanismos.....	12
5. RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	15
5.1. Introducción.....	15
5.2. Antecedentes históricos.....	15
OBJETIVO.....	19
MATERIALES Y METODOS	
1. Animales.....	20
2. Tumores.....	20
3. Volumen tumoral.....	21
4. Ensayo de resistencia concomitante.....	21
5. Ensayo de neovascularización.....	21
6. Cuantificación de la proliferación vascular.....	22
7. Microvascularización.....	23
8. Medio de cultivo.....	23

9. Células en cultivo.....	23
10. Drogas anti-inflamatorias.....	24
11. Ensayo de incorporación de timidina tritiada.....	25
12. Unidades inhibitorias 50.....	26
13. Adhesividad y fagocitosis de células adherentes peritoneales.....	26
14. Adhesividad de polimorfonucleares.....	27
15. Agregación de plaquetas.....	27
16. Diálisis del.....	28
17. Liofilización.....	28
18. Cromatografía en columna.....	28
19. Digestión enzimática.....	29
20. Columna de intercambio ionico.....	29
21. Cromatografía en capa delgada.....	30
22. Cromatografía líquida.....	30
23. Análisis de aminoácidos.....	31
24. Secueciación.....	32
25. Espectrometría de masa.....	32

RESULTADOS

1. RESISTENCIA CONCOMITANTE INDUCIDA POR TUMOR LB.....	33
2. EFECTO DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE INDUCIDA POR EL TUMOR LB SOBRE METASTASIS ESPONTANEAS.....	34
3. MECANISMOS DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	35
3.1. Mecanismo directo.....	35
3.2. Mecanismo indirecto.....	37
4. CORRELACION ENTRE RESISTENCIA CONCOMITANTE Y ACTIVIDAD SERICA.....	40
4.1. Resistencia concomitante contra metástasis experimentales.....	40
4.2. Resistencia concomitante contra metástasis espontaneas.....	41
5. EFECTO DEL SUERO DE PORTADORES DE TUMOR LB SOBRE PROLIFERACION Y/O FUNCION DE CELULAS NORMALES.....	41

6. ORIGEN DEL FACTOR SERICO.....	43
7. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR SERICO.....	43
7.1. Diálisis.....	43
7.2. Análisis de sustancias tóxicas.....	44
7.3. Tratamientos enzimáticos.....	44
7.4. Sephadex G-25.....	44
7.5. Sephadex G-15.....	45
7.6. Ionograma.....	45
7.7. Cromatografía en capa delgada.....	45
7.8. Intercambio ionico.....	46
7.9. Cromatografía líquida.....	46
7.10. Análisis de aminoácidos.....	47
7.11. Secuencia de aminoácidos.....	47
7.12. Espectrometría de masa.....	48
DISCUSION.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	60

ABSTRACT

Observations from both clinical and experimental oncology have demonstrated that surgical removal of a primary tumor is usually followed by an explosive growth of metastases which were not apparent at the time of excision. These observations suggest that the primary tumor may prevent or retard the development of its own metastases. The experimental model for the study of this phenomenon is known as concomitant resistance.

In this work we have shown that LB tumor-bearing mice were able to inhibit the growth of experimental and spontaneous metastases from both the proper LB and the unrelated highly metastatic C7HI tumor. The presence of the LB tumor induced a tumor dormant state in which metastatic cells remained alive but without apparent growth; reciprocally, when the LB tumor was removed the suppression exerted by the local LB tumor disappeared and metastatic growth was rapidly evident. Presumably, metastases were inhibited by two different but complementary mechanisms: a direct one, affecting the proliferation of the tumor cells themselves and an indirect one affecting tumor vascularization. Both mechanisms would be mediated by a low molecular weight factor (800-1200 D) found in the serum of LB tumor-bearing mice. This factor proved to be resistant to heat and to variations of pH, exhibiting two peaks of absorption at 215 and 266 nm. This molecule would have a free tyrosine followed by one or more glycosylated tyrosine. Origin of this factor is apparently associated with the inflammatory response mounted by the host against the tumor.

The final characterization of this factor could be eventually of some value to assay in the future new therapeutic approaches against cancer.

RESUMEN

Observaciones clínicas y experimentales han demostrado que en muchas ocasiones la extirpación de un tumor va seguida de un rápido desarrollo de metástasis que no eran aparentes al tiempo de la misma. Esto sugiere que la presencia de un tumor primario ejercería un control inhibitorio sobre las metástasis. El modelo experimental para el estudio de este fenómeno es conocido como resistencia concomitante.

En este trabajo hemos demostrado que ratones portadores de un tumor LB eran capaces de inhibir el crecimiento de metástasis experimentales del propio tumor LB y metástasis espontáneas de otro tumor no relacionado (el altamente metastásico C7HI). La presencia del tumor LB induce en estas metástasis un verdadero estado de tumor dormido en el que las células metastásicas permanecen vivas pero sin crecimiento aparente; recíprocamente cuando el tumor LB es extirpado, su acción desaparece y ello ocasiona un rápido desarrollo de las metástasis. Presumiblemente las metástasis son inhibidas por dos mecanismos diferentes pero complementarios, a saber: un mecanismo directo que afecta la proliferación de las propias células tumorales y un mecanismo indirecto que afecta la neovascularización tumoral. Ambos mecanismos estarían mediados por un factor de bajo peso molecular (800-1200 D) hallado en el suero de ratones portadores de LB. Este factor probó ser resistente al calor y a amplias variaciones de pH, con máximos de absorción a 215 y 266 nm.

Esta molécula parece poseer en su estructura una tirosina libre seguida de otra/s tirosinas modificadas, posiblemente por azúcares. Su origen parece estar asociado más a la respuesta inflamatoria que monta el huésped en presencia del tumor LB que al tumor LB por sí mismo.

La definitiva caracterización de este factor podría eventualmente ser de valor en el futuro para ensayar nuevas terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

INTRODUCCION GENERAL

1. CONCEPTO DE NEOPLASIA:

Se denomina neoplasia al crecimiento proliferativo relativamente autónomo de un tejido (1). El primer componente de esta definición, a saber, el carácter de crecimiento proliferativo indica un aumento en el número de células debido a una tasa promedio de división más rápida o a una tasa promedio de muerte más lenta que las de las células del tejido normal.

Si se compara el grado de crecimiento de una célula neoplásica respecto de su contraparte normal cuando ésta está en etapa proliferativa, se observa que la célula neoplásica puede crecer más rápido, igual ó más lentamente (como es el caso de las neoplasias de intestino delgado y leucemias crónicas) que las células normales que le dieron origen. Pero en promedio, tomando la vida total de un tejido, es decir, la suma de las etapas proliferativas y no proliferativas, el grado de crecimiento de las células neoplásicas es mayor porque mientras las células normales están limitadas en su crecimiento por la homeostasis del organismo, las células neoplásicas no lo están y continúan creciendo. La replicación aumentada de las células forma parte de la definición operacional de una neoplasia: sin embargo las células neoplásicas pueden permanecer mucho tiempo en el huésped sin que sea demostrable la existencia de división celular (2).

El segundo componente de la definición de neoplasia, a saber, el término autónomo indica que el cáncer no está sujeto a las reglas de regulación que gobiernan a las células individuales y al conjunto de interacciones que éstas poseen con el resto del organismo. Respecto del adjetivo "relativo", éste indica que dicha autonomía no es total. En algunos casos la autonomía que posee una neoplasia es sólo referida al tejido de origen.

Finalmente, el tercer componente de la definición es el término tejido. Este término indica que una neoplasia sólo puede ser definida en un organismo

multicelular. Por esta definición, los organismos unicelulares están libres de esta enfermedad.

1.1. Tumor

El término tumor (tomado del latín tumor, que significa hinchazón) es mucho más amplio y abarca a las masas parasitarias, granulomatosas y abscesos crónicos además de las neoplasias. Sin embargo frecuentemente se utilizan los términos tumor y neoplasia como sinónimos, y esta convención será usada también en el presente trabajo.

La clasificación de neoplasias posee gran utilidad en la prognosis. Estas pueden ser:

a) benignas, cuando se restringen al tejido en el cual se originan, permanecen encapsuladas, altamente diferenciadas y con pocas o ningunas anaplasias.

b) malignas, si son capaces de invadir otros tejidos cercanos o distantes (metástasis) y no presentan encapsulamiento. Las neoplasias malignas reciben el nombre de cáncer.

Como puede verse, la mayoría de las diferencias entre tumores benignos y malignos son relativas. Quizás la capacidad de dar metástasis sea la única realmente crítica.

1.2. Clasificación de las neoplasias malignas

Los cánceres se pueden clasificar según un criterio histogenético, en:

1) carcinomas: tienen su origen en los epitelios, o sea en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo y las que forman las glándulas.

2) sarcomas: surgen a partir de las estructuras de sostén, derivadas del mesodermo, como hueso, músculo, etc.

3) leucemias y linfomas: se originan a partir de las células hematopoyéticas de la médula ósea y ganglios linfáticos.

Cuando el origen de un cáncer es múltiple se lo denomina teratoma.

2. METASTASIS:

2.1. Definición de Metástasis

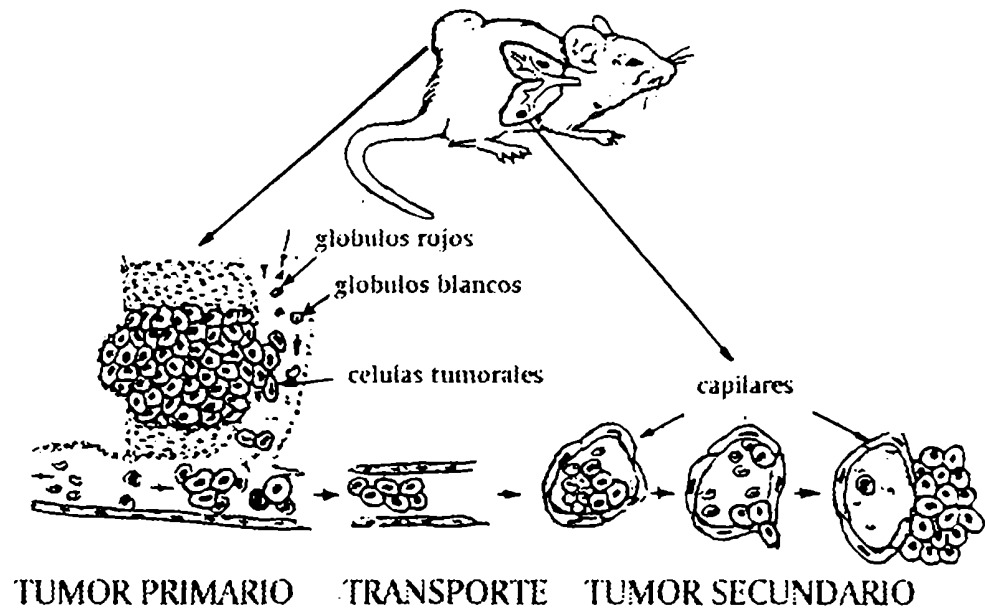
Como se ha descrito, el cáncer se define por el crecimiento invasivo de las células malignas. Esta invasión puede darse en tejidos adyacentes a aquel en el cual surgieron, o en sitios distantes, sin continuidad con la masa que le dio origen. En este último caso se habla de metástasis.

El movimiento de las células tumorales desde el tumor primario a órganos distantes y el subsecuente desarrollo de las metástasis es uno de los aspectos mas devastadores del cáncer (3).

2.2. Incidencia y Mecanismo

La cascada de eventos en la progresión de un tumor metastásico se resume en el Esquema I. En este sentido la iniciación y promoción del tumor primario son seguidas por la transición de un estado de tumor in situ a localmente invasivo y luego a tumor vascularizado (4-7). Los capilares neoformados poseen una estructura diferente a la de los normales. Esto hace que sean fácilmente invadidos por las células tumorales dentro de la masa del tumor primario. También vasos preestablecidos pueden ser invadidos por las células tumorales. Estas células tumorales viajan por el drenaje venoso en forma aislada o formando trombos. Sin embargo menos del 0.01% de estas células son capaces de generar metástasis. Los tumores carecen de sistema linfático dentro de su masa, por lo tanto la comunicación de las células tumorales con los canales linfáticos ocurre sólo en la periferia del tumor. Las células tumorales que entran al sistema linfático llegan a un nódulo cercano donde son detenidas en los sinus subcapsulares. Pero entre los 10 y los 60 minutos después del arresto inicial, algunas células tumorales escapan y entran al sistema linfático eferente y eventualmente terminan en el sistema de drenaje venoso debido a la existencia de numerosas conexiones linfatico-sanguíneas. Por lo tanto la diseminación

Esquema 1 Resumen de los procesos que llevan al establecimiento de metastasis



linfática y sanguínea ocurren en paralelo. Las células tumorales circulantes solas o en trombos -asociados o no a leucocitos, fibrina o plaquetas- son arrestadas en la microvasculatura del órgano blanco, anclándose a la superficie endotelial intacta o a regiones donde existe exposición de la membrana basal subendotelial. Una vez que las células tumorales se han anclado, las células endoteliales adyacentes se extienden sobre las células tumorales y las separan de la corriente sanguínea. Luego se observa la disolución local de la membrana basal y el movimiento de las células tumorales con sus pseudópodos a través de la membrana degradada. Este paso es seguido por la completa extravasación de la célula tumoral y el re-establecimiento del flujo sanguíneo del vaso. Las células tumorales que logran extravasar proliferan como colonias pero requieren la formación de neovasos para crecer más allá de 1 o 2 mm de diámetro. Cuando la colonia es suficientemente grande puede comprimir el vaso sanguíneo, causando daño mecánico al endotelio. De esta manera las células tumorales pueden re-introducirse en la corriente sanguínea y dar origen a nuevas metástasis.

Sin embargo existen numerosos reportes clínicos sobre la existencia de metástasis dormidas (8). Más aún, un tercio de la mortalidad en el cáncer de mama se observa luego de 5 años de la remoción del tumor primario debido a la existencia de metástasis ocultas al momento de la extirpación del tumor primario.

3. VASCULARIZACION TUMORAL

3.1. Introducción

La proliferación de vasos sanguíneos es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de los tejidos. En el adulto, es un evento poco frecuente. Pero se pueden encontrar excepciones en el sistema reproductivo femenino, donde se desarrolla neovascularización en el folículo durante el

desarrollo, en el cuerpo lúteo durante la ovulación y en la placenta durante la preñez. Estos períodos de angiogénesis son relativamente cortos y altamente regulados. También se verifica el desarrollo de neovasos durante el proceso de reparación de una herida. Por otro lado, la falta de control sobre el desarrollo de neovasos contribuye a una gran variedad de enfermedades. Por ejemplo, el crecimiento de tumores sólidos es dependiente de la vascularización, y en la retinopatía diabética, la vascularización de la retina, frecuentemente lleva a la ceguera.

Los neovasos se forman a partir de prolongaciones de vasos ya establecidos, así como de vénulas y otros capilares. Este fenómeno sigue una serie de pasos determinados (8,9). Durante la fase inicial del desarrollo capilar, la membrana basal de las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos es degradada. Esta es mediada por enzimas proteolíticas, siendo las más conocidas el activador del plasminógeno y las colagenasas, liberadas por las CE en respuesta a los factores angiogénicos (10). Existen tumores que directamente pueden degradar la membrana basal mediante endoglicosidasas que actúan sobre el heparan-sulfato, componente mayoritario de los glicosaminoglicanos (GAGs) constituyentes de la membrana basal (11). Cuando la membrana basal está degradada, las CE empiezan a migrar hacia el espacio pre-vascular y luego proliferan. Subsecuentemente, las CE forman la luz del capilar por un mecanismo que aún permanece poco conocido (12). En los pasos finales, los pericitos (fibroblastos y en menor medida adipocitos y osteocitos) llegan a los capilares recién formados y una nueva membrana basal es sintetizada (presumiblemente por ambos tipos celulares -pericitos y CE) estableciéndose así un nuevo capilar (13).

3.1.1 Diferencias entre vasos tumorales y normales.

Hace ya tiempo se ha descrito la asociación entre crecimiento tumoral y angiogénesis (14). Goldman llamó la atención sobre:

a) la dilatación, b) la acelerada proliferación y c) el desarrollo irregular de los capilares tumorales (15). De aquellas observaciones tempranas y de los estudios posteriores se ha completado la descripción del desarrollo de los capilares tumorales (16,17). Estos están claramente expuestos en un trabajo de Urbach (18), en el cual encontramos la siguiente distinción entre vascularización de un tejido normal y vascularización tumoral:

- La proliferación empieza mucho antes en un tumor implantado que en un tejido normal implantado.

- Durante el curso de la vascularización del tejido normal, se observa una gradual diferenciación entre arteriolas, pre-arteriolas, capilares, vénulas y venas. En contraposición, muchos de los vasos tumorales consisten en canales endoteliales de diámetro variable, con poca o ninguna diferenciación.

- A diferencia de los explantos de tejido normal, muchos de los capilares tumorales se colapsan instantáneamente después de la muerte del huésped por la reducción de la presión arterial.

Existen varias diferencias respecto de la funcionalidad entre los vasos tumorales y los observados en tejidos normales. La hipotensión inducida por agentes farmacológicos lleva al colapso de los capilares tumorales, presumiblemente debido a la falta de membrana basal a lo largo de los capilares indiferenciados y a la presión de la masa tumoral (19). La misma explicación ha sido utilizada para justificar la elevada permeabilidad asociada a los capilares tumorales (20). Por otra parte se ha demostrado un aumento de 30-40 veces en la proliferación del endotelio vascular en tumores respecto del obtenido para tejidos normales (21). Sin embargo la proporción de vascularización efectiva disminuye con el incremento del tamaño tumoral (22).

3.2. Factores inductores (angiogénicos) e inhibidores de la vascularización.

Como ya hemos descripto, el crecimiento de los tumores sólidos es dependiente de la vascularización pero los tumores no están vascularizados en el comienzo de su desarrollo (23-29). De este modo pueden permanecer en estado de tumor in situ por meses e inclusive años sin vascularizarse y en consecuencia limitados a unos pocos milímetros de volumen. Algunas células tumorales cambian luego a un fenotipo angiogénico e inducen la vaso proliferación (4-10%) que sustenta el desarrollo de las células que inducen vascularización así como de las que no lo hacen (30,31). La expansión de la masa tumoral se realiza tanto por la perfusión de los neovasos a través del tumor como por la estimulación paracrina de un gran número de factores de crecimiento y proteínas de la matriz producidas por el endotelio de los neovasos (32,33). El cambio de las células tumorales a un fenotipo vascularizante depende del balance entre factores angiogénicos y factores anti-angiogénicos liberados tanto por el tumor como por células normales circundantes tales como macrófagos, linfocitos y fibroblastos (34,35). Ahora bien, el desarrollo de vascularización tumoral puede deberse tanto a la sobreproducción de factores angiogénicos como a la regulación negativa de factores inhibidores de la vaso proliferación. Respecto de los procesos tumorales es posible que ambos mecanismos estén presentes (36).

3.2.1. Factores angiogénicos

La primera demostración de la naturaleza de los factores angiogénicos proviene de los trabajos en donde se aislaron factores derivados de tumor con capacidad de generar angiogénesis tanto in vitro como in vivo (34-40). Hoy existen numerosos ensayos que miden la capacidad de diferentes factores para inducir angiogénesis. Estos factores angiogénicos pueden agruparse de la siguiente forma:

Factores de bajo peso molecular.

A). Factores quimiotácticos: son factores que estimulan la migración pero no la proliferación de CE (41). En general se trata de polipéptidos de 2000-14000 D. Estos factores han sido aislados de tejidos en reparación y en cultivos de macrófagos in vitro en respuesta a la hipoxia (42) y al lactato (43). Se cree que son los macrófagos presentes en los tejidos dañados los responsables de la actividad in vivo.

B). Lípidos: La caracterización química y el uso de inhibidores sugieren que una mezcla de prostaglandina E_1 y E_2 serían responsables de esta actividad (44-47). Los niveles de prostaglandinas son elevados en tumores, exudados inflamatorios, cicatrizaciones y en sobrenadantes de macrófagos activados (47).

C). Factores angiogénicos derivados de tumor: son compuestos de bajo PM (200-1000 D) que estimulan la proliferación de las CE (38-40). Una de estas moléculas ha sido recientemente caracterizada como nicotidamida (48,49).

Factores de crecimiento.

Algunos factores de crecimiento o migración de las CE fueron descritos durante los años 70. Entre los primeros factores aislados están el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) aislado de cerebro (50-52), el factor de crecimiento de las células epiteliales (ECGF) aislado de hipotálamo (53), el factor de crecimiento de condrosarcoma (ChDGF) (54) y el factor ácido de crecimiento para fibroblastos (aFGF) (55).

Factores polipeptídicos.

A). Angiogenina: fue el primero en ser purificado a partir de medios condicionados de cultivo de adenocarcinoma humano (56-59).

B). Factores transformantes del crecimiento (TGF): los TGF son polipéptidos que fueron primero identificados por su habilidad para transformar el fenotipo de células normales. Entre ellos el TGF- α y el EGF (factor de

crecimiento epidérmico) estimulan la proliferación de las CE en los microcapilares (60-63). Otros como el TGF- β inducen la formación de neovasos y la producción de colágeno por los fibroblastos además de ser un potente factor quimiotáctico de los monocitos (64-66). Sin embargo, otros trabajos relacionan al TGF- β con la inhibición de la proliferación de las CE in vitro y antagoniza la actividad mitogénica de bFGF en forma no competitiva (67,68)

Nuevos factores:

Recientemente, dos nuevos factores angiogénicos han sido identificados. Ambos están estructuralmente relacionados con el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF). El primero es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) también conocido como factor de permeabilidad vascular (69-70). El VEGF es un mitógeno específico de las células endoteliales in vitro y posee actividad angiogénica in vivo. Posee dos formas pequeñas (VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅) que son secretados como proteínas, pero dos formas mayores (VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) se unen a los proteoglicanos que contienen heparina en la membrana de las células o en la membrana basal (70). Además, como factor de permeabilidad vascular permite la extravasación de proteínas como el fibrinogen para formar el gel de fibrina extravascular que es el sustrato óptimo tanto para el crecimiento de las células tumorales como para las células endoteliales. Cabe señalar que se ha demostrado la inducción de VEGF en las regiones hipóxicas de glioblastomas multiformes (70).

El segundo factor es el factor de crecimiento placentario (PIGF), el cual fue aislado de placenta y células de coriocarcinoma humano (71). Este factor presenta un 54% de homología con el VEGF.

A pesar de los éxitos logrados con el tratamiento anti-angiogénico en algunos tipos tumorales (25) la existencia de tantos factores angiogénicos hace dificultoso el intentar prevenir la angiogénesis tumoral bloqueando factores angiogénicos individuales. De hecho existen hibridomas que secretan grandes

cantidades de anticuerpos anti-FGF y sin embargo, la presencia de otros factores angiogénicos hace que el tumor vascularice y desarrolle. Sin embargo, el uso de factores anti-angiogénicos parece abrir una nueva puerta a la terapéutica.

3.2.2. Factores inhibidores de la vascularización

Los antagonistas de la angiogénesis han sido divididos en dos categorías: aquéllos que inhiben la producción de factores angiogénicos y los que inhiben la proliferación de células endoteliales. Se ha demostrado que los interferones (INF- α e INF- β) inhiben la señal angiogénica (72,73). Sin embargo, los diferentes tumores y hasta diferentes subpoblaciones de un mismo tumor pueden o no responder al INF. Por otra parte, se ha observado que el factor plaquetario 4 (PF4) producía zonas avasculares en la membrana coriónica de embrión de pollo (74). El PF4 inhibe la proliferación de las células endoteliales in vitro, sin embargo las concentraciones usadas no pueden ser alcanzadas in vivo. Otro inhibidor de la angiogénesis fue recientemente extraído de cartilago y se lo denominó TIMP (inhibidor de las metalo-proteinasas) y actúa inhibiendo las colagenasas (75-77). Luego fue descrita una segunda molécula con actividad inhibidora de las metaloproteinasas, denominada TIMP-2 (78). Existen observaciones acerca de factores inhibidores de la angiogénesis de bajo peso molecular. Se ha conseguido inhibición de la angiogénesis con una combinación de esteroides y un sustituto sintético de la heparina llamado β -ciclodextrina tetra-deca sulfato (81). La penicilina (82), los análogos de la vitamina D3 (83), el metabolito de herbimicina A (84) y la anti-colagenasa minociclina (85) también han sido descriptos como factores antiangiogénicos. Más recientemente, derivados del metabolito fúngico denominado Fumigalina, demostro poseer capacidad de inhibir angiogénesis y suprimir el crecimiento de tumores xenogéneos en animales nude (86,87).

Otros autores han descrito que los glucocorticoides, y en especial la 6 metilprednisolona, inhiben la angiogénesis inducida por tumores y otros materiales (88-90).

El enfoque más reciente en la búsqueda de factores anti-angiogénicos está orientado hacia los reguladores negativos endógenos de la vascularización. Así se han sido descritos tres nuevos factores:

el primero es la trombospondina, producto de un gen supresor que posee actividad anti-angiogénica; este factor es producido constitutivamente por las células normales pero su producción decae al 4% durante el proceso de tumorigénesis (79,91,92). El segundo factor es el inhibidor de la angiogénesis derivado de glioma, que se encuentra regulado negativamente en el tumor de cerebro en humano, pero cuya producción se restituye cuando se vuelve al fenotipo p53 normal (80,93). Por último, el más reciente de los factores inhibidores de la neovascularización es la angiostatina, una proteína de aproximadamente 38kD derivada del plasminógeno, cuya actividad ha sido relacionada con el estado de tumor dormido que induce sobre sus metástasis el carcinoma murino de pulmón de Lewis (94). Cabe señalar que este factor puede actuar tanto en forma paracrina como endocrina inhibiendo específicamente la proliferación de las células endoteliales y que su acción desaparece después de la extirpación del tumor primario, permitiendo el rápido desarrollo de las metástasis que hasta ese momento permanecían en estado de tumor dormido.

4. MECANISMOS RESPONSABLES DEL ESTADO DE TUMOR DORMIDO

4.1. Definición del estado de tumor dormido.

El estado de tumor dormido es aquél en el cual las células tumorales persisten por un largo tiempo en un huésped clínicamente normal con escaso o ningún incremento en su población celular. Las células tumorales en este estado

pueden estar detenidas en un determinado punto del ciclo celular, o bien poseer igual grado de muerte y de proliferación (95,96).

4.2. Mecanismos.

Los mecanismos propuestos para la permanencia de las células en estado de tumor dormido son:

1. Inmunidad mediada por células (97-102)
 - a. Citolíticos
 - b. Citostáticos
2. Respuesta inmune humoral (103,104)
 - a. Anticuerpos citotóxicos
 - b. Citoquinas inhibitoras del crecimiento tumoral
3. No inmunes
 - a. Factores solubles que inducirían arresto mitótico
 - b. Factores solubles que inducirían diferenciación
4. Avascularidad y secuestro tumoral (105-110)
5. Ausencia de factores específicos requeridos para el crecimiento tumoral:
 - a. Hormonas (111-114)
 - b. Factores de crecimiento producido tanto por el huésped como por el tumor
6. Activación de una secuencia de genes supresores
 - a. Estado de inercia en la carcinogénesis química (116,117).

De los mecanismos analizados cuatro son los que resultan de mayor importancia en los modelos animales in vivo

(1) Dependencia constitutiva de las células tumorales de factores de crecimiento.

El caso más conocido es el de los tumores hormono-dependientes. La detención del crecimiento se elimina cuando ciertas variantes de células tumorales se vuelven independientes de esos factores o cuando son capaces de producirlos ellas mismas, volviéndose tumores autónomos.

(2) Avascularidad y secuestro

El crecimiento progresivo de los tumores sólidos en su lugar primario o en sitios distantes depende de la neovascularización (105-110). Los nódulos tumorales pequeños no desarrollan más allá de 1 o 2 mm de diámetro sin vascularización. La neovascularización tumoral depende de factores angiogénicos producidos por las células del huésped o por las propias células tumorales (111). Los factores producidos por las células del huésped están regulados, en algunos casos, por sustancias derivadas del tumor. Así el estado de tumor dormido inducido por ausencia de vascularización depende de un complejo sistema de interacción entre las células del huésped y las células tumorales.

(3) Mecanismo inmunológico

Existen una gran variedad de mecanismos que pueden ser identificados como responsables del estado de tumor dormido. Los mecanismos inmunológicos actuarían lisando un número de células tumorales igual al que se produce por proliferación (95-104). La evidencia fundamental se basa en el alto porcentaje de aparición de ciertos tumores en individuos inmunosuprimidos. En los modelos experimentales en los que se usan tumores de inmunogenicidad detectable, generalmente inducidos por carcinógenos químicos o virales, el mecanismo inmunológico juega un papel fundamental en la regulación de su crecimiento. Además restringe o suprime el desarrollo de las células remanentes a la extirpación de un tumor. Sin embargo, en los modelos en los que se utilizan

tumores de baja o nula inmunogenicidad, los mecanismos aquí descritos no ejercerían un efecto importante.

(4) Factores inhibidores

Se han descrito factores inhibidores de la proliferación de células tumorales in vitro (119,120). Dichos factores provienen de diferentes tejidos, normales y neoplásicos (120), del sobrenadante de cultivos celulares y del suero de animales o pacientes portadores de tumores (121-124). En ningún caso se intentó correlacionar este hecho con la inducción del estado de tumor dormido, es decir, con metástasis no aparentes al momento de la extirpación quirúrgica del tumor primario.

Los mecanismos responsables de la terminación del estado de tumor dormido se resumen a continuación:

A. Supresión inmune

A.1. Extrínseca

a. Anestesia y procedimientos quirúrgicos (125-127)

b. Infección con agentes inmuno-supresores

c. Drogas citotóxicas y glucocorticosteroides

A.2. Intrínsecas

a. Caída de las defensas asociada a la edad

b. Factores causantes de la regulación negativa de la respuesta inmune producidos tanto por las células del huésped como por las células tumorales.

B. Estimulación inmune que lleva a la regulación negativa de la respuesta inmune.

C. Suplemento de factores de los que las células tumorales dependen constitutivamente.

D. Vascularización del tumor (128).

E. Mutación y proliferación de una variante inmuno-resistente.

F. Activación de oncogenes adicionales. (117)

Un mecanismo que cumple con varios de los items antes descriptos es la inflamación. Existen trabajos en los que se generan inflamaciones en el área de un tumor dormido y éste retoma su crecimiento. Este fenómeno ha sido denominado oncotáxis (129).

5. EL FENOMENO DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE

5.1. Introducción

La experiencia clínica revela que en muchas ocasiones, la extirpación de un tumor va seguida de un rápido desarrollo de metástasis que no eran aparentes al tiempo de la misma (96-101). Los estudios realizados en estos casos sugieren que la presencia de un tumor primario ejerce un control inhibitorio sobre las metástasis.

El modelo experimental para el estudio del fenómeno de control de metástasis por el tumor primario es conocido como resistencia concomitante. Considerando los estadios descriptos en el Esquema I para el establecimiento de una metástasis, veremos que este modelo experimental sirve para el estudio de los factores microambientales a los que se enfrenta la metástasis experimental (desafío 2^{no}) luego de la implantación y que pueden llevar a la inducción del estado de tumor dormido. El microambiente será la resultante de factores que actúan por difusión y otros que actúan localmente por ejemplo la vascularización.

5.2 Antecedentes históricos

En el año 1906 Paul Ehrlich (130) describió el fenómeno de resistencia concomitante según el cual un individuo portador de un tumor inhibe o retarda el crecimiento de un segundo implante con células de ese mismo tumor cuando este implante es realizado en un sitio distante al del crecimiento primario. Dos

años más tarde Bashford lo denominó "inmunidad concomitante", en la creencia de que se trataba de un rechazo inmunológico. Postuló entonces que el tumor primario dispara una respuesta inmune tardía, incapaz de impedir la progresión de dicho tumor, pero suficiente para neutralizar el implante secundario (131). Este enfoque fue apoyado en los años '60 con el descubrimiento de los antígenos de transplante específicos de tumor (TSTA) en tumores inducidos por carcinógenos químicos y virus oncogénicos (132). Sin embargo, se ha establecido que la resistencia concomitante puede ser inducida tanto por tumores inmunogénicos como por tumores no-inmunogénicos, por lo que la postulación del control inmunológico no puede ser generalizada (133-135). Varios autores han demostrado que los mecanismos inmunológicos clásicos, principalmente mediados por linfocitos T y macrófagos podrían explicar, al menos en parte, la resistencia concomitante generada por tumores murinos fuertemente inmunogénicos inducidos por carcinógenos químicos ó virales (135,136). No obstante, respecto de tumores con baja o nula inmunogenicidad, la naturaleza del fenómeno permanece casi completamente desconocida: todos los datos relativos a su etiología obtenidos a partir de experimentos en ratones nude y eutímicos son esencialmente negativos, sugiriendo que los linfocitos T no cumplen un rol significativo (143).

Dado que la enorme mayoría de los tumores espontáneos de rata, ratón y presumiblemente humanos, pertenecen a esta categoría, resulta de suma importancia estudiar la resistencia concomitante inducida por tumores con baja o nula inmunogenicidad.

En trabajos previos (137-141) realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la resistencia concomitante inducida por varios tumores murinos no-inmunogénicos operaba a través de un mecanismo citostático sin la participación local de células del huésped: en efecto, en el implante secundario que no crecía como consecuencia de la resistencia concomitante, el examen histológico reveló la presencia de células tumorales bien preservadas sin ningún

signo de necrosis y sin ninguna infiltración con células del huésped. en estado de tumor dormido, contrastando drásticamente con un fenómeno de rechazo inmunológico convencional. Más aún, las células de bazo y ganglio de ratones con resistencia concomitante, no mostraron actividad citotóxica sobre las células tumorales in vitro e in vivo.

Hemos demostrado asimismo que los sueros de ratones portadores de 5 tumores no-inmunogénicos exhibían in vitro una actividad inhibitoria de la proliferación tumoral que era proporcional a la intensidad de la resistencia concomitante generada por dichos tumores (118,142).

Experimentos realizados usando ratones en parabiosis sugieren que esta actividad inhibitoria puede cumplir un rol causal en la inducción de la resistencia concomitante. En efecto, se vio que un implante tumoral no crecía en un ratón normal unido en parabiosis con un ratón portador de tumor; esta "imitación" de la resistencia concomitante se correlacionó con la presencia de actividad antitumoral en el suero del ratón normal transferida por circulación cruzada desde el ratón portador de tumor. Más aún, cuando ambos miembros del par en parabiosis fueron separados, el título de la actividad antitumoral cayo rápidamente en el suero del ratón normal, en el cual las células del implante tumoral que habían permanecido hasta ese momento en estado dormido, comenzaron a crecer.

Estos experimentos sugieren que la resistencia concomitante dependería de un nivel alto y persistente de actividad inhibitoria en suero. Esto implica que esta actividad inhibitoria podría eventualmente ser utilizada como herramienta terapéutica para controlar el crecimiento tumoral in vivo.

OBJETIVO

Observaciones clínicas y experimentales han mostrado que en muchas ocasiones, la extirpación de un tumor trae como consecuencia el crecimiento "explosivo" de metástasis que no eran detectables en el momento de la extirpación y que por lo tanto permanecían en un estado de tumor dormido. Esto ha sugerido que el tumor primario ejerce un control inhibitorio sobre sus propias metástasis. El modelo experimental que representa dicho fenómeno es conocido como resistencia concomitante (RC) y se define como la inhibición de un implante tumoral secundario en un individuo portador de tumor.

En este trabajo, utilizando el modelo de resistencia concomitante inducido por el tumor LB en ratones BALB/c, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

A). Estudiar si el efecto inhibitorio del tumor primario sobre las metástasis experimentales se ejerce a través de mecanismos:

A-1). Directos, por inhibición de la proliferación de las propias células LB implantadas secundariamente.

A-2). Indirectos, a través de la inhibición de la neovascularización del implante secundario.

B). Aislamiento y caracterización de los factores inductores del estado de tumor dormido de las metástasis experimentales.

La comprensión del balance existente entre el crecimiento tumoral y la restricción del mismo en el estado de tumor dormido podría permitir el desarrollo de terapias que inclinen la balanza a favor del paciente, resultando en la prolongación del estado de tumor dormido.

MATERIALES Y METODOS

Animales:

Se utilizaron ratones BALB c de ambos sexos (entre 3 y 5 meses). Estos se obtuvieron de nuestra colonia, y se mantuvieron con pellets de Nutric (Córdoba) y agua ad-libitum.

Tumores:

LB: Se trata de una leucemia linfoide que se originó espontáneamente en un ratón BALB:c de 6 meses, en nuestro bioterio. Se mantiene por pasaje subcutáneo en ratones singeneicos. Crece in-situ alcanzando un gran tamaño. Tiene una mortalidad de un 100% en un promedio de 18-22 días cuando se inoculan 10^6 células. La dosis de células tumorales capaces de matar al 50% de los animales se inoculados (DT 50) es de 1000 células y se ha mantenido a lo largo de los pasajes. Mediante ensayos de inmunización se ha comprobado que se trata de un tumor no inmunogénico. Por otro lado se ha demostrado en nuestro laboratorio que este tumor genera una resistencia concomitante muy intensa (118). Estudios realizados en el Weizman Institute de Jerusalem (Israel) por el Dr. Naor, han establecido que las células del tumor LB tienen las siguientes características: el 95% es Thy 1+2+, Lyl 2-, L3T4-, CD25-, gp70-, H-2D-, H-2K+-. I-E -.

Como controles de especificidad de RC se utilizó el tumor C7H1:adenocarcinoma mamario altamente metastásico inducido en ratones BALB c por acetato de medroxiprogesterona. No presenta inmunogenicidad detectable y no ejerce resistencia concomitante (118). Su DT 50 es de 1000 células.

Determinación del volumen tumoral:

El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula descrita por Attia y Weiss (144) con determinaciones realizadas con calibre:

$$\text{volumen} = 0.4 (a \cdot b^2)$$

siendo a y b los diámetros mayor y menor respectivamente.

Ensayo de Resistencia Concomitante:

Se realizó un implante tumoral subcutáneo (sc) en el flanco derecho de ratones BALB/c. A diferentes tiempos, se realizó un segundo implante sc con células del mismo tumor (desafío secundario) en el flanco izquierdo, contralateral al tumor primario en desarrollo. El grupo control sólo recibió el inóculo tumoral "secundario" en el flanco izquierdo. Se determinó la toma tumoral y cinética de crecimiento del implante secundario en función del volumen del tumor primario.

Ensayo de neovascularización:

Varias suspensiones de células inductoras de vascularización (macrófagos, linfocitos, fibroblastos) fueron sc inoculadas en el flanco izquierdo de a) ratones portadores de un tumor primario ó b) ratones normales. Cinco días después, los ratones fueron sacrificados y se separó cuidadosamente la piel de la zona inoculada con las células inductoras de vascularización (flanco izquierdo). La piel así obtenida fue puesta bajo una lupa de disección (magnificación 10x).

Las células inductoras de vascularización se obtuvieron de la siguiente forma:

i) Macrófagos de exudado peritoneal (MEP): Ratones BALB/c normales fueron inyectados intraperitonealmente con 1 ml de tioglicolato al 3% (Difco Laboratories, Detroit, MI). Al cuarto día se procedió al lavado del peritoneo con 10 ml raton de RPMI 1640 frío (Gibco, Grand Island, NY). Las células

peritoneales fueron lavadas dos veces y resuspendidas en medio. La viabilidad celular fue rutinariamente mayor del 95%, medida por exclusión del colorante azul tripán.

ii) Linfocitos semi-alogeneicos de bazo (LSA): Los bazos de ratones híbridos F1 (BALB/cxAKR) fueron presionados a través de una malla metálica. La viabilidad de la suspensión celular fue determinada por el método de exclusión con el colorante azul tripán.

iii) Fibroblastos embrionarios murinos (FE): se utilizaron embriones BALB/c de 14 días. Luego de separar la cabeza y el hígado, el embrión fue seccionado en piezas pequeñas y tratado con tripsina 0.25% por 15 minutos en agitación a 37°C. Luego se procedió a inactivar la tripsina en RPMI con 20% de suero fetal bovino. Las células se utilizaron en el segundo o tercer repique.

Cuantificación de la proliferación vascular:

Con el propósito de cuantificar los vasos que se forman por la inoculación de MEP, LSA y FE usamos una adaptación de un método ya descrito por otros autores (145). Brevemente, se coloca la piel correspondiente a la zona donde se han inoculado las células inductoras de vasoproliferación bajo la lupa de disección, luego se toma una fotografía de un área de 1 cm² de piel. Las fotografías son proyectadas y se cuenta el número de vasos que convergen hacia la zona del implante. Es importante señalar que este método no permite cuantificar la reacción de neovascularización total, ya que existen gran cantidad de microvasos que no se detectan por este método. Por este motivo cortes histológicos de las mismas muestras fueron estudiados por técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-factor von Willebrand (anti factor VIII) para detectar células endoteliales.

Estudio de la microvascularización:

Los tejidos embebidos en parafina fueron fijados en formalina y luego desparafinados con xileno. Luego de la hidratación a través de un gradiente decreciente de etanol, agua destilada y PBS, los cortes fueron incubados con una dilución 1:100 de anticuerpo policlonal contra antígenos relacionados al factor VIII (Bio Genex, CA), durante 2 horas a temperatura ambiente. Anticuerpos anti-conejo biotinilados fueron usados para revelar el primer anticuerpo (Bio Genex).

La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo por incubación con un complejo estreptovidina fosfato conjugado alcalino 1:15 (Bio Genex), y revelado con el sustrato de fucsina (Bio Genex).

Los controles negativos fueron tratados de igual modo pero usando PBS en vez de anticuerpos específicos contra el factor VIII.

Medio de cultivo:

Se utilizó RPMI 1640 (Gibco, New York) suplementado con 1% de antibiótico (estreptomicina, penicilina y anfotericina).

Células en cultivo:

Células Tumorales:

i) LB: Las células se extrajeron de un tumor LB i.p. que crece en forma ascítica. El procedimiento que se sigue es el siguiente: se lava el peritoneo con RPMI, se centrifuga a baja velocidad para precipitar las células que luego se resuspenden en RPMI. Las células LB así obtenidas se siembran en placas de 96 pocillos a una concentración de 1 a 2×10^6 células por mililitro, durante 18-24 horas en estufa gaseada a 37 °C.

ii) C7HI: A partir de un tumor C7HI creciendo subcutáneamente en ratones BALB.c. se obtienen pequeños fragmentos. Estos son sometidos a digestión enzimática (se emplean colagenasa 0.025 g; tripsina 0.025 g y albúmina 0.05 g por cada 10 ml de PBS) en agitación a 37 °C por 20 minutos.

Mediante decantación en tubos Falcon por 20 minutos, se va separando el sobrenadante rico en fibroblastos (células normales del estroma tumoral) del pellet enriquecido en células epiteliales. Estas se siembran luego en placas utilizándose como medio de cultivo RPMI sin rojo fenol adicionado con bicarbonato, hepes, 2-mercaptoetanol y 10% de SBF.

Células Normales:

i) Linfocitos murinos: linfocitos provenientes de ganglios linfáticos de animales BALB.c normales fueron sembrados en concentraciones de 4×10^5 y 2×10^5 células/ml, en placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) y estimuladas con Concanavalina A (Con A) en dosis de 0.25; 1 y 2 mg/ml durante 48 horas.

ii) Fibroblastos embrionarios murinos (FE): embriones BALB/c de 14 días fueron obtenidos de hembras preñadas. Luego de separar la cabeza y el hígado, el embrión fue seccionado en piezas pequeñas y tratado con tripsina 0.25% por 15 minutos en agitación a 37°C. Luego se procedió a inactivar la tripsina en RPMI con 20% de suero fetal bovino. Las células se utilizaron en el segundo o tercer repique y se sembraron en placas de 96 pocillos en una concentración de 1×10^5 células/ml.

iii) Células endoteliales (CE): Células endoteliales normales de vasos provenientes de cordón umbilical humano (HUVEC) obtenidas de la American Tissue Culture Corporation fueron cultivadas en RPMI adicionado con 20% de suero fetal bovino y 5 ng/ml de bFGF. Las CE se sembraron en microplacas de 96 pocillos en una concentración de 1×10^5 células/ml.

Tratamientos con drogas anti-inflamatorias in vivo:

Ratones BALB.c portadores de tumor LB de 12 días (3000 mm^3 de volumen tumoral aproximadamente) y normales fueron inoculados durante tres días consecutivos con 0.5 mg/Kg (0.2 ml intraperitoneal) de Indometacina (Indo), 5 mg/Kg (0.2 ml intraperitoneal) de ácido nor-dihidro-guayaretico

(NDGA), 5 mg:Kg (0.2 ml intraperitoneal) de fenidona (Fen), Indo más NDGA (0.4 ml intraperitoneal), 0.024 mg/ratón de clorpromazina o 1 mg:Kg de prometazina. 24 y 48 horas después de la última inoculación los ratones fueron sangrados. Los sueros obtenidos fueron ensayados sobre la proliferación de células LB in vitro.

Sueros:

Tanto los animales portadores de tumor LB como los controles normales fueron sangrados a muerte por el plexo retro-orbital con una pipeta estéril. Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 40 minutos, procediéndose luego a dos centrifugaciones de 1500 y 2000 rpm. El suero así obtenido se guardó a una temperatura de -20 °C hasta su uso. Los sueros fueron rutinariamente deconplementados previamente a su utilización en ensayos in vitro.

Ensayo de incorporación de timidina tritiada:

La proliferación de células tumorales y normales en 0,1 ml de medio fue determinada en placas de 96 pocillos en presencia de 0.1 ml de diluciones seriadas de suero o fracciones de suero de ratones portadores de tumor o de ratones normales. Inmediatamente se agregó un pulso de timidina tritiada (timidina- H^3) (Dupont, NEM Research Products) en una concentración de 1mCi/ml. Las mezclas se incubaron en estufa gaseada (5% de CO_2), a 37 C durante 18 a 24 hs. Las células se cosecharon con un cosechador automático de células, y la radiactividad incorporada se midió en un contador Beta de centelleo líquido (Beckman,USA). El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{inhibición} = \left(1 - \frac{X \text{ cpm experimental}}{X \text{ cpm control}} \right) \times 100$$

En el caso de las células tumorales LB que crecen en suspensión, éstas fueron agregadas (1 a 3×10^5 células por pocillo) simultáneamente con el suero y la timidina- H^3 . En el caso de otras células tumorales (C7HI) ó normales (fibroblastos embrionarios, células endoteliales) que crecen adheridas a un soporte sólido, las células fueron sembradas en las placas 4 a 24 horas antes de adicionar el suero a testear y la timidina- H^3 . En el caso de los linfocitos normales, éstos fueron estimulados por 48 horas con Concanavalina A (Con A) antes de agregar el suero a testear y la timidina- H^3 .

Unidades inhibitorias 50 por mililitro (UI50/ml):

Se define a las unidades inhibitorias 50 (UI50) como la inversa de la dilución del suero que produce un 50 % de inhibición de la incorporación de timidina- H^3 observada cultivando las mismas células en RPMI. Por ejemplo, si 0.1 ml de suero en la dilución 1:16 produjera 50% de inhibición entonces habría 16 UI50 en 0.1 ml de suero, es decir 160 UI50 por ml

Adhesividad y fagocitosis de células adherentes peritoneales murinas.

Se sembraron 5×10^5 células provenientes del peritoneo de animales BALB.c normales en pocillos de 0.4 ml de fondo plano. A la hora se agregaron partículas de latex y se incubaron por otra hora.

Luego se lavaron para sacar las células que no se adhirieron y se fijaron las células adheridas con formol al 10 %. A continuación se coloreó con azul de toluidina. Se contaron las células adheridas en 10 campos por pocillo, las determinaciones se realizaron por duplicado. La fagocitosis se contó como el número de partículas fagocitadas por célula, independientemente del número de células adheridas. La inhibición de la adhesividad y de la fagocitosis se expresa en Uadh50 ml y Uifag50 ml respectivamente.

Adhesividad de polimorfonucleares humanos (PMN) a placas de plástico.

PMN provenientes de sangre periférica fueron aislados de muestras de sangre humana tratada con heparina por centrifugación en Ficoll-Hypaque (146) y sedimentados en dextran. Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica. Luego de lavadas, las células fueron resuspendidas en RPMI, suplementado con 50 mg/ml de gentamicina (TCM), hasta una concentración final de 2×10^6 PMN/ml. Alicuotas de 0.1ml de esa suspensión, conteniendo de 95-98% de neutrófilos, fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Luego se agregó Cr^{51} y las placas se incubaron en una estufa gaseada por 5 horas a 37°C con un 5% de CO_2 y 95% de humedad. Se procedió a retirar el sobrenadante. Las células adherentes fueron lisadas con HCl 3 N y cosechadas con un cosechador automático. La radiactividad fue medida en un contador gamma (Beckman). La cantidad de Cr^{51} en las células adheridas se consideró una medida de la adhesividad de los PMN.

Agregación de plaquetas humanas.

El plasma rico en plaquetas fue obtenido de sangre humana por centrifugación a 180 g por 10 min. El número de células fue ajustado a 5×10^8 ml^{-1} por adición de plasma pobre en plaquetas obtenidas por centrifugación (3000 g por 30 min.) de la muestra remanente de sangre. La agregación plaquetaria fue inducida con sal de araquidónico sódico 0.8 mM y medida en un Payton aggregometer (Chrono-Log 0 a 9.000 r.p.m. y 37°C) según bibliografía (147).

Purificación y caracterización de la actividad inhibitoria hallada en suero de ratones portadores de LB

Diálisis del suero:

Un volumen de 5 ml de suero de ratones normales o de portadores de tumor se dializó rutinariamente a través de membranas con punto de corte en 12.500 D (Fisher), contra un volumen de 50 ml de agua destilada y desionizada (milli-Q). La diálisis se realizó con agitación magnética durante 48 hs a una temperatura de 4° C. Diálisis de suero contra volúmenes menores fueron realizados también en determinadas ocasiones.

Liofilización:

La fracción dializable fue liofilizada (-50°C y 10 micrones de atmósferas de Hg). El producto fue resuspendido en 0,5 ml de agua milli-Q.

Cromatografía en columna:

Se utilizaron columnas de Sephadex G-25 fine y G-15 .

i) Sephadex G-25 :

Posee un rango de fraccionamiento para moléculas de 1.000 a 5.000 D. La altura fue de 84 cm X 0,7 cm de diámetro, con un flujo constante de agua milli-Q de 0,56 ml cada 74 seg. El volumen de la siembra es el 1,5 % respecto del volumen de la columna, lo cual nos permite usarla en forma analítica.

Los marcadores de peso molecular conocido utilizados fueron :

<u>Nombre</u>	<u>PM (en Daltons)</u>
Blue dextran	2.000.000
cadena α de la Insulina	2.531,6
cadena β de la Insulina	3.495,9
ATP	507,1
ADP	427,2

ii) Sephadex G-15 :

El rango de fraccionamiento es 0 a 1.500 D.

Se utilizaron columnas de 66 cm de altura, con un diámetro de 0.7 cm. El flujo de agua milli-Q se mantuvo constante a 0.56 ml cada 74 seg. El volumen de siembra respecto del volumen de la columna es del 2.5 %, lo que nos permite interpretar los resultados en forma analítica .

Se utilizaron las siguientes moléculas como marcadores :

<u>Nombre</u>	<u>PM (en Daltons).</u>
Blue dextran	2.000.000
Pestatina A	685,9
ATP	507,1
ADP	427,2

Digestión enzimática:

La fracción dializable (<12.500 D) obtenida a partir del SLB fue liofilizada y resuspendida en el volumen original. Se incubaron 0.6 ml de la muestra con 0,6 ml de las suspensiones enzimáticas (pronasa, carboxipeptidasa A, tripsina, lipasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, RNAsa, DNAsa) en distintas dosis. Las mezclas se incubaron durante 1h. a 37° C. y la reacción se detuvo por calentamiento a 100° C por 5 minutos. de acuerdo con Schiffman (148) y el "Worthington Enzyme Manual" (149). Se usaron como controles fracciones calentadas, incubadas con enzima inactivada por calor. Resultados previos habian mostrado que el calentamiento a 100°C no disminuía la actividad inhibitoria del suero.

Columna de intercambio aniónico:

Se utilizaron columnas DEAE A-25 de 25 cm de altura y 2 cm de diámetro preparadas en buffer fosfato 0.03 M. El flujo se fijó en 2.8 ml.minuto. Se vario la fuerza iónica utilizando el mismo buffer con una concentración creciente de NaCl hasta obtener 0.1 M y 0.2 M de concentración final. Se recogieron fracciones de 2 ml de cada concentración salina hasta completar 10 veces el

volumen de la columna. Las fracciones así obtenidas fueron probadas en un ensayo de incorporación de timidina- H^3 .

Cromatografía en capa delgada (TLC):

Se prepararon placas de silica gel tipo GF (Sigma) de 0,30 mm de espesor. Fracciones recogidas de la columna Sephadex G-15 que mostraron un alto título de inhibición de la incorporación de timidina- H^3 fueron liofilizadas y luego resuspendidos en una mínima cantidad del solvente de desarrollo. Se sembraron 0,004 ml de suspensiones (1 mg/ml) de marcadores.

El sistema de solventes utilizado fue N-butanol-ácido acético glacial-agua (10:3:1, v.v/v) (150). Después del secado, se procedió a revelar las placas con ninhidrina 0,1% en butanol.

Como marcadores de PM se utilizaron :

<u>Nombre</u>	<u>PM (en Daltons)</u>
Cadena α de Insulina	2531,6
Cadena β de Insulina	3495,9
Pepstatina A	685,9

También fueron sembrados marcadores de diferente naturaleza química:

<u>Nombre</u>	<u>PM (en Daltons)</u>
Tirosina	181,19
Alanina	89,09
Putrescina	88,15
Espermidina	145,24
Aminoguanidina	74,09

Cromatografía líquida (HPLC):

Con las fracciones obtenidas con columnas de Sephadex G-15 que demostraron poseer actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de células LB, se prepararon muestras liofilizadas que fueron sembradas en columnas

Sphervi-5 C₁₈ de 220 x 2.1 mm. utilizándose un Cromatógrafo Líquido modelo 140 de Applied Biosystems con detector de Diodo Array. Los solventes fueron A: trifluoracético (TFA) 0.1% y B: acetonitrilo (AcN) 80% en TFA 0.08%. Se realizó la corrida en un gradiente de 10 min a 0% de B. y luego hasta 60% en 60 min. El volumen sembrado fue de 20 a 30ml. Para ensayar la actividad de las fracciones sobre las células LB se eliminó previamente el solvente de elución (el AcN es tóxico para las células). El Diodo Array permite determinar el espectro de la zona del ultra violeta (u.v.) de cada pico obtenido en la cromatografía.

Análisis de aminoácidos:

El único pico de actividad inhibidora de la proliferación in vitro de las células LB que se obtuvo mediante el uso del HPLC fue dividido en dos partes, una de ellas se sembró en un Analizador de Aminoácidos, modelo 420 de Applied Biosystems con hidrolizador, perteneciente al LANAIS-PRO. Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (UBA-CONICET).

Metodológicamente se llevó a cabo una derivatización con PITC (unión del grupo amino terminal con fenil-iso-tiocianato) y separación de los PTC-AA (fenil-tiocarbamil-aminoácido) por cromatografía líquida de fase reversa. La identificación de los AAs se hace por su tiempo de retención en la corrida cromatográfica.

También se llevaron a cabo hidrólisis parciales, para lo cual se calienta la muestra a 110°C por sólo 1 hora. La degradación parcial permite separar los aminoácidos constituyentes pero mantener las modificaciones que éstos puedan tener.

Secuenciación de Aminoácidos:

Se utilizó un secuenciador automático modelo 477A de Applied Biosystems con un gradiente Premix. El método utilizado fue el de degradación de Edman. Brevemente, se inyectó un volumen de 10ml de la muestra y en cada ciclo de degradación se midió el tiempo de retención en corrida cromatográfica a intervalos de 1 segundo. Se grafica absorbancia a 269 nm (longitud de onda donde absorbe la fenil-tiohidantoina (PTH) unida al amino terminal) en función del tiempo de retención.

Espectrometría de masa:

Los espectros de masa fueron realizados por el método MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) usando una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. se utilizó un espectrómetro de masa Vestec modelo VT 2000. La desorción e ionización de las muestras se llevó a cabo en un Lumonics modelo HY 400 Nd:YAG. El ancho del pulso del laser fue de 10 ns y el rate de 10 Hz. Los iones fueron acelerados a 30 keV en la fuente y detectados en una malla multiplicadora de electrones a la salida del tubo (becton-Dickinson modelo MMI-1SG).

Como marcadores de PM se utilizaron:

<u>Nombre</u>	<u>PM (en Daltons)</u>
Insulina	5734
Hormona inductora de la secreción de la hormona luteinizante	1183

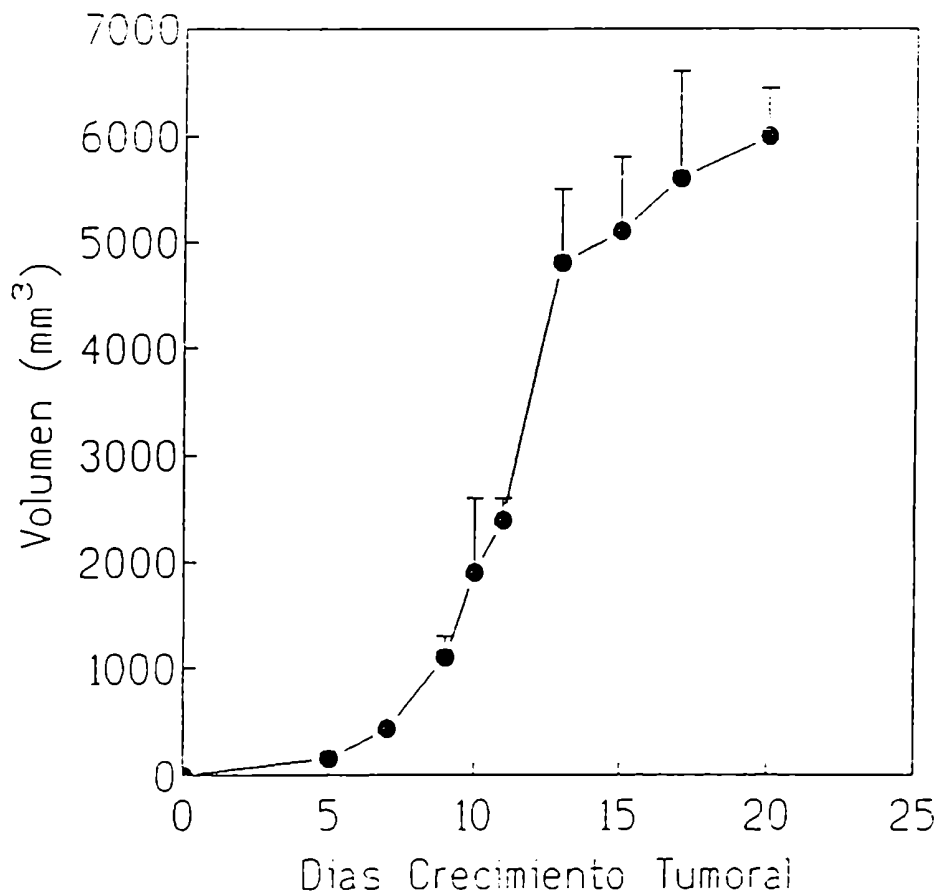
RESULTADOS

1. RESISTENCIA CONCOMITANTE (RC) INDUCIDA POR EL TUMOR LB.

Para confirmar y extender datos previos de nuestro laboratorio relativos al crecimiento del tumor LB y a la RC generada por él, doscientos cinco ratones BALB.c (n= 205) recibieron un implante sc de 1×10^6 células LB en el flanco derecho. De éstos, cincuenta ratones se emplearon para estudiar la cinética de crecimiento de este tumor (Fig.1). Los restantes 155 ratones recibieron, a distintos tiempos del inóculo primario, un implante secundario con distintas dosis de células LB en el flanco izquierdo. Los controles (n=128) sólo recibieron el implante de células LB en el flanco izquierdo. Como puede apreciarse en la Tabla I, la inhibición de la toma tumoral de un implante secundario se hace progresivamente más intensa cuanto mayor es el tamaño del tumor primario. En efecto, cuando el inóculo secundario se hace simultáneamente con el inóculo primario, sólo un implante de 1×10^4 células LB es inhibido pero uno de 1×10^5 ó 1×10^6 células LB no lo es. Cuando el inóculo secundario se hace al día 6 después del inóculo primario, un implante de 1×10^5 células LB es inhibido mientras que no lo es uno de 1×10^6 . Por último cuando el inóculo secundario se hace al día 9-11, aún un implante de 1×10^6 células LB es inhibido. Esto significa que la intensidad de la RC es proporcional al volumen del tumor primario que lo genera.

Resultados similares fueron observados en ratones nude, genéticamente atímicos, indicando que la RC generada por el tumor LB es independiente del timo. Si tenemos en cuenta además datos previos de nuestro laboratorio (138) en donde se demuestra que el tumor LB no es inmunogénico y no genera una respuesta inmune mediada por células ni por anticuerpos, podemos suponer que el mecanismo de RC inducido por el tumor LB no sería atribuible a mecanismos inmunológicos convencionales.

Figura 1: Cinética de crecimiento del tumor LB en ratones BALB/c.



Se grafican los volúmenes tumorales (en mm³) obtenidos en función de los días de desarrollo del implante. Brevemente, 50 ratones BALB/c recibieron un número constante de células tumorales LB (1×10^6) subcutáneamente inoculadas en el flanco derecho. El volumen tumoral fue determinado como se describe en materiales y métodos.

Tabla 1: Inhibición del crecimiento del un implante tumoral secundario como medida de la resistencia concomitante generada por el tumor LB en ratones BALB/c.

Día de ^a crecimiento tumor	Incidencia de Tumor Secundario ^b (t/n)		
	N° células LB desafiadas		
	1x10 ⁴	1x10 ⁵	1x10 ⁶
0	2/19**	12/12 ns	18/18 ns
Control	18/18	12/12	12/12
3	0/12**	5/5 ns	7/7 ns
Control	12/12	4/4	9/9
6		0/48 **	17/22 ns
Control		30/30	19/19
9			0/6 *
Control			6/6
11			0/6 *
Control			6/6

a. Ratones BALB/c fueron subcutáneamente inoculados en el flanco derecho con 1x10⁶ células LB el día 0 (tumor primario).

b. A distintos tiempos del inóculo primario se realizaron implantes secundarios con distintas dosis de células LB en el flanco izquierdo (tumor secundario). La incidencia del tumor secundario fue registrada como el cociente entre el número de ratones donde creció el implante secundario (t) y el número de ratones inoculados (n).

Se utilizó el test Chi-cuadrado para determinar el grado de significación de los resultados.

*p<0.005; **p<0.0001, ns= no presenta diferencias significativas respecto de los controles.

2. EFECTO DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE INDUCIDA POR EL TUMOR LB SOBRE METASTASIS ESPONTANEAS.

En el punto anterior vimos el efecto inhibitorio que ejerce un tumor primario sobre implantes secundarios artificiales de tumor, es decir sobre implantes que habíamos llevado a cabo experimentalmente. En este punto nos preguntamos si esta inhibición también puede ser llevada a cabo sobre implantes secundarios naturales, es decir sobre metástasis espontáneas ya establecidas. Como el tumor LB no genera metástasis espontáneamente se determinó el efecto que tiene la presencia del tumor LB sobre las metástasis inducidas por el tumor C7HI, que es altamente metastásico y que no genera RC contra implantes secundarios del mismo.

El experimento se realizó de la siguiente manera: setenta ratones recibieron un implante sc de 1×10^6 células C7HI en el flanco izquierdo y 30 días después cuando el tumor C7HI había alcanzado un volumen de $889.9 \pm 287.6 \text{ mm}^3$ (momento en el que según nuestra experiencia previa ya se han implantado numerosas metástasis de C7HI en pulmón), se extirpó el tumor C7HI sc.

Una semana después se inocularon 1×10^6 células de tumor LB, inductor de RC. La extirpación de C7HI fue llevada a cabo porque nuestro objetivo fue estudiar el efecto del tumor LB sobre metástasis ya establecidas; si el tumor C7HI hubiera seguido presente, los datos habrían sido oscurecidos o modificados por los nuevos focos metastásicos que el tumor C7HI habría ido generando por diseminación.

Veinticinco ratones BALB.c a los que se extirpó el tumor C7HI pero no inoculados con células LB fueron tomados como control positivo de metástasis. A los 19 días de la inoculación del tumor LB, se extrajeron los pulmones y se cuantificó el número de metástasis (>300 micrones) y micrometástasis (~ 300 micrones) generadas por C7HI. Se observó que los ratones portadores de tumor LB tenían 15 veces menos metástasis y 2 veces menos micrometastasis de C7HI.

en pulmón que los ratones controles a los que no se les había inoculado tumor LB (Tabla II, $p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente).

Para saber si dicho efecto era reversible se procedió a la extirpación del tumor LB a los nueve días de inoculado. Luego de 10 días se observó una reversión del efecto inhibitorio (Tabla II). Para descartar el efecto quirúrgico se llevó a cabo la sham operación del tumor LB, el cual siguió ejerciendo su efecto inhibitorio sobre las metástasis pulmonares de C7HI.

Los resultados obtenidos sugieren que: a) la RC inducida por el tumor LB es capaz de inhibir implantes secundarios naturales, es decir, metástasis espontáneas; b) la RC puede actuar en forma no-específica inhibiendo implantes de otros tumores incluso de aquéllos, como el C7HI que no generan RC contra sí mismos.

3. MECANISMO DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE

La RC puede ejercerse a través de un mecanismo directo de inhibición sobre las propias células tumorales, a través de un mecanismo indirecto de inhibición de la neovascularización tumoral ó a través de ambos.

3.1. Mecanismo directo: Para evaluar si la RC podía actuar directamente sobre las células tumorales se realizaron dos tipos de experimentos: en el primero se midió la RC contra células tumorales ya vascularizadas y en activo crecimiento; en el segundo se midió la RC contra implantes que no se vascularizan para crecer. En ambos casos se supone que -deslindando un efecto indirecto sobre la neovascularización tumoral- toda inhibición del crecimiento tumoral podría atribuirse a una acción directa dirigida sobre las propias células tumorales.

3.1.1. Resistencia concomitante contra células tumorales vascularizadas y en activo crecimiento (Tabla III):

Tabla II: Efecto del crecimiento del tumor LB sobre el desarrollo de metástasis de tumor C7HI

ratones BALB/c ^a	N° de metástasis C7HI					
	X [rango]					
	>300 mm ³			<300 mm ³		
Ex-C7HI	65.1	[10-136]	(25) ^b	1.8	[1-5]	(40) ^c
Ex-C7HI, portadores LB	4.9	[0-38]	(28) ^{***}	0.7	[0-2]	(40) ^c
Ex-C7HI, ex-portadores tumor LB	27.2	[19-41]	(12) ^{**}	1.4	[1-4]	(40) ^{**}
Ex-C7HI, portadores LB sham-operados	5.2	[0-15]	(8) ^{***}	0.4	[0-4]	(40) ^{**}

a- Ex-C7HI: ratones a los que se extirpó el tumor C7HI.

Ex-C7HI portadores de LB: ratones ex-C7HI portadores de tumor LB durante 19 días.

Ex-C7HI, ex-portadores de LB: ratones ex-C7HI portadores de LB a los que se extirpó el tumor LB a los 9 días de crecimiento.

Ex-C7HI portadores de LB sham operados: ratones ex-C7HI portadores de LB a los que se simula una operación de extirpación de LB a los 9 días de crecimiento.

b- Número de ratones analizados.

c- Número de campos analizados.

Se utilizó el test Kruskal-Wallis y luego el test de comparación múltiple de Dunn para determinar el grado de significación de los resultados.

* p<0.05; **p<0.005; ***p<0.001; ns= no presenta diferencias significativas respecto del valor obtenido para los ex-C7HI.

Para determinar si la RC podía inhibir no sólo implantes secundarios sino también células tumorales vascularizadas y en activo crecimiento, 24 ratones BALB c recibieron simultáneamente dos implantes sc de 1×10^6 células LB: uno en el flanco derecho y el otro en el flanco izquierdo. Seis días más tarde, el tumor incipiente en el flanco izquierdo fue parcialmente extirpado en 18 ratones, dejando una masa correspondiente a 2×10^5 (n=6); 1×10^4 (n=6) y 2×10^3 (n=6) células LB. Tres días después, es decir, al día 9 del inóculo primario, el tumor en el flanco izquierdo fue parcialmente extirpado en los seis ratones restantes, dejando una masa correspondiente a 1×10^4 células LB. El número de células LB remanentes en el flanco izquierdo después de la extirpación parcial fue calculada en 12 ratones que fueron operados de idéntica forma y sacrificados para contar las células tumorales remanentes. El crecimiento de las células LB dejadas en el flanco izquierdo, fue comparado con controles operados de la misma manera, pero no portadores del tumor primario. Los resultados detallados en la Tabla III, mostraron que cuando el tumor primario era de 6 días, 2×10^5 y 1×10^4 células LB vascularizadas crecían en el 100% de los ratones igual que en los controles, aunque el crecimiento de 1×10^4 células LB fue un poco más lento; por otro lado, cuando el número de células remanentes vascularizadas fue 2×10^3 sólo 1.6 ratones mostraron crecimiento ($p < 0.05$) tumoral mientras que en 5.6 controles el tumor creció. Cuando el tumor primario era de 9 días, aún 1×10^4 células LB vascularizadas fueron inhibidas en su crecimiento. El periodo de observación entre la operación y la muerte de los ratones fue de 11-14 días respectivamente. Es interesante notar que 2×10^5 , 1×10^4 y 2×10^3 células LB vascularizadas dieron lugar a un tumor palpable en el flanco izquierdo de los ratones no portadores de tumor primario en sólo 2, 3 y 4 días respectivamente. Esta es una latencia muy corta comparada con la requerida para que implantes (no vascularizados) de 2×10^5 , 1×10^4 y 2×10^3 se hagan palpables (7, 14 y 18 días respectivamente).

Tabla III: Efecto de la presencia de un tumor primario sobre implantes secundarios vascularizados.

Días de Crecimiento Tumor Primario ^a	Incidencia Tumor Secundario ^b		
	(t/n)		
	Nº de Células Creciendo sc		
	2x10 ⁵	1x10 ⁴	2x10 ³
6	6/6 ns	6/6 ns	1/6 *
Control	6/6	6/6	5/6
9		2/6 *	
Control		6/6	

a- Ratones BALB/c recibieron simultáneamente (día 0) dos implantes sc de 1x10⁶ células LB: uno en el flanco derecho y el otro en el flanco izquierdo.

b- Seis ó nueve días más tarde, el tumor en el flanco izquierdo fue parcialmente extirpado, dejando una masa correspondiente a 2x10⁵; 1x10⁴ ó 2x10³ células LB. El crecimiento de las células LB dejadas en el flanco izquierdo fue comparado con controles no portadores del tumor primario en flanco derecho. La incidencia del tumor en el flanco izquierdo fue registrada como t/n donde t es el número de ratones con tumor y n el número de ratones inoculados.

Se utilizó el test Chi-cuadrado para determinar el grado de significación de los resultados.

*p<0.05, ns= no presenta diferencias significativas respecto del control

3.1.2. Resistencia concomitante contra implantes intraperitoneales de células tumorales (Tabla IV):

Para determinar si la RC podía inhibir implantes secundarios que no necesitan vascularizarse para crecer, se hizo el siguiente experimento: 24 ratones BALB c fueron inoculados por vía sc con 1×10^6 células LB en el flanco derecho. Siete o diez días después, grupos de 6 ratones recibieron un implante i.p. de 5×10^4 ó 2×10^3 células LB. Los controles fueron 12 ratones inoculados i.p. de la misma forma pero no portadores de tumor LB sc. Las células LB inoculadas i.p. no necesitan de la vascularización para crecer ya que lo hacen en forma ascítica en la cavidad peritoneal. Precisamente, la presencia de ascitis permite determinar si el inóculo i.p. ha crecido ó no. Los resultados consignados en Tabla IV mostraron que cuando el tumor primario era de siete días el implante i.p. de 5×10^4 células LB creció igual que en los controles, mientras el implante de 2×10^3 fue completamente inhibido. Cuando el tumor primario era de diez días ambos implantes i.p. fueron inhibidos.

De estos dos experimentos se desprende que la presencia del tumor LB inhibe, en forma proporcional al volumen tumoral, tanto la proliferación de células LB vascularizadas como el desarrollo de implantes de LB que no necesitan vascularizarse para crecer. Esto sugiere que, deslindado el efecto indirecto sobre la neovascularización tumoral, la inhibición generada por RC en estos experimentos, sería dirigida contra las propias células LB.

3.2. Mecanismo indirecto

En el punto anterior hemos visto que la RC puede ejercer su acción inhibitoria a través de un efecto directo sobre las células tumorales. A continuación estudiaremos si la RC puede ejercerse también a través de un efecto indirecto, a saber, a través de la inhibición de la neovascularización.

Tabla IV: Efecto de la presencia de un tumor primario sobre implantes secundarios intraperitoneales.

Días de Crecimiento Tumor Primario ^a	Incidencia Tumor Secundario ^b	
	(t/n)	
	N° de Células Creciendo ip	
	5x10 ⁴	2x10 ³
7	6/6 ns	0/6 **
Control	6/6	6/6
10	2/6 *	0/6 **
Control	6/6	6/6

a- Ratones BALB/c fueron inoculados por vía sc con 1x10⁶ células LB en el flanco derecho.

b- Siete ó diez días después del inóculo primario los ratones recibieron un implante secundario i.p. de 5x10⁴ ó 2x10³ células LB. Los controles fueron ratones inoculados i.p. de la misma forma pero no portadores de tumor LB sc. La incidencia del tumor secundario fue registrada como t/n, donde t es el número de ratones con tumor ip y n es el número de ratones inoculados.

Se utilizó el test Chi-cuadrado para determinar el grado de significación de los resultados.

*p<0.05; ** p<0.005 ; ns= no hay diferencias significativas respecto del control.

mecanismo necesario para el crecimiento de un tumor sólido. Para contestar esta pregunta hemos realizado los siguientes experimentos:

3.2.1. Efecto del crecimiento del tumor LB sobre la neovascularización inducida por MEP, LSA Y FE (Tabla V).

Los macrófagos singeneicos peritoneales estimulados con tioglicolato (MEP), linfocitos semi-alogeneicos (LSA) y fibroblastos embrionarios singeneicos (FE) inducen una respuesta vasoproliferativa cuando son inoculados sc en ratones normales. Por otro lado cuando fueron inoculados sc en ratones portadores de un tumor LB contralateral, se observó una inhibición de la neovascularización.

La intensidad de esta inhibición fue proporcional al volumen del tumor primario. En efecto, cuando el tumor LB era relativamente pequeño ($100-300 \text{ mm}^3$) fue posible observar una disminución significativa en el recuento de vasos por área respecto de los valores observados en ratones normales, sólo cuando las concentraciones de MEP y FE fueron bajas ($2-5 \times 10^6$ en 0.1 ml). En cambio, cuando el tumor LB era mayor ($1000-2000 \text{ mm}^3$) todas las concentraciones ensayadas de MEP, FE y LSA indujeron un número significativamente menor de vasos que el control (Tabla V)

3.2.2. Efecto del crecimiento del tumor C7HI (no inductor de RC) sobre la neovascularización inducida por MEP, LSA Y FE.

Así como se ha descrito que el tumor LB es un fuerte inductor de resistencia concomitante, un ejemplo de la ausencia total de dicha capacidad es el tumor C7HI. Este tumor altamente metastásico fue desafiado en condiciones similares a las empleadas para el tumor LB. Los resultados resumidos en la Tabla VI no muestran diferencia significativa respecto de la neovascularización inducida por MEP, LSA y FE en ninguna de las concentraciones estudiadas.

Tabla V: Angiogénesis inducida por MEP, LSA y FE en ratones BALB/c normales y portadores de tumor LB.

Angiogénesis Inducida por ^a		Número de vasos por cm ² (X+ES)				
		Normal	Portador de Tumor LB (mm ³) ^b			
			100-300		1000-2000	
RPMI		0.6±0.5 (17) ^c	0.8±0.4 (18)	0.3±0.1 (18)		
MEP	2x10 ^{6d}	12.4±2.7 (12)	5.5±1.0 (15) [*]	2.3±0.6 (18) ^{***}		
	5x10 ⁶	31.5±3.8 (14)	17.1±1.3 (15) ^{**}	5.6±1.8 (15) ^{***}		
	10x10 ⁶	39.5±5.0 (16)	27.9±4.2 (16) ^{ns}	17.1±2.6 (18) ^{***}		
	10x10 ⁶ G ^e	1.2±0.6 (7)	1.0±0.2 (9) ^{ns}	0.9±0.4 (8) ^{ns}		
LSA	2x10 ⁶	3.9±1.0 (15)	2.1±0.7 (15) ^{ns}	0.5±0.3 (16) ^{**}		
	5x10 ⁶	11.5±4.2 (13)	12.1±2.3 (18) ^{ns}	2.1±0.6 (12) ^{***}		
	10x10 ⁶	23.3±3.0 (15)	19.1±2.1 (17) ^{ns}	10.0±2.4 (14) ^{**}		
	10x10 ⁶ G	0.9±0.3 (8)	0.7±0.5 (9) ^{ns}	0.3±0.3 (6) ^{ns}		
FE	2x10 ⁶	7.7±1.0 (18)	0.9±0.3 (17) ^{***}	0.7±0.1 (18) ^{***}		
	5x10 ⁶	13.3±2.4 (17)	3.7±0.7 (18) ^{***}	1.2±0.6 (16) ^{***}		
	10x10 ⁶	23.2±2.9 (16)	17.2±2.5 (18) ^{ns}	11.1±1.8 (16) ^{**}		
	110x10 ⁶ G	0.8±0.4 (8)	0.3±0.2 (9) ^{ns}	0.5±0.4 (6) ^{ns}		

a- Macrófagos de exudado peritoneales (MEP), linfocitos semi-alógenicos (LSA) y fibroblastos embrionarios (FE) fueron inoculados en el flanco contralateral al sitio de crecimiento de un tumor LB (tumor primario) cinco días antes de finalizar el experimento.

b- Ratones BALB/c fueron inoculados con 1x10⁶ células LB en el flanco derecho. El volumen tumoral en mm³ fue determinado el día de la finalización del experimento.

c- Número de ratones analizados.

d- Número de células inductoras de angiogénesis inyectadas sc en 0.1 ml.

e- Células muertas por glutaraldehído.

* p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns= no presenta diferencias significativas en comparación con el control normal.

Se analizaron los datos por ANOVA y el test de comparación múltiple Tukey-Kramer.

Tabla VI: Angiogénesis inducida por MEP, LSA y FE en ratones BALB/c normales y portadores de tumor C7HI.

Angiogénesis Inducida por ^a		Número de vasos por cm ² (X+ES)					
		Normal		Portador Tumor C7HI (mm ³) ^b			
				100-300	1000-2000		
RPMI		1.1±0.2	(12) ^c	1.0±0.4	(11)	0.8±0.3	(8)
MEP	5x10 ^{6d}	27.5±3.8	(10)	35.3±6.8	(9) ^{ns}	29.6±6.4	(10) ^{ns}
	5x10 ⁶ G ^e	2.3±0.9	(6)	2.1±0.7	(6) ^{ns}	2.1±0.6	(6) ^{ns}
LSA	5x10 ⁶	13.2±4.0	(11)	17.9±7.0	(8) ^{ns}	19.5±5.6	(8) ^{ns}
FE	5x10 ⁶	17.4±4.2	(8)	15.8±4.6	(8) ^{ns}	9.9±2.9	(7) ^{ns}

a- Macrófagos de exudado peritoneales (MEP), linfocitos semi-alogeneicos (LSA) y fibroblastos embrionarios (FE) fueron inoculados en el flanco contralateral al sitio de crecimiento de un tumor C7HI cinco días antes de finalizar el experimento.

b- Ratones BALB/c fueron inoculados con un trozo de tumor C7HI en el flanco derecho. El volumen tumoral en mm³ fue determinado el día de la finalización del experimento.

c- Número de ratones analizados.

d- Número de células inductoras de angiogénesis inyectadas sc en 0.1 ml.

e- Células muertas por glutaraldehído.

ns= no presenta diferencias significativas en comparación con el control normal.

Se analizaron los datos por ANOVA y el test de comparación múltiple Tukey-Kramer.

Tampoco se verifican diferencias respecto de los valores controles a ningún volumen tumoral.

3.2.3. Reversibilidad del fenómeno de inhibición de la neovascularización en ratones portadores de tumor LB.

Con el objeto de investigar si el efecto anti-angiogénico ejercido por el tumor LB era reversible, éste fue extirpado cuando tenía un volumen de 1000 mm^3 y simultáneamente se inocularon 5×10^6 MEP en el flanco contralateral. Como es posible observar en la Tabla VII la extirpación revirtió la inhibición de la neovascularización a valores que no presentan diferencias significativas con los obtenidos en ratones normales (grupo control). En el grupo en el que se practicó una operación pero sin extracción del tumor, no se observaron diferencias significativas con los valores obtenidos cuando el tumor era conservado intacto por lo que se descarta que la reversibilidad del fenómeno sea debida al procedimiento quirúrgico.

3.2.4. Estudio de la microvascularización.

La observación macroscópica del sitio de inoculación de células inductoras de neovascularización muestra un gran número de vasos con distribución radial en ratones normales (Fig.2-A, izquierda). Resultados similares se observaron en portadores de tumor C7H1. Por el contrario en los ratones portadores de tumor LB se observa un número menor de vasos en el sitio de inoculación (Fig.2-B, izquierda). Sin embargo, el método utilizado no permite la observación de los vasos más pequeños (microvascularización). Con el objeto de estudiar la microvascularización inducida, se examinaron histológicamente las áreas periféricas al sitio de inoculación de 10×10^6 MEP usando tinción con hematoxilina-eosina y anticuerpos anti factor von Willebrand. En los ratones normales se observaron gran número de vasos (Fig 2-A, derecha) contrastando drásticamente con lo observado en los ratones

Tabla VII: Efecto de la extirpación del tumor LB sobre la neovascularización inducida por inoculación de MEP.

Angiogénesis Inducida por ^a		Número de vasos por cm ² (X+ES)			
		Normal	Portador LB ^b	Ex portador LB	Sham operado
RPMI		2.3±0.6 (5) ^c	1.2±0.5 (5)	1.9±0.5 (5)	0.9±0.4 (5)
MEP	5x10 ^{6d}	26.0±3.3 (6)	8.7±2.1 (6) ^c	19.3±1.4 (10) ^{ns}	9.9±1.0 (10) ^c

a- Macrófagos de exudado peritoneales (MEP) fueron inoculados en el flanco contralateral al sitio de crecimiento de un tumor LB (tumor primario) cinco días antes de finalizar el experimento.

b- Ratones BALB/c fueron inoculados con 1x10⁶ células LB en el flanco derecho. Al día 8, cuando el tumor tenía 1000 mm³ (simultáneamente con la inoculación en el flanco izquierdo de MEP) a un grupo de ratones se les extirpó el tumor (Ex-portador LB), otro grupo fue Sham operado y otro quedó con el tumor intacto (Portador LB). El experimento terminó el día trece.

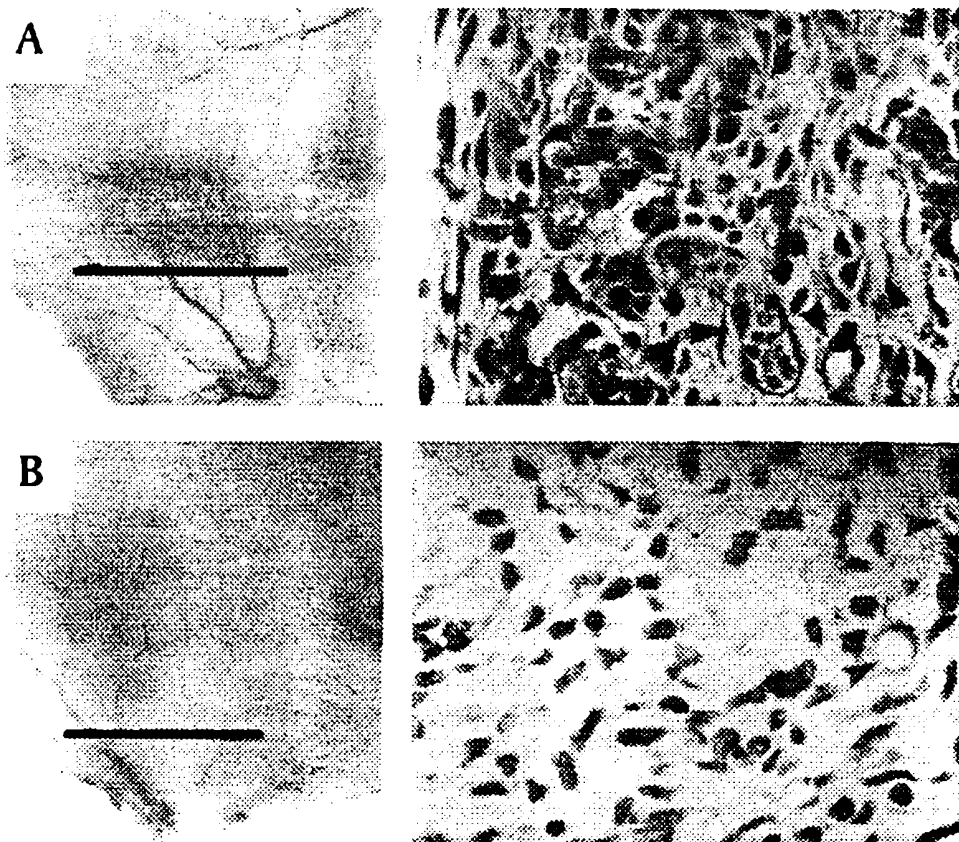
c- Número de ratones analizados.

d- Número de MEP inyectados sc en 0.1 ml.

*p<0.001; ns= no presenta diferencias significativas en comparación con el control normal.

Se analizaron los datos por ANOVA y se utilizó el test de comparación múltiple Tukey-Kramer.

Figura 2: Efecto del crecimiento del tumor LB sobre la neovascularización inducida por macrófagos provenientes de peritoneo (MEP)



Se inocularon 1×10^7 MEP en el flanco izquierdo de ratones BALB/c normales (A) y portadores de tumor LB de gran volumen ($1000-2000 \text{ mm}^3$) (B). Cinco días después se observa el desarrollo de neovasos convergentes al sitio del inóculo en los ratones normales (A) y escasa respuesta en los portadores de tumor LB (B).

La línea marca la distancia de 1 cm. El examen histológico de la zona cercana al inóculo de MEP utilizando tanto tinción con hematoxilina-eosina como anticuerpos anti factor von Willebrand muestra la gran densidad de microvasos generados en el ratón normal en comparación con el ratón portador del tumor LB.

portadores de tumor LB en los que el número de vasos era muy bajo (Fig.2-B. derecha)

3.2.5. Efecto de la creación de un lecho vascular previo sobre el crecimiento de un tumor LB secundario.

Se investigó si la generación de un lecho vascular previo a la inoculación de las células tumorales podía revertir el fenómeno de RC. Para ello, ratones portadores de tumor LB en el flanco derecho, recibieron diferentes concentraciones de MEP, LSA ó FE en el flanco izquierdo 5 días antes de inocular en el mismo sitio 1×10^5 células tumorales LB (desafío secundario). Ratones portadores de LB en el flanco derecho y desafiados con 1×10^5 células LB sirvieron como controles de RC. Los resultados resumidos en la Tabla VIII y en Fig.3 muestran que la inoculación previa de MEP, LSA ó FE es capaz de revertir parcialmente la inhibición del crecimiento inducida por el tumor LB sobre el desafío secundario, sugiriendo que parte de la RC generada por el LB podría deberse a una inhibición de la neovascularización tumoral. Cuando el mismo experimento se llevó a cabo con el tumor C7H1, que no induce RC, no se observaron diferencias significativas en la incidencia del tumor secundario, independientemente del volumen del tumor primario ensayado.

4. CORRELACION ENTRE RESISTENCIA CONCOMITANTE Y ACTIVIDAD ANTITUMORAL HALLADA EN EL SUERO DE RATONES PORTADORES DEL TUMOR LB.

4.1. Resistencia Concomitante contra metástasis experimentales:

En Tabla I se muestra que la RC contra un implante secundario de LB es proporcional al volumen tumoral. Ahora bien, los sueros de ratones BALB c portadores de un tumor LB subcutáneo de 300, 1000, 3000, 5000 y 6000 mm³

Tabla VIII: Efecto de la pre-inoculación de MEP, LSA y FE sobre la toma del tumor LB secundario.

Pre Tratamiento ^a	Incidencia Tumor Secundario (t/n) ^b				
	Normal	Portador Tumor Primario (mm ³)			
		Tumor LB ^d		Tumor C7HI	
		100-300	1000-2000	100-300	1000-2000
RPMI	34/34	5/35	0/30	30/30	32/32
MEP					
2x10 ^{6c}	12/12	7/24**	2/24**	12/12 ^{ns}	12/12 ^{ns}
5x10 ⁶	12/12	14/24*	4/24**	10/10 ^{ns}	10/10 ^{ns}
10x10 ⁶	11/11	20/24 ^{ns}	23/36*		
10x10 ⁶ G ^d	10/10	1/12**	1/12**		
LSA					
2x10 ⁶	11/11	2/26**	0/18**	12/12 ^{ns}	10/10 ^{ns}
5x10 ⁶	12/12	7/24**	5/23**		
10x10 ⁶	12/12	11/23*	9/24**		
10x10 ⁶ G	12/12	0/12**	0/12**		
FE					
2x10 ⁶	12/12	2/16**	2/24**	12/12 ^{ns}	12/12 ^{ns}
10x10 ⁶	12/12	6/15*	3/12**		
10x10 ⁶ G	12/12	0/11**	0/12**		

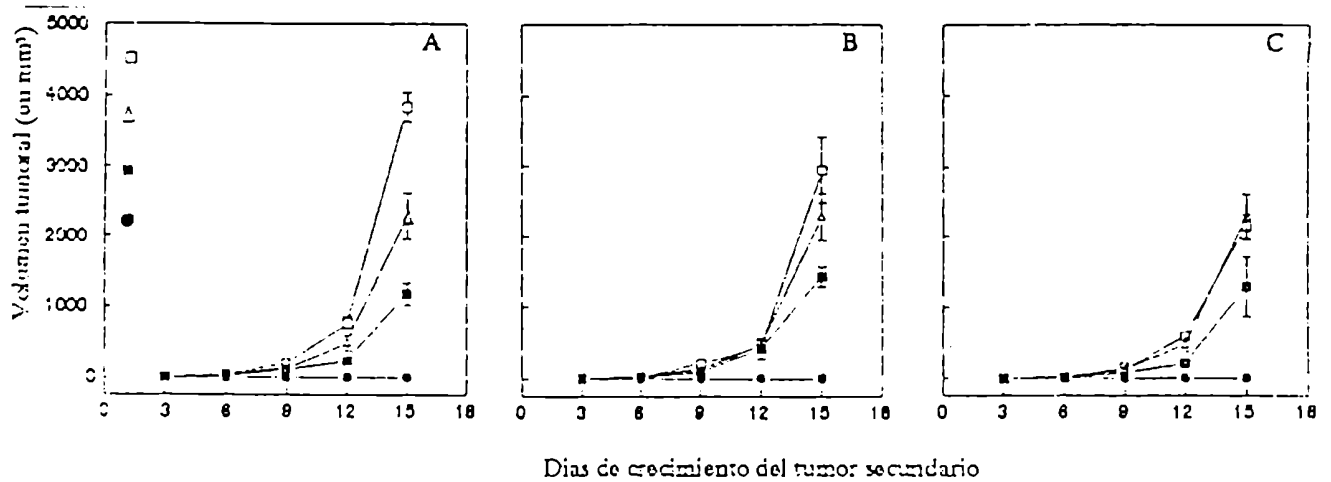
a-Macrófagos de exudado peritoneales (MEP), linfocitos semi-alogéneos (LSA) y fibroblastos embrionarios (FE) fueron inoculados en el flanco contralateral al sitio de crecimiento de un tumor LB o C7HI (tumor primario) cinco días antes de la inoculación de un desafío secundario de 1x10⁵ células LB.

b- Ratones BALB/c fueron inoculados con 1x10⁶ células LB ó un fragmento de tumor C7HI en el flanco derecho. El volumen tumoral fue determinado el día de finalización del experimento. La incidencia del tumor secundario fue registrada como el cociente t/n entre los ratones donde creció el implante secundario (t) y el número de ratones inoculados (n).

c- Número de células inductoras de angiogénesis inyectadas se en d- Células muertas por glutaraldehído.

* p<0.05; **p<0.001; ns= no presenta diferencias significativas en comparación con el control normal. Se utilizó el test Chi-cuadrado.

Figura 3: Efecto de la pre-inoculación de células normales del huésped sobre el crecimiento del tumor LB secundario



Se grafican los volúmenes tumorales (en mm^3) obtenidos en un experimento representativo en función de los días de desarrollo de los implantes secundarios.

Un número constante de células tumorales LB (1×10^5) fueron inoculadas en el flanco izquierdo de ratones BALB/c normales con (□) ó sin (△) pretratamiento como de portadores de tumor primario LB con (■) ó sin (●) pretratamiento. El pretratamiento consistió en la inoculación de 1×10^7 macrófagos peritoneales (MEP) (A),

linfocitos semi-alógenicos (LSA) (B) ó fibroblastos embrionarios (C) 5 días antes del desafío secundario con células LB en la misma zona. El volumen tumoral fue determinado como se describe en materiales y métodos.

(ver Fig.1) mostraron en un ensayo de incorporación de timidina- H^3 un título de actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de las células LB que fue respectivamente 1, 2.3, 5.8, 10.3 y 18.9 veces más grande que el observado con suero normal (Tabla IX) sugiriendo que existe una correlación entre la intensidad de la RC observada in vivo y la actividad inhibitoria sérica. Similares resultados fueron obtenidos en ratones nude, indicando que esta actividad inhibitoria no es timo-dependiente. Todos los experimentos in vitro condensados en este punto y en los puntos siguientes fueron realizados utilizando rutinariamente sueros de complementados, aunque los sueros no de complementados dieron los mismos resultados.

4.2. Resistencia Concomitante contra metástasis espontáneas: En la Tabla II puede observarse que los ratones portadores de tumor LB inhiben el desarrollo de las metástasis inducidas por el tumor C7HI. En la Tabla X se muestra que estos ratones exhiben en su suero actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de las células C7HI, actividad que está ausente de los ratones que sólo portan ó que han sido operados del tumor C7HI. Esto sugiere que en el suero de los ratones portadores de tumor LB existe un factor(es) que tiene capacidad para inhibir in vivo la proliferación de las metástasis inducidas por el tumor C7HI.

5. EFECTO DEL SUERO DE RATONES PORTADORES DE LB SOBRE LA PROLIFERACION Y/O FUNCION DE LAS CELULAS NORMALES QUE INTERVIENEN EN LA NEOVASCULARIZACION TUMORAL.

Las células endoteliales (CE) y los fibroblastos son componentes de los neovasos tumorales; por otro lado, los linfocitos, los macrófagos y los propios

Tabla IX: Efecto del suero de ratones portadores de LB de distintos volúmenes sobre la proliferación in vitro de células LB.

Días del ^a inóculo primario	Volumen ^b tumoral (mm ³)	UI50/ml en Suero ^c (X±ES)	UI50 SLB ^d UI50 SN
0		33.2±10.5 (12) ^f (Suero Normal)	1
5	313.6±187.1 (46) ^e	33.2±13.8 (7) ns	1
10	888.9±287.9 (46)	76.4±23.8 (7) *	2.3
14	2917.0±350.4 (46)	192.6±27.6 (7)**	5.8
16	4789.2±503.6 (42)	342.0±64.2 (9)**	10.3
18	5439.6±748.3 (37)	627.5±93.9 (12)**	18.9

a- Se inocularon 1×10^6 células LB en el flanco derecho el día 0. A diferentes tiempos se sangraron ratones portadores de tumor y se midió la capacidad inhibitoria de la proliferación in vitro de células LB mediante ensayo de incorporación de timidina tritiada.

b- El día de sangrado se midió el volumen del tumor LB.

c- UI50/ml (Unidades inhibitorias 50 por ml): es la recíproca de la dilución del suero que produce 50 % de la inhibición de incorporación de timidina tritiada por células LB comparada con los valores obtenidos con medio de cultivo. UI50/ml representa el título de la actividad inhibitoria de los sueros por unidad de volumen.

d- Los datos representan el cociente entre el título de la actividad inhibitoria de los sueros de portadores de tumor LB (SLB) y el título del suero de ratones normales (SN). El título de actividad inhibitoria del SN es el obtenido el día 0 previo a la inoculación de las células tumorales.

e- Número de ratones analizados.

f- Número de experimentos realizados.

Se utilizó el test "t" de Student y luego el test de comparación múltiple de Dunnet para determinar el grado de significación de los resultados.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$; ns= no presenta diferencias significativas respecto del valor obtenido para el SN.

Tabla X: Efecto del suero de ratones portadores de tumor LB ó C7HI sobre la proliferación in vitro de células tumorales C7HI.

Sucros de ratones	UI50/ml (X+ES)
a) Normales	35.9 ± 2.3
b) Portador LB:	319.5 ± 0.6*
c) Portador C7HI:	35.0 ± 5.0 ^{ns}
d) Ex-portador C7HI:	34.1 ± 1.8 ^{ns}
e) Ex-portador C7HI + LB:	318.1 ± 7.2*

Inhibición de la proliferación de células tumorales C7HI, medida como capacidad de incorporación de timidina- H^3 .

Se esquematizan los resultados obtenidos para el suero de ratones BALB/c a) normales; b) portadores de tumor LB; c) portadores de tumor C7HI; d) portadores de tumor C7HI, el cual fue extirpado al día 30 y e) ratones tratados de igual forma que en d) pero a los que se les inoculó 1×10^6 células LB. Los volúmenes de los tumores LB en b) y e) son similares al momento del sangrado. Los valores se expresan como X±ES en UI50/ml, producto de 3 experimentos.

Se utilizó el test "t" de Student y luego el test de comparación múltiple Tukey-Kramer para determinar el grado de significación de los resultados.

* $p < 0.001$; ns= no presenta diferencias significativas respecto del valor obtenido para el control normal.

fibroblastos participan en el proceso de neovascularización liberando moléculas angiogénicas. Por este motivo se ensayó el suero de ratones portadores de tumor LB de 4500-5500 mm³ sobre la proliferación in vitro de linfocitos, fibroblastos y CE, sobre la adhesividad de macrófagos (MEP) y polimorfonucleares humanos (PMN) y sobre la fagocitosis de los MEP. Asimismo se ensayó sobre la agregación plaquetaria, que es un proceso que no interviene directamente en el fenómeno de neovascularización tumoral.

Como control positivo de actividad inhibitoria se ensayó el suero sobre la proliferación in vitro de células tumorales LB.

Puede apreciarse en la Tabla XI que el suero de ratones portadores de tumor LB inhibió significativamente la proliferación de linfocitos, fibroblastos y CE. También se obtuvo actividad inhibitoria sobre la adhesividad y fagocitosis de los MEP y la adhesividad de los PMN humanos. Sin embargo de la agregación plaquetaria no fue afectada.

Con el objeto de estudiar si la inhibición ejercida por el suero de ratones portadores de tumor sobre células normales era, al igual que la ejercida sobre las células tumorales LB, reversible, estudiamos la capacidad de adherencia de los PEM, un sistema sencillo que había mostrado poseer suficiente sensibilidad y repetibilidad. Los resultados así obtenidos se grafican en la Fig.4. Es posible observar que entre las 5 y 7 horas los PEM que habían sido pretratados con SLB y luego lavados alcanzaron valores de adhesión comparables a los obtenidos con medio de cultivo, lo que sugiere que el fenómeno sería reversible.

Estos experimentos sugieren que el suero de ratones portadores de tumor LB no inhibe la proliferación y/o función de cualquier célula desde que hay células (plaquetas) y procesos (agregación plaquetaria) no involucrados en la neovascularización tumoral, que no son afectados.

Tabla XI: Efecto del suero de ratones BALB/c portadores de tumor LB (SLB) y ratones normales (SN) sobre células normales que intervienen en la vascularización.

Función y ^a tipo celular	UI50/ml b (X+ES)		UI50 SLB	n
	SN	SLB	UI50 SN	
A) Proliferación:				
células LB				
linfocitos	42.8±10.4	477.0±61.2 **	11.1	3
fibroblastos	33.4±10.5	251.1±38.5 ***	7.5	4
CE	42.3±7.8	160.5±14.1 *	3.8	2
	27.9±4.0	75.0±8.7 **	2.7	3
B) Adhesividad:				
MEP	62.3±10.2	430.2±40.1 ****	6.9	7
PMN humanos	27.0±7.0	256.1±28.3 ***	9.5	3
C) Fagocitosis:				
MEP	20.0±3.8	152.1±15.9 ****	7.6	7
D) Agregación plaquetaria:				
	20.5±4.3	20.3±2.5 ^{ns}	1.0	3

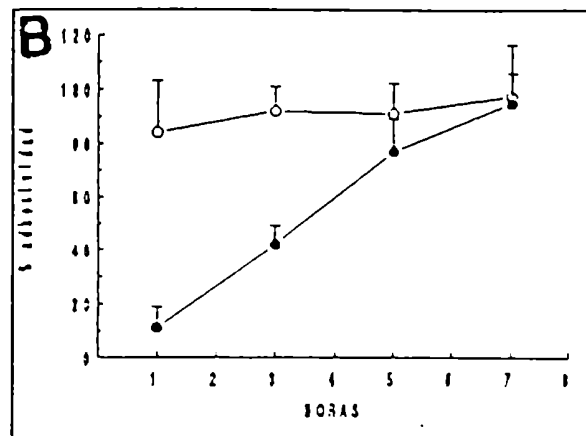
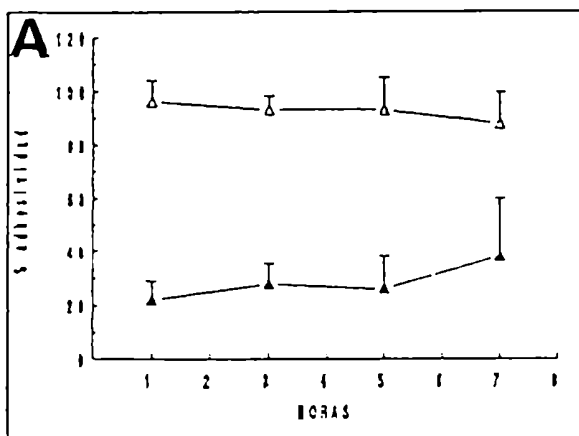
a. Suero de ratones BALB/c portadores de tumor LB y normales (SN) fueron ensayados in vitro sobre: A) proliferación de linfocitos T estimulados con Concanavalina A; fibroblastos de embriones murinos de 14 días y células endoteliales (CE) estimuladas con bFGF y células tumorales LB (control positivo de actividad antiproliferativa). Los ensayos de proliferación se realizaron mediante el método de incorporación de timidina tritiada; B) adhesividad y fagocitosis de macrófagos provenientes de exudado peritoneal (MEP) y polimorfonucleares humanos (PMN); C) fagocitosis de partículas de látex por los MEP y D) agregación de plaquetas humanas obtenidas de sangre periférica.

b. La UI50/ml utilizada aquí no es sólo una medida de actividad antiproliferativa, es la recíproca de la dilución del suero que produce un 50% de A) la incorporación de timidina tritiada; B) la adhesividad; C) la fagocitosis y D) la agregación plaquetaria obtenida por las mismas células con RPMI.

Se utilizó el test "t" de Student para determinar el grado de significación de los resultados.

*p<0.01; **p<0.005; ***p<0.001; ****p<0.0001; ns= no presenta diferencias significativas respecto del suero normal.

Figura 4: Reversibilidad del efecto inhibitorio ejercido por el suero de ratones portadores de tumor LB de gran volumen (SLB) sobre la adhesividad de los macrófagos intraperitoneales murinos (MEP).



Se grafican la adhesividad de los MEP a placa en función del tiempo. Se observan los resultados obtenidos en un experimento representativo donde los MEP fueron incubados con diluciones de suero de ratones portadores de tumor LB (▲) ó sueros de ratones normales (SN) (Δ). Luego, los MEP fueron lavados (Figura 4-B) mientras que otro permaneció en contacto con SN y SLB (Figura 4-A). Se grafica el porcentaje de células adheridas respecto de un control realizado en RPMI, en función del tiempo.

6. ORIGEN DEL FACTOR SERICO

El origen del factor inhibidor hallado en el suero de ratones portadores de tumor LB es aún objeto de controversia. Hasta hoy sólo ha sido ocasionalmente recuperada alguna actividad inhibitoria en medios condicionados de cultivos LB. Por otro lado la timectomía y la esplenectomía no alteran el título de actividad inhibitoria inducida por el tumor LB, sugiriendo que ni el timo ni el bazo jugarían un rol importante. Un posible indicio sobre el origen de esta actividad inhibitoria la suministra una serie de experimentos en los cuales ratones portadores de LB recibieron diferentes drogas anti-inflamatorias. En efecto, la inoculación in vivo de indometacina (Indo), ácido nordihidroguayarético (NDGA), fenidona (Fen), clor-promazina y prometazina resultó en una brusca caída de la actividad inhibitoria sérica a las 24 horas post-inoculación (Tabla XII). Estos resultados fueron en algunos casos aditivos, ya que cuando se trató a los ratones con Indo + NDGA la inhibición cayó a valores similares a los observados con SN. Luego de 48 horas la actividad inhibitoria comenzó a recuperarse especialmente en los ratones tratados con INDO, en los cuales el valor a las 48 horas no varió significativamente respecto a los valores observados para el SLB control. El volumen tumoral no mostró diferencias significativas entre los ratones tratados y no tratados con estas drogas anti-inflamatorias.

7. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA PROLIFERACION IN VITRO DE CELULAS TUMORALES LB (Esquema II).

7.1. Diálisis: Hemos visto que el suero de ratones BALB c portadores de tumor LB (SLB) tenía la capacidad de inhibir la proliferación de células LB in vitro y que esta capacidad era proporcional al volumen del tumor primario y a la intensidad de la resistencia concomitante generada por éste. Esta actividad se

Esquema II

Esquema general de los pasos de purificación

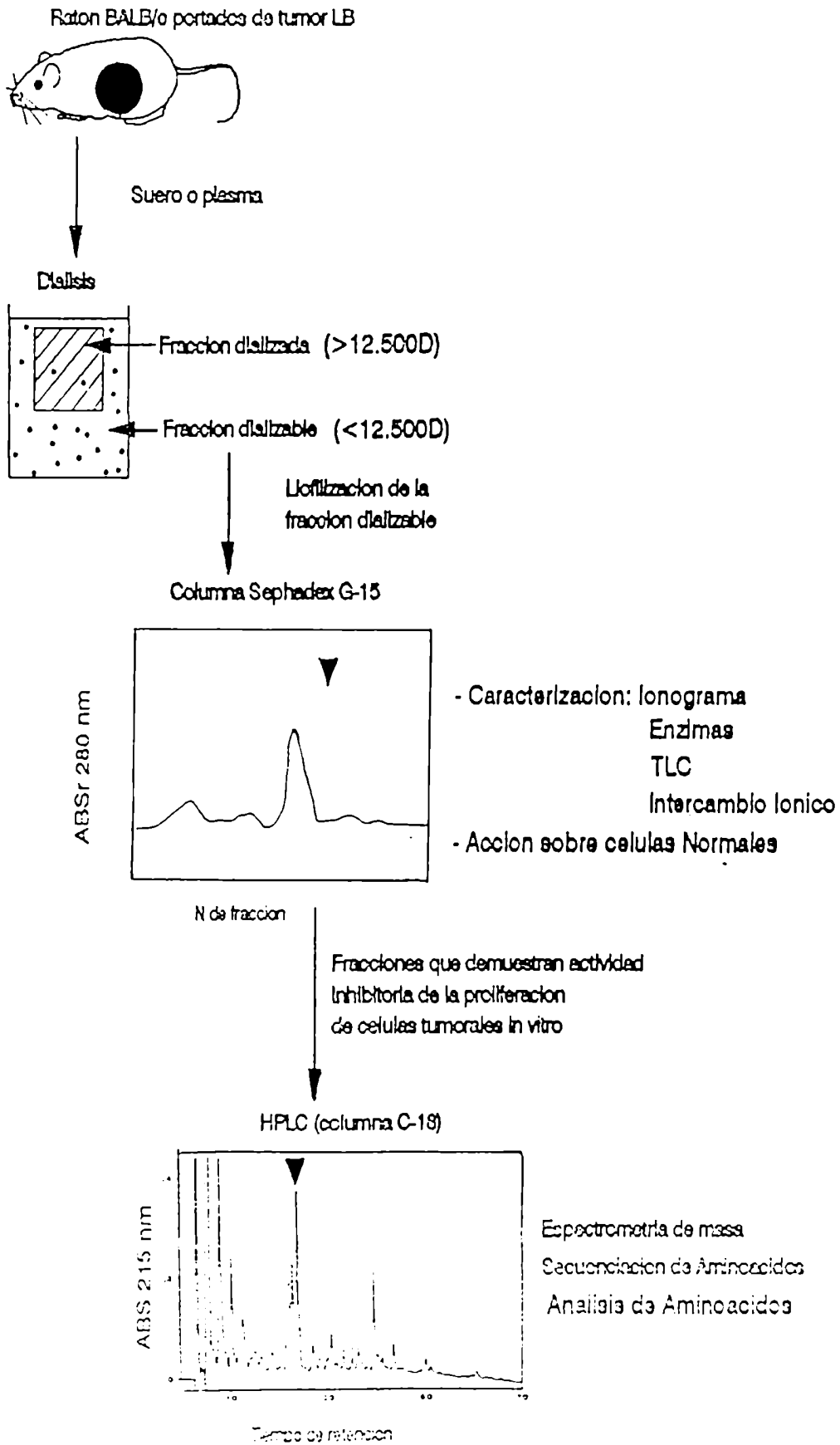


Tabla XII: Efecto de la inoculación de anti-inflamatorios sobre la capacidad inhibitoria in vitro del suero de ratones portadores de tumor LB

Tratamiento ^a	UI50/ml (X ± ES)			
	Suero Normal		Suero Portador de tumor LB	
Sin tratamiento (control)	42.9 ± 4.0	(9) ^b	450.2 ± 55.6	(9)** ^c
Indometacina				
24 horas después	62.8 ± 7.6	(3)	153.5 ± 31.3	(3)ns
48 horas después	161.5 ± 25.3	(3)	640.3 ± 64.5	(3)**
NDGA				
24 horas después	120.2 ± 22.6	(3)	119.9 ± 24.1	(3)ns
48 horas después	40.3 ± 3.0	(3)	140.5 ± 27.4	(3)ns
Fenidona				
24 horas después	50.1 ± 8.6	(2)	87.3 ± 15.7	(2)ns
48 horas después	40.7 ± 12.8	(2)	346.2 ± 87.8	(2)*
Indometacina + NDGA				
24 horas después	40.2 ± 75.9	(3)	47.3 ± 15.5	(3)ns
48 horas después	48.9 ± 3.0	(3)	57.3 ± 20.3	(3)ns
Clorpromazina				
24 horas después	42.8 ± 5.8	(3)	52.0 ± 11.6	(3)ns
Prometazina				
24 horas después	52.0 ± 8.7	(3)	44.9 ± 5.2	(3)ns

a. Ratones BALB/c normales y portadores de tumor LB de 12 días (volumen tumoral= 2635 ± 336 mm³) recibieron durante tres días consecutivos 0.5 mg/Kg (0.2 ml intraperitoneal) de Indometacina (INDO), 5 mg/Kg (0.2 ml intraperitoneal) de ácido nor-dihidroguayarético (NDGA), 5 mg/Kg (0.2 ml intraperitoneal) de Fenidona (Fen), Indometacina más NDGA (0.4 ml intraperitoneales), Clorpromazina (0.024 mg/ratón) ó Prometazina (1 mg/kg). A las 24 y 48 horas después de la última inoculación se sangraron los ratones. Los sueros obtenidos fueron ensayados sobre la proliferación de células LB in vitro en un ensayo de 18/24 horas. b. N° de experimentos

c. Los sueros de ratones portadores de tumor LB que no recibieron tratamiento, exhibieron a los 15 y 16 días de evolución del tumor (correspondiente a 24 y 48 horas después de la última inoculación de anti-inflamatorios), valores similares de actividad inhibitoria, por lo que los datos de ambos días han sido combinados.

Se utilizó el test "t" de Student para determinar el grado de significación de los resultados.

* p<0.05; **p<0.0001; ns= no presenta diferencias significativas respecto del valor obtenido para el SN.

observó en sueros enteros y de complementados, siendo resistente a 100°C durante 10 minutos y a un rango de pH entre 4 y 11; además resultó ser dializable cuando se usó una membrana con un punto de corte de 12500 D (Tabla XIII).

7.2. Análisis de sustancias tóxicas: Antes de continuar con el proceso de purificación de la actividad inhibitoria pareció importante determinar si ésta podría ser atribuida a moléculas tóxicas. En la Tabla XIV se observa que la concentración de urea, creatinina y ácido úrico presente en el suero de portadores de tumor LB es similar a la del suero normal.

7.3. Tratamientos enzimáticos: La fracción dializable del suero de portadores de LB -fracción que retenía toda la actividad inhibitoria- fue sometida a tratamiento con distintas enzimas. Como se observa en la Tabla XV, el tratamiento con pronasa fue el único que produjo una disminución significativa de la capacidad inhibitoria del suero; el tratamiento con las restantes enzimas, a saber, carboxipeptidasa A, tripsina, lipasa, glicosidasas α y β , RNasa y DNasa no disminuyó la actividad inhibitoria del suero.

7.4. Sephadex G-25 fine: la fracción dializable se liofilizó y resuspendió en 0.5 ml de agua milli-Q. La muestra así obtenida se sembró en columnas de Sephadex G-25 fine. Los resultados obtenidos se esquematizan en la Fig.5.

En estas figuras se han graficado la inhibición de incorporación de timidina- H^3 por células LB y la absorbancia relativa (Abs_r) medida a 280 nm en función del número de la fracción de columna recogida.

Se observó un pico de inhibición de la proliferación de las células LB (103 ± 17 UI/50 ml) coincidiendo con el volumen final (V_f) de la columna.

Considerando que el rango de exclusión del Sephadex G-25 es de 5.000 a 1.000 D, el factor se tendría un P.M. aproximado a 1.000 D ó menos. Para

Tabla XIII: Actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de células tumorales LB en el suero completo o en fracciones de suero de ratones portadores de tumor LB (SLB) y ratones normales (SN).

Suero ^a ó Fracción de suero	Actividad Inhibitoria UI50/ml (X ± ES)			
	SN		SLB ^b	
Completo	43.3 ± 7.0	(7) ^c	427.0 ± 62.9	(7) ^{**}
Dializada vs				
1 volúmen	25.9 ± 12.2	(3)	281.0 ± 88.5	(5) ^{**}
Dializable vs				
1 volúmen	23.2 ± 8.5	(3)	259.4 ± 18.5	(3) ^{**}
Dializada vs				
10 volúmenes	<20	(5)	63.8 ± 13.2	(5) [*]
Dializada vs				
1000 volúmenes	<20	(4)	<20	(4) ^{**}

a. La diálisis se llevó a cabo con una membrana de punto de corte en 12.500 D. Similares resultados fueron obtenidos cuando el suero fue analizado contra solución fisiológica ó agua milli-Q, por lo que los datos han sido combinados. Rutinariamente los experimentos de diálisis son realizados con agua milli-Q. Cuando se dice .."vs 1, 10 ó 1000 volúmenes".. significa que 1 ml de suero se dializa contra 1, 10 ó 1000 ml de solución fisiológica ó de agua milli-Q.

b. Se emplearon sueros de ratones portadores de tumor LB de 16 días, con un volumen tumoral de 6000 mm³. Cada suero ó fracción de suero se ensayó sobre la proliferación in vitro de células LB mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada.

c. Número de experimentos.

Se utilizó el test "t" de Student. * p<0.05; ** p<0.001; ns: no muestra diferencias con el SN.

Tabla XIV: Concentración sérica de productos tóxicos.

Producto ^a	Concentración de productos tóxicos (X±SD) ^b	
	Suero de ratones	
	Normales	Portadores de tumor LB
Urea	0.59±0.10	0.57±0.20 ^{ns}
Creatinina	0.98±0.30	1.34±0.40 ^{ns}
Acido úrico	2.04±0.10	2.00±0.10 ^{ns}

a. La urea fue cuantificada por el método de la ureasa, la creatinina por el método de Jaffé y colaboradores y el ácido úrico por el método de Henry, Sabel y Kim.

b. Promedio de 3 experimentos

Se utilizó el test "t" de Student. ns= no hay diferencias significativas respecto del control normal.

Tabla XV: Efecto del tratamiento enzimático sobre la actividad inhibitoria in vitro de células tumorales LB.

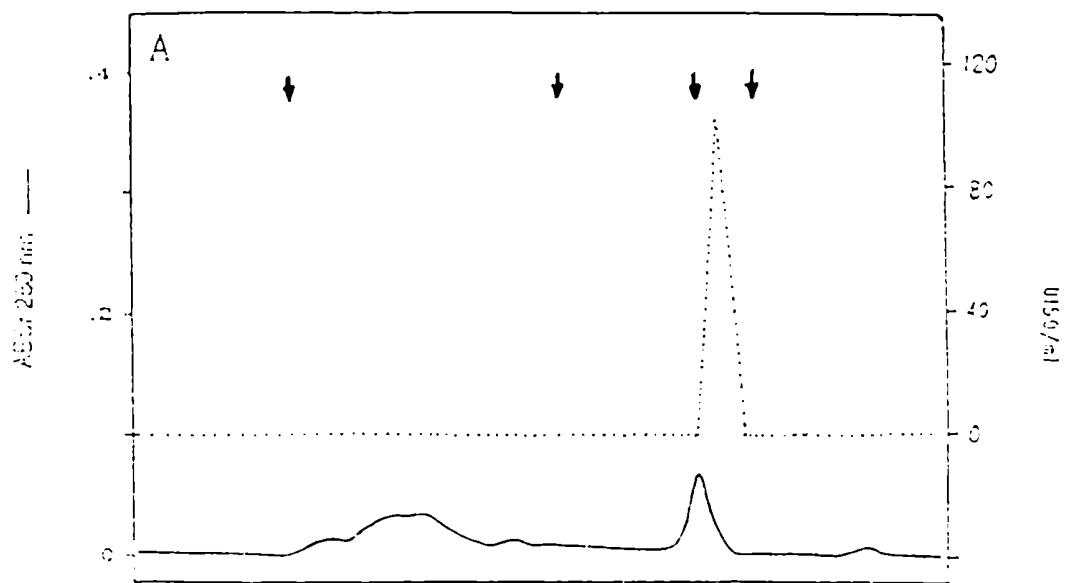
Nombre de la enzima	Dosis	% de reducción de la Inhibición	
Pronasa	5 mg/ml	77 ± 13	(4) ^a
	2 mg/ml	66 ± 34	(3)
	0.2 mg/ml	0	(3)
Carboxipeptidasa A	3 unidades	0	(3)
Tripsina	2 unidades	0	(3)
Lipasa	7.500 unidades	0	(1)
	1.500 unidades	0	(1)
	150 unidades	0	(1)
	15 unidades	0	(1)
α-glucosidasa	1 mg/ml	0	(2)
	0.1 mg/ml	0	(2)
	0.01 mg/ml	0	(2)
β-glucosidasa	1 mg/ml	0	(2)
	0.1 mg/ml	0	(2)
	0.01 mg/ml	0	(2)
RNAsa	1 mg/ml	0	(2)
DNAsa	1 mg/ml	0	(2)

El producto dializable (fracción <12.500 D) del suero de ratones portadores de LB que había demostrado poseer un alto título de inhibición de la proliferación in vitro de células LB fue liofilizado y resuspendido en su volumen original. La muestra así obtenida, que mantenía un alto título de inhibición de la proliferación de células LB, fue tratada con las enzimas. Luego de una hora a 37°C, la reacción se detuvo (ver materiales y métodos). Las fracciones así obtenidas fueron ensayadas sobre la proliferación de células LB mediante la técnica de incorporación de timidina tritiada. Los datos se expresan como porcentaje de reducción de la actividad según la siguiente formula:

$$\left(1 - \frac{\text{UI50/ml SLB tratado} - \text{UI50/ml SN tratado}}{\text{UI50/ml SLB} - \text{UI50/ml SN}} \right) \times 100$$

a. Número de experimentos realizados.

Figura 5: Perfil de elución de una columna Sephadex G-25 sembrada con suero de ratones portadores de tumor LB (SLB)



Se muestra un perfil de elución característico de columna Sephadex G-25 sembrada con el producto liofilizado de la fracción dializable obtenida a partir del SLB. Se grafica la magnitud de la inhibición de la incorporación de timidina tritio a células LB, medida en U150/ml y la absorbancia relativa (ABSr) a 280 nm, en función de la fracción ensayada.

↓ Marcadores de peso molecular.

determinar más exactamente el P.M., y dilucidar si se trataba de uno o más factores, se utilizaron las siguientes columnas:

7.5. Sephadex G-15. En la Fig.6 se grafican nuevamente la Abs, 280 nm y la inhibición de la incorporación de timidina- H^3 en función del número de fracción ensayada. Se han observado dos picos de inhibición en las fracciones 26 al 28 y en las fracciones 41 al 47. El primer pico de inhibición fue atribuido a un aumento del pH porque cuando éste se balanceó a valores fisiológicos (pH= 7.2:7.4) la actividad desapareció. Esto nos llevó a descartar este primer pico atribuyéndolo a un artefacto de técnica. El estudio prosiguió sólo con el segundo pico, el que por su posición en la columna tendría, por comparación con marcadores conocidos, un PM de 800 ± 150 D.

7.6. Determinación de la concentración de sales (ionograma).

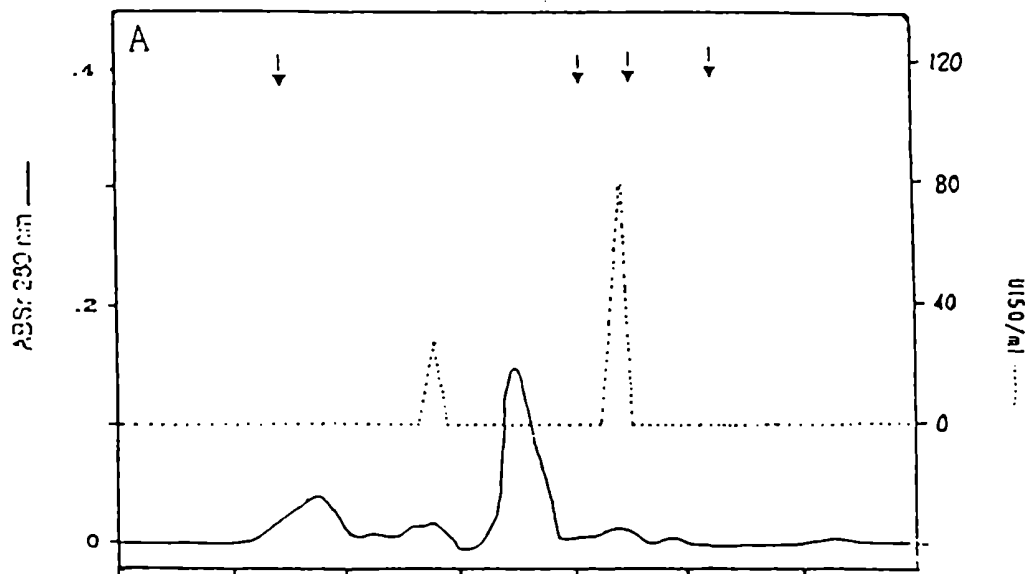
Al estar trabajando con sustancias de bajo P.M. existía la posibilidad de que la inhibición observada en el ensayo de incorporación de timidina- H^3 se debiera a una alta concentración de sales, lo que constituiría un artefacto de técnica (41).

Los resultados obtenidos se resumen en la Fig.7. En ella se representa la concentración de los iones más importantes (Na, Cl y K) para distintas fracciones que componen el segundo pico de inhibición obtenido con la columna de Sephadex G-15. En las fracciones con alta capacidad inhibitoria y en otras tomadas al azar, provenientes de columnas de Sephadex sembradas con el liofilizado del SLB, no se encontraron concentraciones superiores a las del SN control.

7.7. Cromatografía en capa delgada (TLC).

Fracciones provenientes de la columna Sephadex G-15 que demostraron tener alta capacidad inhibitoria de la proliferación in vitro de células tumorales (Fig.6) se utilizaron para realizar las cromatografías (sistema ácido) en capa

Figura 6: Perfil de elución de una columna Sephadex G-15 sembrada con suero de ratones portadores de tumor LB (SLB)



Se muestra un perfil de elución característico de columna Sephadex G-15 sembrada con el producto liofilizado de la fracción dializable obtenida a partir del SLB. Se grafica la magnitud de la inhibición de la incorporación de timidina tritiada a células LB, medida en U150/ml y la absorbancia relativa (ABSr) a 280 nm, en función de la fracción ensayada.

↓ Marcadores de peso molecular.

Figura 7: Ionograma de las fracciones de columna Sephadex G-15.

FIGURA 4-A

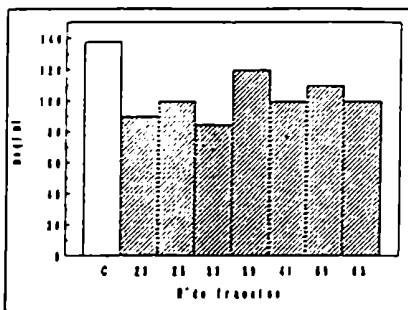


FIGURA 4-B

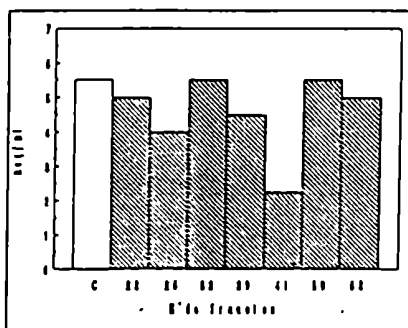
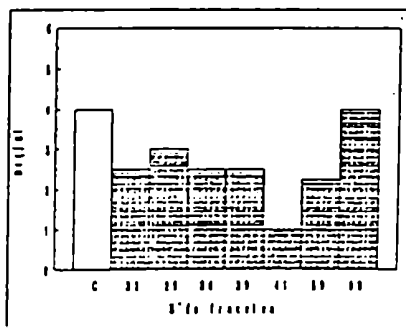


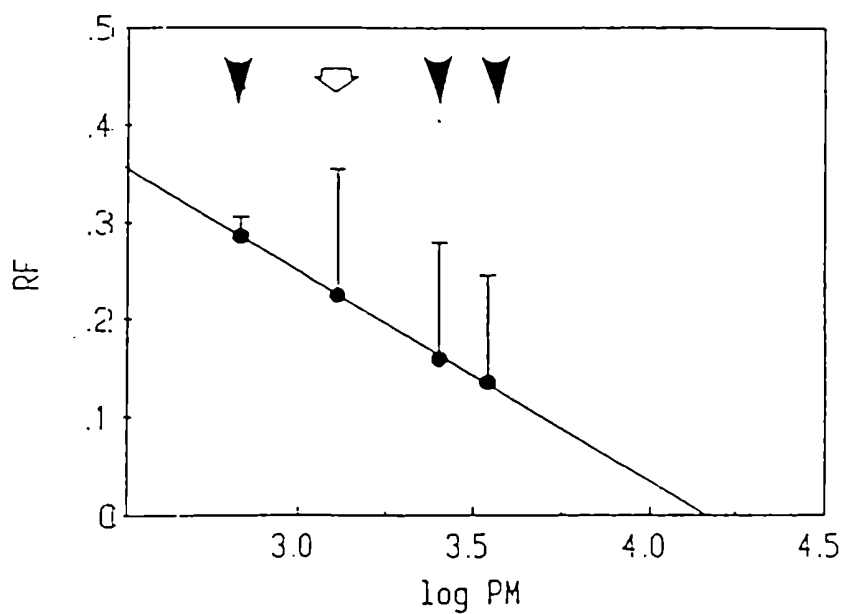
FIGURA 4-C



Se grafican las concentraciones (en miliequivalentes por mililitro, meq/ml) de los iones (A) Na; (B) Cl; y (C) K en función de las fracciones de columna recogida, incluyendo aquellas fracciones que habían demostrado alta capacidad inhibitoria de la incorporación de timidina tritiada (barras oscuras). También se representan los valores normales en suero murino para cada uno de los iones analizados (barras claras).

Se grafican los resultados obtenidos en un experimento representativo

Figura 8: Cromatografía de capa delgada (TLC)



Regresión lineal construida a partir de los datos obtenidos en cromatografía de capa delgada (TLC) utilizando como solventes una mezcla de N-butanol, ácido acético glacial y agua (10:3:1, v/v/v).

↕ Datos obtenidos a partir de fracciones recogidas de columnas Sephadex G-15. Dichas fracciones poseían un alto título de inhibición de la proliferación de células LB in vitro.

▼ Marcadores de peso molecular

delgada. La utilización de ninhidrina como revelante de la corrida mostró que las fracciones que poseían alta capacidad inhibitoria no contenían amino ácidos libres, pero sí, una sustancia con grupos aminos o carboxilos libres. Los resultados obtenidos se resumen en la Fig.8. Mediante el uso de marcadores se realizó una regresión lineal que determinó el valor del PM del factor en 1200 ± 200 D (coef. de correlación = 0,9992; $p < 0,05$).

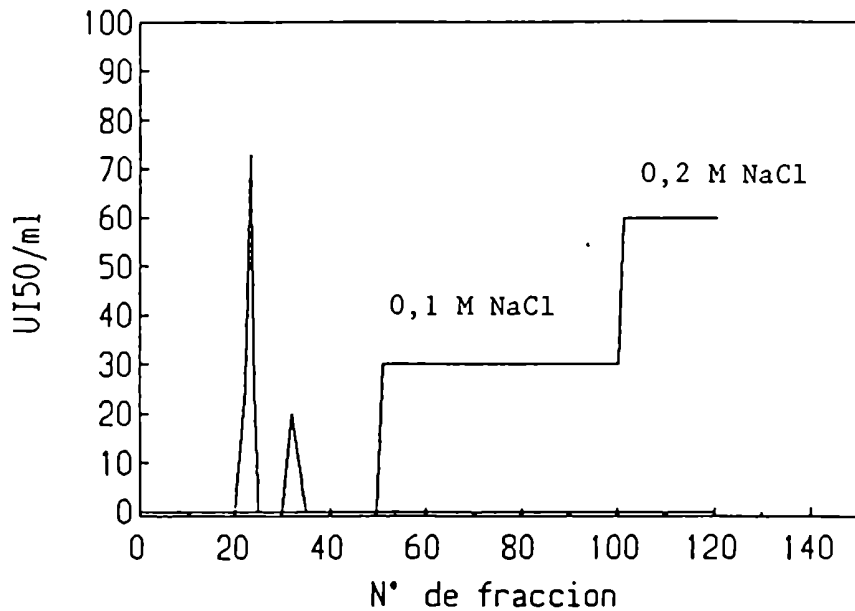
7.8. Cromatografía de intercambio iónico.

En la Fig.9 se esquematiza el perfil de inhibición obtenido en un experimento representativo para la columna de intercambio aniónico DEAE A-25 en función del número de fracción y de la concentración de NaCl. En la columna sembrada con la muestra de SLB se pueden observar un pico de inhibición máximo en las fracciones 22 al 24 y en fracciones cercanas uno menor. Las fracciones con capacidad inhibitoria eluyeron con el buffer de sembrado, o sea que no interactuaban con las cargas de la columna. Esto nos indica que el factor inhibidor se comporta como una molécula aniónica a pH neutro.

7.9. Cromatografía líquida (HPLC).

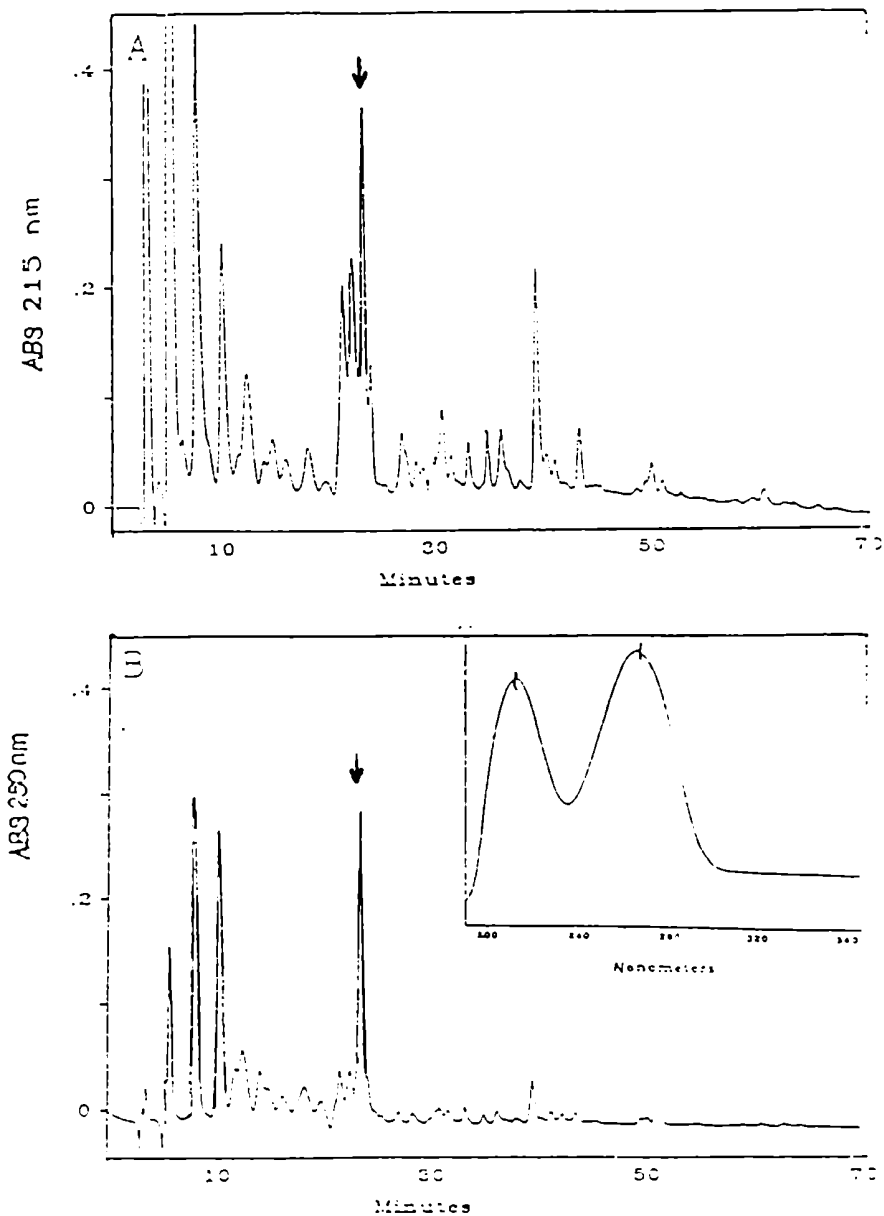
Con el propósito de obtener el factor grupo de factores inhibidores de la proliferación in vitro de células LB con la menor cantidad de contaminantes posibles, las fracciones que demostraron actividad inhibitoria en columnas G-15 fueron corridas en el HPLC. En la Fig.10-A se representa el perfil de elución obtenido en un experimento representativo en HPLC (Abs 215 nm). Se obtuvo actividad inhibitoria sólo en la fracción 15. Los valores fueron entre 7 y 8 veces superiores a los obtenidos con el control. El perfil de absorbancia a 280 nm (Fig.10-B) reveló la presencia de alta absorbancia coincidente con la actividad inhibitoria. Es importante señalar que los máximos de absorbancia se alcanzaron en 215 y 267 nm (Fig.10-B inset). Recordemos que la absorbancia a 215 nm indica la presencia de uniones peptídicas, la de 280 nm señala la presencia de

Figura 9: Columna de intercambio iónico DEAE-A25



Se grafica la capacidad inhibitoria de la proliferación in vitro de células tumorales LB, medida por ensayo de incorporación de timidina tritiada, en función del número de fracción recogida de la columna DEAE-A25. Dichas columnas fueron sembradas con el liofilizado de la fracción dializable obtenida a partir del suero de ratones portadores de tumor LB (SLB). Como eluyente se utilizó un gradiente escalonado de NaCl de 0.1 M a 0.2 M final.

Figura 10: Perfil de elución de cromatografía líquida en HPLC.



Se muestra un experimento representativo de elución de una columna C-18 en HPLC sembrada con muestra obtenida a partir de fracciones de columnas de Sephadex G-15 que habían demostrado poseer capacidad inhibitoria de la proliferación *in vitro* de células LB. Se grafica la absorbancia a 215 nm (A) y a 280 nm (B), en función del tiempo de retención en columna. En el inset se grafican los máximos de absorción obtenidos para la fracción que demostró actividad inhibitoria. La flecha indica actividad inhibitoria.

aminoácidos aromáticos (tirosina y triptofano) y la de 267 nm es cercana a la absorbancia de la tirosina fosforilada (266 nm).

Los resultados obtenidos en la digestión enzimática con pronasa así como las longitudes de onda a las que absorbe la fracción inhibitoria en el HPLC parecerían sugerir que la actividad inhibitoria sérica se debería a la acción de un péptido. Por tal motivo se procedió a separar en alicuotas la fracción de HPLC que había demostrado actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de las células LB y se realizaron los siguientes ensayos:

7.10. Análisis de aminoácidos: en la Tabla XVI se representan los valores obtenidos expresados en picomoles (pmoles) para los diferentes aminoácidos estudiados en un experimento representativo. Como puede apreciarse el valor más alto fue el obtenido para Tyr (tirosina) con 321.14 pmoles. El segundo valor importante fue Gly (glicina). Cabe señalar que este aminoácido está en general sobredimensionado, dependiendo su magnitud de la pureza de la muestra. Respecto de la sensibilidad del método hay que considerar que la hidrólisis automática en fase gaseosa que utiliza el analizador automático es equivalente en cuanto a resultados, al de 24 hs a 110°C en medio líquido con ClH 6N y fenol, por lo tanto es de esperar una ligera destrucción de Ser (serina) y Tyr y una recuperación menor al 100% para Ile (isoleucina) y Leu (leucina). La mayoría de las muestras tienen Met (metionina) parcialmente oxidada por lo que durante el proceso de análisis es posible que se produzca una ligera destrucción de dicho aminoácido y los valores obtenidos son en general bajos.

7.11. Secuencia de aminoácidos.

La segunda alicuota de la fracción inhibitoria obtenida en el HPLC fue sometida a los siguientes ensayos:

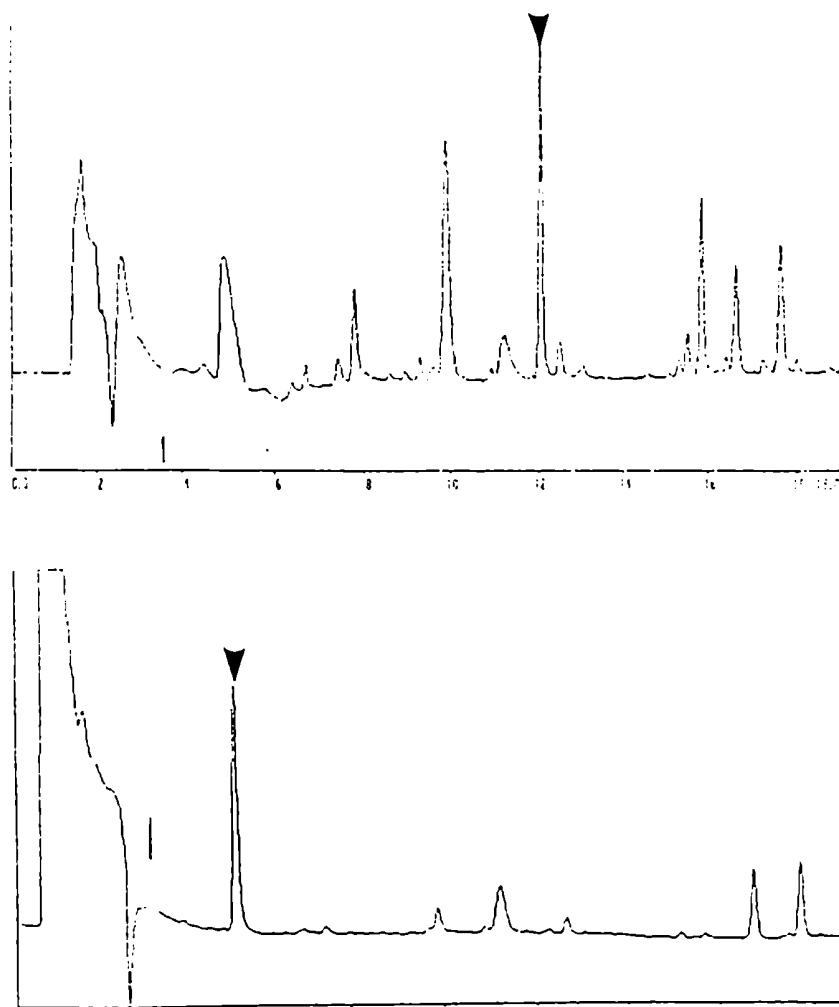
7.11.1. Hidrólisis Parcial: se llevo a cabo una hidrólisis parcial (110 C por 1 hora), lo que permite proteger grupos que modifican a los aminoácidos

Tabla XVI: Concentración de aminoácidos en el pico de actividad inhibitoria obtenida a partir de HPLC

Aminoácido en pmol	Aminoácido en pmol
Glu 26.3	Pro 7.3
Ser 30.9	Tyr 321.1
Gly 123.1	Val 8.0
His -	Met -
Arg -	Ile 14.1
Thr 10.8	Leu 39.4
Ala 24.6	Phe -
Asp 13.6	Lys 7.0

El único pico de actividad inhibidora de la proliferación in vitro de las células LB que se obtuvo mediante el uso del HPLC fue dividido en dos partes, una de ellas se sembró en un Analizador de Aminoácidos, modelo 420 de Applied Biosystems con hidrolizador. Se muestran los resultados (en picomoles-pmol) obtenidos en un experimento representativo.

Figura 11: Perfil obtenido con la hidrólisis total y parcial.



Se grafica la absorbancia a 269 nm en función del tiempo de retención para un experimento representativo.

La fracción que había demostrado capacidad de inhibir la proliferación in vitro de las células LB obtenida a partir del HPLC fue sometida a hidrólisis total (24 horas, 110 °C) (A) y parcial (1 hora, 110 °C) (B).

▼ La flecha señala el desplazamiento del pico correspondiente a tirosina.

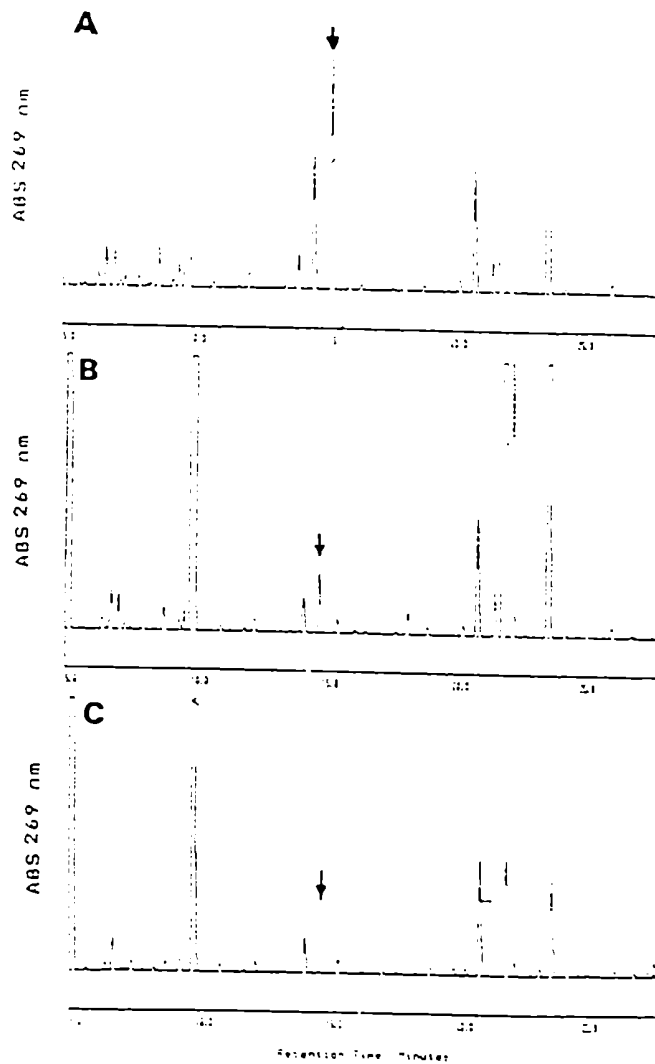
Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Fig.11 en donde es posible observar la aparición de un único pico (Fig.11-A) que si bien es cercano, no coincide con el de tirosina obtenido por hidrólisis total de la muestra (Fig.11-B).

7.11.2. Secuenciación de aminoácidos: en la Fig.12-A se muestran los resultados obtenidos para la secuenciación. Es posible observar la aparición de una señal correspondiente a la de PTH-tirosina, equivalente a 23 pmoles. Esta señal se va perdiendo progresivamente en cada ciclo de corte (Fig.12-B) hasta desaparecer sin que aparezcan señales nuevas aún realizando 5 ciclos sucesivos de degradación. Como control se procedió a secuenciar la muestra obtenida del HPLC pero sin derivatizar con PITC. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Fig.12-C, donde es posible observar la ausencia de señales nuevas que no sean las propias del aparato.

7.12. **Espectrometría de masa:**

Con el propósito de caracterizar exactamente el peso molecular y eventualmente los grupos funcionales presentes en el factor inhibidor se procedió a realizar estudios de espectrometría de masas con la única fracción inhibidora obtenida en el HPLC. En la Fig.13 se grafican los datos de un experimento representativo de la espectrometría de masa. Aparte de los picos controles, a saber, el calibrante (1183.3 D), el del calibrante - Na (1206.5 D) y el del calibrante - Na - K (1245.1 D) quedan 5 picos de: 876.3; 1034.7; 1061.1; 1096.9 y 1304.7 D. De éstos, el de 1061.1 y el de 1096.9 parecen resultar de la suma del pico de 1034.7 más Na y Na - K respectivamente. Por lo tanto quedarían 3 picos genuinos: el de 876.3; el de 1034.7 y el de 1304.7 D. Es importante señalar que el espectro de masa no es necesariamente cuantitativo como el espectro ultravioleta, por lo que no se puede estimar la relativa abundancia de una molécula respecto de las otras. Por otra parte, teniendo en cuenta la naturaleza del método, no hemos podido determinar cuál de estas entidades es la que posee

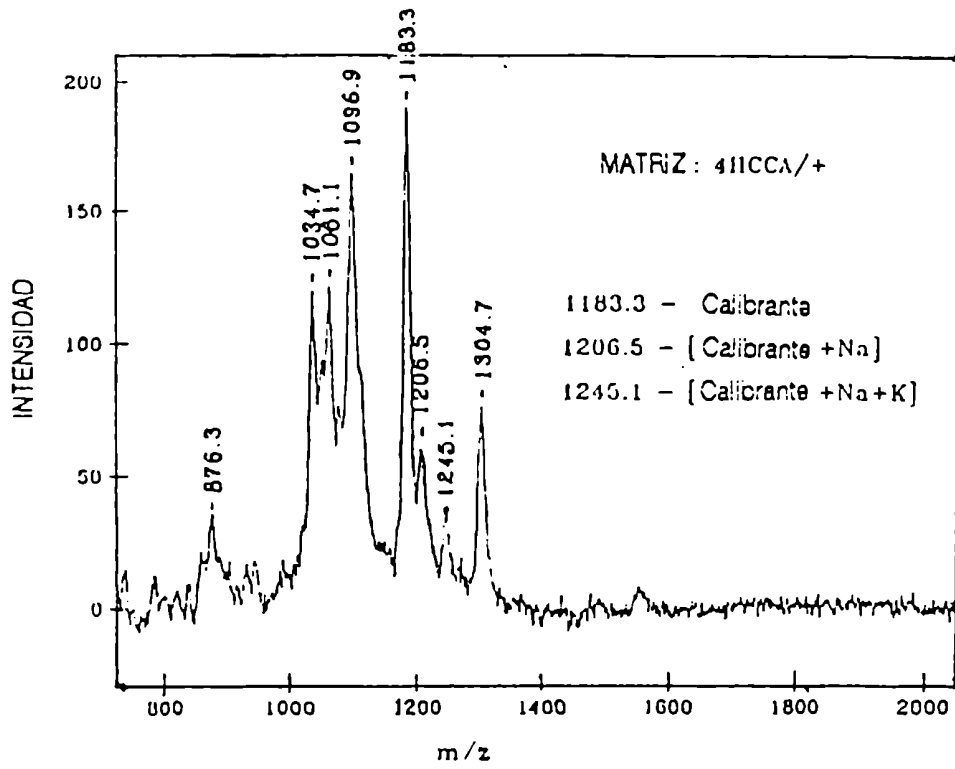
Figura 12: Perfil obtenido en secuenciación de aminoácidos



Se muestra la secuenciación de la fracción derivatizada que demostró poseer capacidad inhibitoria de la proliferación *in vitro* de células LB obtenida a partir de HPLC sembrada con muestra proveniente de SLB. Como control se procedió a realizar los mismos pasos pero sin derivatizar la muestra. Las figuras (A), (B) y (C) representan los ciclos sucesivos de secuenciación. Se grafica la absorbancia a 269 nm en función del tiempo de retención de un experimento representativo.

↓ La flecha indica la única señal que aparece correspondiente al tiempo de retención de la tirosina.

Figura 13: Perfil obtenido en espectrometría de masa.



Se grafica el peso molecular en función de la intensidad de captación.
Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos.

actividad inhibitoria o si se trata de una sola molécula con diferentes grupos sustituyentes. Por ejemplo, la diferencia de aproximadamente 160 D entre el pico de 876.3 y el de 1034.7 D parece indicar la presencia de una glucosa.

DISCUSION

Las metástasis constituyen el principal obstáculo para un tratamiento eficaz contra el cáncer. Procedimientos convencionales como la cirugía y la radioterapia son adecuados cuando el tumor se presenta como una masa perceptible y localizada; por el contrario, cuando éste está diseminado en focos de células tumorales (metástasis) por todo ó gran parte del organismo, aquellos procedimientos resultan inaplicables.

La quimioterapia ataca las células tumorales allí donde ellas se encuentran, ya localizadas, ya diseminadas en el organismo. Este procedimiento representa un adelanto respecto de la cirugía y la radioterapia pero tiene a su vez dos grandes inconvenientes: en primer lugar, tarde o temprano aparecen dentro de un tumor variantes resistentes a los agentes quimioterapéuticos; en segundo lugar, estos agentes no discriminan entre las células neoplásicas y las células normales y por lo tanto el organismo puede dañarse seriamente -incluso llegando a la muerte- como consecuencia del tratamiento.

Teóricamente, la inmunoterapia presenta las ventajas de la quimioterapia, en cuanto que puede atacar a las células tumorales cualesquiera sea el lugar donde se encuentren y carece de sus limitaciones ya que una respuesta inmune montada contra un tumor sería específica y por lo tanto el resto del organismo no debería sufrir daño alguno. Sin embargo, un tratamiento inmunológico exige que el tumor exhiba antígenos que sean reconocidos como extraños por el organismo. La existencia de antígenos tumorales específicos fue demostrada varios años atrás en tumores de ratón inducidos por carcinógenos químicos y virales (132,151). Por el contrario, la mayoría de los tumores espontáneos de rata, ratón y presumiblemente humanos carecen de inmunogenicidad detectable (152,153); si esta falta de inmunogenicidad refleja la ausencia de antígenos específicos sobre la superficie de las células de estos tumores, es algo que no puede afirmarse aún con certeza, pero es probable que sea así en algunos casos. Como quiera que sea, hasta hoy, el tratamiento inmunológico del cáncer humano

no ha ofrecido resultados alentadores salvo en algunos casos de tumores superficiales (154) y aún así, los resultados positivos no han podido ser habitualmente reproducidos como para que pueda serles otorgado una razonable confiabilidad.

A la luz de los comentarios anteriores, es claro que todos los tratamientos convencionales utilizados en la actualidad contra el cáncer, presentan serias y en muchos casos, insalvables limitaciones. Por esta razón resulta importante explorar aspectos poco estudiados de la biología del cáncer que podrían ayudarnos a comprender la naturaleza de los procesos malignos y eventualmente a revelarnos la existencia de nuevos factores que podrían ser útiles para el tratamiento de los tumores.

Siguiendo esta línea de razonamiento, iniciamos hace algunos años, el estudio de un fenómeno llamado resistencia concomitante, según el cual un individuo portador de un tumor inhibe el desarrollo de un implante secundario con células de ese tumor. Es curioso que este fenómeno haya llamado relativamente poca la atención de los investigadores ya que se trata de un mecanismo por el cual podría controlarse el crecimiento de las metástasis que no son otra cosa que implantes secundarios naturales de tumor. Existe abundante evidencia experimental de nuestro y otros laboratorios de que la resistencia concomitante puede ser generada tanto por tumores inmunogénicos como no-inmunogénicos (122,138), por lo que, cualquiera sea su modo de acción, no exige la existencia de una respuesta inmune convencional montada contra el tumor. Más aún, en nuestro laboratorio hemos demostrado previamente (141) que la resistencia concomitante podía ser transferida de un ratón portador de tumor a un ratón normal unido en parabiosis con el primero: como el ratón normal permanecía en buen estado general y simultáneamente resistía un inóculo tumoral secundario, se infiere que la resistencia antitumoral puede ser lograda sin dañar perceptiblemente al organismo. Esto sugiere que la resistencia

concomitante es un fenómeno promisorio desde que parece carecer de las limitaciones que tienen los tratamientos convencionales del cáncer. En efecto:

1) no exige que las células tumorales estén localizadas en un punto del organismo sino que puede atacarlas en muchos sitios distantes (implantes secundarios); en esto carece de las limitaciones de la cirugía y la radioterapia; 2) la resistencia antitumoral puede ser alcanzada sin daño perceptible del organismo; en esto carecería de las limitaciones de la quimioterapia; 3) no exige que el tumor sea inmunogénico y en esto carece de las limitaciones de la inmunoterapia.

En esta Tesis, hemos extendido y profundizado el estudio de la resistencia concomitante generada por el tumor murino LB mostrando que ratones portadores de este tumor eran capaces de inhibir el crecimiento de metástasis experimentales y espontáneas no sólo del propio tumor LB sino también de otro tumor no relacionado (el altamente metastásico C7HI). La presencia del tumor LB se indujo en estas metástasis un verdadero estado de tumor dormido en el que las células metastásicas permanecían vivas pero sin crecimiento aparente; recíprocamente cuando el tumor LB fue extirpado, su acción desapareció ocasionando un rápido desarrollo de las metástasis. Presumiblemente las metástasis fueron inhibidas por dos mecanismos diferentes pero complementarios, a saber: un mecanismo directo que afectó la proliferación de las propias células tumorales y un mecanismo indirecto que afectó la neovascularización tumoral impidiendo el establecimiento de los neovasos que nutren el tumor.

La existencia de un mecanismo directo puede inferirse del hecho de que la presencia de un tumor LB inhibió tanto la proliferación secundaria de células LB ya vascularizadas y en activo crecimiento como el desarrollo de implantes tumorales secundarios intraperitoneales que no necesitan vascularizarse para crecer. En efecto, en ambos casos se supone que -deslindando un efecto indirecto sobre la neovascularización tumoral que ó ya está establecida (como

en el caso de los implantes en activo crecimiento) ó nunca se produce (como en el caso de los implantes intraperitoneales)- toda inhibición del crecimiento tumoral debería atribuirse a una acción directa dirigida sobre las propias células tumorales.

Por otro lado, la existencia de un mecanismo indirecto puede inferirse del hecho de que la presencia de un tumor LB se inhibió la neovascularización contralateral inducida por macrófagos activados, linfocitos y fibroblastos y de que la existencia de un lecho vascular previo, en el sitio de un implante tumoral secundario (metástasis experimental) revirtió la inhibición generada por el tumor primario. El hecho de que la reversión de la inhibición fuera sólo parcial y de que el desarrollo de los implantes secundarios que crecieron fuera menor que el control sugiere que ambos mecanismos de inhibición -directo e indirecto- coexisten y se refuerzan mutuamente.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio (138,140,141) y los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la inducción, directa y o indirecta, del estado de tumor dormido generado por el tumor LB no sería mediado por procesos inmunológicos convencionales. Esta afirmación se basa en los siguientes hechos: 1) el tumor LB no es inmunogénico y cuando crece no despierta una respuesta inmunológica detectable; 2) la inducción del estado de tumor dormido se llevó a cabo tanto en ratones eutímicos como en nude, genéticamente atímicos y desprovistos de las funciones inmunológicas dependientes del timo; 3) el análisis histológico del sitio del implante tumoral secundario que no creció, reveló la presencia de células tumorales bien preservadas y sin infiltración por parte de las células del huésped, lo que contrasta con una reacción de rechazo inmunológico convencional.

Por otro lado, el suero de ratones portadores de tumor LB reveló una actividad inhibitoria de la proliferación in vitro de las propias células LB. Esta actividad fue proporcional al volumen tumoral y a la intensidad de la resistencia concomitante generada por este tumor, es decir a su capacidad para inhibir

metástasis experimentales y espontáneas. Esta actividad sérica también inhibió la proliferación in vitro de las células endoteliales y de fibroblastos que son componentes estructurales de los neovasos tumorales; de igual modo, inhibió la proliferación de linfocitos y la adhesividad y fagocitosis de macrófagos, los cuales junto con los fibroblastos y linfocitos participan en el proceso de neovascularización liberando moléculas angiogénicas.

La inhibición in vitro mediada por el suero de portadores de tumor LB -de las propias células LB y de las células que participan en el proceso de neovascularización tumoral, sugiere que ambos mecanismos -directo e indirecto- de inhibición de las metástasis podrían ser llevados a cabo por los mismos "factores" séricos. Un proceso diferente, la agregación plaquetaria, que no interviene directamente en la neovascularización tumoral, no fue afectado por el suero de portadores de tumor LB, sugiriendo que la migración de las células tumorales en la corriente sanguínea, función atribuida a las plaquetas (155-158), no estaría afectada por el fenómeno de resistencia concomitante.

Respecto de la naturaleza de esta actividad inhibitoria sérica que parece explicar la inducción del estado de tumor dormido en el fenómeno de resistencia concomitante generada por el tumor LB consideremos en primer lugar que no depende del timo porque la actividad inhibitoria está presente tanto en el suero de ratones eutímicos como en el suero de los ratones nude, genéticamente atímicos. En segundo lugar, los factores del complemento ó anticuerpos citotóxicos dependientes del complemento tampoco pueden explicar esta actividad inhibidora. En efecto, por un lado, sueros decomplementados expresan la misma acción inhibidora que los sueros completos; por otro lado, el hecho de que toda la actividad inhibitoria sea dializable usando una membrana con un punto de corte en 12.500 D muestra claramente que no puede ser mediada por anticuerpos porque la masa de éstos es muy superior. Adicionalmente el suero de ratones portadores de tumor LB no contiene urea, creatinina o ácido úrico en concentraciones mayores que las observadas en suero normal, indicando que el

efecto inhibitorio del suero no puede adscribirse a estas conocidas moléculas tóxicas.

Según los resultados obtenidos con distintas enzimas, el factor(es) inhibidor sérico podría ser en parte de naturaleza peptídica ya que el tratamiento con pronasa reduce significativamente su actividad; el hecho de que el tratamiento con tripsina y carboxipeptidasa A no disminuyó su actividad inhibitoria nos permite suponer que residuos internos básicos y grupos carboxilos libres no son necesarios para la actividad o no son asequibles para las enzimas.

La purificación y caracterización más detallada de la actividad inhibitoria en el suero de ratones portadores de LB, fue iniciada utilizando columnas cromatográficas de Sephadex G-25, G-15 y cromatografía en capa delgada; los resultados sugieren que la actividad inhibitoria se debía a un factor con un peso molecular comprendido entre 800 y 1200 D. Por otra parte, el análisis de los datos obtenidos con la columna de intercambio iónico sugiere que se trataría de una molécula aniónica a pH neutro.

Teniendo en cuenta que las sales son contaminantes comunes en los procesos de purificación, se midió su concentración en las distintas fracciones de las columnas de Sephadex G-15; los ionogramas realizados para Na, Cl y K revelaron valores normales en todas las fracciones, aún en aquellas que exhibían la actividad inhibitoria, indicando que ésta no representa un artefacto de técnica.

Un mayor grado de purificación fue obtenido usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Una sola fracción ha sido rutinariamente hallada como la que posee toda la actividad inhibitoria. Tal fracción presenta dos máximos de absorción a 215 y 267 nm.

Considerando que la unión peptídica presenta máxima absorción a 215 nm y que ciertos aminoácidos (como la tirosina) modificados absorben a longitudes cercanas a 267 nm, pareció razonable pensar -apoyados en los datos enzimáticos

previos- que la actividad inhibitoria podia ser ejercida por un péptido. Ello nos llevó a hacer estudios de análisis y secuenciación de aminoácidos.

El análisis de aminoácidos reveló la presencia de tirosina como componente principal y de otros pocos aminoácidos en bastante menor proporción. La secuenciación de aminoácidos mostró en el primer ciclo una señal que coincidía con la de tirosina. Sin embargo esta señal fue desapareciendo y no aparecieron señales nuevas correspondientes a otros aminoácidos.

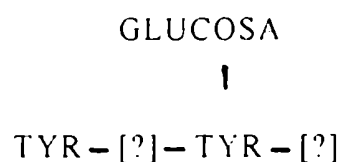
Estos resultados admiten dos posibilidades: la primera es que el factor no sea un péptido, en contraposición a lo que habían sugerido los estudios enzimáticos y de HPLC. La segunda posibilidad es que se trate de un péptido pero que por limitaciones de la técnica, los aminoácidos que acompañan a la tirosina no son detectados por el secuenciador. En efecto, el método de secuenciación tiene ciertas limitaciones, dado que algunos aminoácidos presentan dificultades para su asignación. En primer lugar, los aminoácidos modificados por glicosilación ó fosforilación no dan señal y son registrados como blanco. En segundo lugar, hay ciertos aminoácidos que son detectados con dificultad aún cuando no estén modificados: por ejemplo, serina y treonina son registrados en defecto debido a su destrucción durante el proceso de conversión: arginina e histidina son también difíciles de detectar porque después del clivaje del péptido, los complejos formados no son fácilmente extraíbles de la cámara de reacción y producen muy poca recuperación: asimismo, el triptofano se destruye después del clivaje. Por estas limitaciones, si se trabaja con poca muestra como es nuestro caso, es probable que serina, treonina, histidina, arginina y triptofano no se detecten.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la hidrólisis total y parcial de la fracción inhibitoria hallada en el HPLC sugieren la presencia de aminoácidos modificados. En efecto, se ha observado que la hidrólisis total del factor da origen a tirosinas libres (y en mucho menor proporción a otros aminoácidos).

pero cuando es hidrolizado en forma suave, para no romper las modificaciones que puedan poseer los aminoácidos, aparece una señal que no coincide con la de la tirosina sino que se aproxima a la señal de una tirosina glicosilada.

Con el propósito de caracterizar finalmente el peso molecular y eventualmente los grupos funcionales presentes en el factor inhibidor, se recurrió a la espectrometría de masa. Tres componentes con pesos de 876,3; 1034,7 y 1304,7 D fueron detectados. Dado que la espectrometría de masa es una técnica destructiva, resultó imposible ensayar la actividad de estos compuestos para determinar cual de éstos ejerce la acción inhibitoria sobre la proliferación in vitro de las células LB. Existe asimismo la posibilidad de que se trate en realidad de un solo componente al que se le unen uno ó más grupos funcionales; por ejemplo se encontró una diferencia cercana al peso molecular de la glucosa en su forma ciclica entre la molécula de 876,3 y 1034,7. Recordemos que los azúcares, en este caso la glucosa, se unen por unión eter a los aminoácidos, siendo la tirosina el aminoácido más frecuente al que se unen.

De los experimentos realizados, la estructura preliminar que se propone para el factor inhibidor sería:



Aunque la caracterización definitiva del factor inhibidor aún no ha sido completada, puede afirmarse que conocidos inhibidores de la proliferación tumoral como los interferones, el factor de necrosis tumoral α y β (TNF), el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y la novel angiostatina no estarían involucrados teniendo en cuenta su mayor peso molecular (el peso molecular de

los factores citados oscila entre 17.000 y 38.000 D mientras el factor inhibidor hallada por nosotros no superaría los 1305 D) y otras características físicas (por ejemplo el TNF, interferones y angiostatina no resisten el calentamiento a 100 °C mientras que el factor inhibidor sérico sí lo hace) (119-124,159).

Otras sustancias inhibitoras de la proliferación celular in vitro, como los aldehidos derivados de las poliaminas y la acroleína, que son contaminantes comunes en los procesos de purificación de moléculas a partir de material biológico, tampoco parecen estar involucradas (160-166). En efecto, el peso molecular de los aldehidos derivados de las poliaminas oscila entre 100 y 200 D y el de la acroleína es de 55 D. Esto significa que se trata de moléculas bastante más pequeñas que nuestro factor inhibidor.

El origen de este factor inhibidor aún no se conoce con precisión, pero hay ciertos datos que permiten dar alguna orientación en este sentido. En primer lugar, la actividad inhibitoria sérica disminuyó drásticamente in vivo cuando ratones portadores de tumor LB fueron tratados con drogas anti-inflamatorias que actúan tanto sobre la ciclo-oxigenasa como sobre la lipo-oxigenasa, que son enzimas involucradas en el ciclo del ácido araquidónico.

En segundo lugar la inoculación in vivo de los anti-histamínicos clorpromazina y prometazina (antagonistas del receptor H₁ de la histamina) también indujo la caída de la actividad sérica (167). Ambos resultados podrían estar relacionados desde que la histamina, a través de su receptor H₁, induce la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico en una reacción catalizada por la ciclo-oxigenasa. Es así que hay ciertos datos que sugieren la participación del ácido araquidónico y las prostaglandinas en la producción del factor inhibidor sérico.

En un sentido más general, estos resultados indican que el origen de la actividad inhibitoria podría estar asociado más a la respuesta inflamatoria que origina el huésped en presencia de un tumor que al tumor por sí mismo.

Ahora bien, cualquiera sea la estructura definitiva y el origen de esta molécula, puede suponerse que su completa caracterización permitiría ensayar su actividad antitumoral in vivo en óptimas condiciones técnicas.

Si se demostrara entonces que el factor inhibidor sérico tiene acción no solo sobre implantes tumorales sino también sobre tumores en desarrollo con mínimo daño para el organismo, estaríamos frente a una molécula que podría ser útil para mejorar la terapéutica del cáncer.

BIBLIOGRAFIA

1. Pitot H.C. Fundaments of Oncology. Marcel Dekker inc. New York 1978
2. Fisher B., Fisher E.R. Experimental evidence in support of the dormant tumor cell. Science 130:918 (1959)
3. Dorland W.A. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 24th ed., W.B. Sanders, Philadelphia, 1965)
4. Folkman J., Watson K., Ingber D., Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339:58 (1989).
5. Fidler I.J. Concepts for systemic treatment of micrometastasis. Cancer 35:15 (1975)
6. Sugarbaker E.V., Ketchman A.S. Mechanisms and prevention of cancer dissemination. Semin. Oncol.4:19 (1977).
7. Sugarbaker E.V. Cancer metastasis: Aproduct of tumor-host interaction. Curr.Probl. Cancer 3:1 (1977)
8. Sugarbaker E.V. Patterns of metastasis im human malignancies. Cancer Biol. Rev. 2:235 (1981)
9. Ausprunk D., and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvase Res. 14: 53 (1977)
10. Gross J.L., Moscatelli D., ad Rifkin D.B. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci. 80: 2623 (1983)
11. Vlodassky I., Fuks Z., Bar-Ner M., and Scirmacher V. Lymphoma-cell mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial cell extracellular matrix: Relationship to tumor metastasis. Cancer Res.43:2704 (1983)
12. Folkman J., and Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. Nature (London) 288: 551 (1980)
13. Crocker D.J., Murad T.M., and Geer J.C. Role of the pericyte in wound healding. An sultrastructural study. Exp.Mol.Pathol.13: 51. (1970)
14. Virchow R. Die Krankhaften Geschwlste. August Hirschwald, Berlin (1863)

15. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2: 1236 (1907)
16. Ide A.G., Baker N.H., and Warren S.L. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *A.J.R.* 42:891 (1939)
17. Algire G.H., and Chalkley H.W. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. V. Vascular reactions of mice to wounds and or normal and neoplastic transplants. *J.Natl.Cancer Inst.* 6: 73 (1945)
18. Urbach F. The blood supply of tumors, in: *Advances in Biology of the skin* W. Montagna and R.A. Ellis, (eds), pp.123, Pergamon, New York.
19. Algire G.H., Legallais F.Y., and Anderson B.F. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo .VI. The role of hypotension in the action of components of podophyllin on transplanted sarcomas. *J.N.C.I.* 14: 879 (1954)
20. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol.Oncol* 23: 217 (1984)
21. Denekamp J. and Hobson B. Endothelial-cell proliferation in experimental tumors. *Br.J.Cancer* 46: 711 (1982)
22. Tannock I.F. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br.J.Cancer* 22:258 (1968)
23. Algire G.H. Growth and vascularization of transplanted mouse melanomas. in: *The Biology of Melanomas*. Vol.4. pp.159-175, New York Academy of Sciences.
24. Gimbrone M.A., Lepman S.B., Cotran R.S. and Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J.Exp.Med.* 136: 261 (1972)
25. Hori A. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.* 51: 6180 (1991)
26. Kim K. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841 (1993)

27. Millauer B., Shawver L., Plate K.H., Risau W., Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367:576 (1994)
28. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324: 1 (1991)
29. Craft P.S., Harris A.L. Clinical prognosis significance of tumor angiogenesis. *Ann. Oncol.* 5: 395 (1994)
31. Kandel J. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66:1095 (1991).
32. Nicosia R.F., Tchao R., Leighton J. Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. *Clin. Exp. Metastasis* 4:91 (1986)
33. Rak J.W., Hegmann E.J., Lu C., Kerbel R.S. Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J. Cell. Physiol.* 159:245 (1994)
34. Greenblatt M., and Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by transparent chamber techniques *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 111 (1968)
35. Cavallo T., Sade R., Folkman J. and Cotran R.S. Tumor angiogenesis: Rapid induction of endothelial mitosis demonstrated by autoradiography. *J. Cell Biol.* 54: 408 (1972)
36. Tuan D., Smith S., Folkman J., and Meler E. Isolation of the non-histone protein of rat Walker carcinoma 256: Their association with tumor angiogenesis *Biochem* 12:3159(1973).
37. Phillips P., Steward J.K. and Kumar S. Tumor angiogenesis factor (TAF) in human and animals tumours. *Int. J. Cancer* 17: 549 (1976)
38. McAuslan B.R., and Hoffman H. Endothelium stimulating factor from the Walker carcinoma cells. *exp. Cell Res.* 119:181 (1979).
39. Fenselau A., Watt S., and Mello R.J. Tumor angiogenesis factor: purification from the Walker 256 rat tumor. *J. Biol. Chem.* 256: 9605 (1981).
40. Folkman J. Angiogenesis Factors. *Science* 235:442 (1987)

41. Banda M.J., Werb Z. Isolation of nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 79: 7773 (1982).
42. Knighton D.R., Hunt T.K., Scheuenstuhl H. and Banda M.J. Oxygen tension regulates the expresion of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221: 1283 (1983).
43. Jensen J.A., Hunt T.K., Scheuenstuhl H., Banda M. Effect of lactate, pyruvate and PH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Lab.Invest.*54: 574 (1986).
44. Dobson D.E., Castellot J.J., Spiegelman B.M. Angiogenesis stimulated by NIH 3T3-adipocytes is mediated by prostanoid lipids. *J.Cell. Biol.* 101:109 (1985).
45. Ben Erza D. Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am.J.Ophthalmol.*86: 455 (1978).
46. Ziche M., Jones J., Gullino P. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.*69:475 (1978).
47. Form D.M., Auerbach R. PGE₂ and angiogenesis. *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 172: 214 (1983).
48. Brown R.A., Weiss J.B., Tomlinson I.W., Phillips P., Kumar S. Angiogenic factor from synovial fluid tresembling that from tumors. *Lancet* 29:682 (1980).
49. Kull F.C., Brent D.A., Parikh I., Cuatrecasas P. Chemical identification of a tumor-derived angiogenic factor. *Science* 236:843 (1987).
50. Abraham J.A., Mergia A., Whang J.L., Tumolo A., friedman J., Hjerrild K.A., Gospodarowicz D., Fiddes J.C. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233: 545 (1986).
51. Vlodavsky I., Fridman R., Sullivan R., Sasse J., Klagsbrun M. Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J.Cell.Physiol.* 131:402 (1987).
52. Maciag T., Cerundolo J., Ilsey S., Kelley P.R., Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization. *Proc.NatlAcad.Sci.USA* 76: 5674 (1979).

53. Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsbrun M. Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223: 1296 (1984).

54. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* (Washington DC) 246: 1306 (1989)

55. Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266: 26031 (1992)

56. Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480 (1985).

57. Strydom D.J., Fett J.W., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L. Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry* 24: 5494 (1985).

58. Kurachi K., Davie E.W., Strydom D.J., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L. Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry* 24: 5494 (1985).

59. Weiner H.L., Weiner L.H., Swain J. The tissue distribution and development expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science* 237: 280 (1987).

60. De Larco J.E., Todaro G.J. Sarcoma growth factor (SGF): Specific binding to epidermal growth factor (EGF) membrane receptors. *J. Cell. Physiol.* 102: 267 (1980).

61. Marquadt H., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Todaro G.J. Rat transforming growth factor type I: Structure and relationship to epidermal growth factor. *Science* 223: 1079 (1984).

62. Derynck R., Roberts A.B., Eaton D.H., Winkler M.E., Goeddel D.V. Human transforming growth factor factor-alpha: Precursor sequence, gene structure and heterologous expression. In: *Cancer Cells. Vol 3: Growth Factors and Transformation* (J. Feramisco, B. Ozanne, C. Stiles, eds) pp. 79. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1985).

63. Schreiber A.B., Winkler M.E., Derynck R. Transforming growth factor-alpha: A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250 (1986).
64. Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Goeddel D. Human transforming growth factor-beta cDNA sequence and expression in normal and transfected cells. *Nature (london)* 316:701 (1986).
65. Childs C.B., Proper J.A., Tucker R.F., Moses H.L. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79: 5312 (1982).
66. Roberts A.B., Sporn M.B., Assoian R.K., Smith J.M., Roche N.S., Wakefield L.M., Heine U.I., Liotta L.A., Falanga L.A., Kehrl J.H., Fauci A.S. Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 258 83: 4167 (1986).
67. Baird A., Durkin T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor : Interactions with acidic and basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 138: 476 (1986).
68. Heimark R.L., Twardzick D.R., Schwartz S.M. Inhibition of endothelial cell growth by beta-transforming growth factor from platelets. *Science* 233: 1078 (1986).
69. Gospodarowicz D., Bialecki H., Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J.Biol.Chem* 253:3736 (1978).
70. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediated hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843 (1992)
71. Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M.G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:9267 (1991)
72. Sidky Y.A., Borden E.C. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumour and lymphocyte induced vascular responses. *Cancer res.*47: 5155 (1989).
73. Taylor S., Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297. 307 (1982).
74. Maione T.E., Gray G.S., Petro J. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247: 77 (1990).

75. Moses M.A., Sudhalter J., Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 248: 1408 (1990).
76. Docherty A.J.P., Lyons A., Smith B.J. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318: 66 (1985).
77. Charnichael D.F., Sommer A., Thompson R.C. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83: 2407 (1986).
78. Stetler-Stevenson W.G., Kruttsch H.C., Liotta L.A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). *J.Biol.Chem* 264:17374 (1989).
79. Good D.J., Polverini P.J., Rastinejad F. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc.Natl Acad Sci.USA* 87:6624 (1990).
80. Rastijenad F., Polverini P.J., Bouck N.P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56: 345 (1989).
81. Folkman j., Weiz P.B., Loulie M.M., Li W.W., Ewing W.R. Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243: 1490 (1989).
82. Matsubara T., Saura R., Hirohata K., Ziff M. Inhibition of human endothelial cell proliferation in vitro and neovascularization in vivo by D-penicilline. *J.Clin.Invest.*83:158 (1989).
83. Oikawa T., Hirotani K., Ogasawara H. Inhibition of angiogenesis by vitamin D3 analogues. *Eur.J.Pharmacol.* 178: 247 (1990).
84. Oikawa T., Hirotani K., Shimamura M., Ashino-Fuse H., Iwaguchi T. Inhibition of angiogenesis by herbimycin A. *J.Ntibiotics* 42:1202 (1989).
85. Tamargo R.J., Bok R.A., Brem H. Angiogenesis inhibition by amino-cycline. *Cancer Res.* 51:672 (1991).
86. Ingber D., Fujita T., Kishimoto S. Synthetic analogues of fumagilin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348: 555 (1990).
87. Kusaka M., Sudo K., Fujita T. Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparation to the fumalgilin parent. *Biochem Biophys Res Commun* 174. 1070 (1991).

88. La Rocca R.V., Stein C.A., Danesi R., Jamis-Dow C.A., Weiss G.H., Myers C.E. Suramin in adrenal cancer: modulation of steroid hormone production, cytotoxicity in vitro, and clinical anti-tumor effect. *J.Clin Endocrinol Metab* 71:497 (1990).
89. Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551 (1980).
90. Shubik P., Feldman R., Garcia H., Warren B.A. Vascularization induced by cheek-pouch of the Syrian hamster by tumor and non-tumor substances. *JNCI* 57:769-774 (1976)
91. Rastinejad F., Polverini P.J., Bouch N.P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56:345 (1989)
92. Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N.P. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265:1582 (1994)
93. Van Meir E.G. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nature Genetics* 8:171 (1994)
94. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315 (1994)
95. Noltenius C., Noltenius H. Dormant tumor cells in liver and brain. An autopsy study on metastasizing tumors. *Path. Research and Practice* 179: 504 (1985).
96. Eccles S.A., Alexander P. Immunologically mediated restraint of latent tumor metastases. *Nature* 257:52 (1975).
97. Weinhold K.J., Goldstein L.T., Wheelock E.F. The dormant state: quantification of L5178Y cells and host immune responses during the establishment and course of dormancy in syngeneic DBA.2 mice. *J.Exp.Med.* 149: 721 (1979).
98. Schirrmacher V. Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. *Adv. in Cancer Res.* 43:1 (1985).
99. Eccles S.A., Alexander P. Macrophages content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Nature* 250: 667 (1974).

100. Eccles S.A. Macrophages and Cancer. Immunological Aspects of Cancer. J.M. Castro ed. Lancaster, U.K. (1978)
101. Eccles S.A. Host immune mechanisms important in the control of tumors metastases. Tumor Immunity in prognosis: role of mononuclear cell infiltration. J.S. Haskill ed., New York (1982).
102. Uhr J.W., Tucker T., May R.D., Siu H., Vittieta E.S. Cancer dormancy: studies of murine BCL1 lymphoma. *Cancer Res* 51: 5045 (1991).
103. George A.J., Tutt A.L., Stevenson F.K. Anti-idiotypic mechanisms involved in suppresion of a mouse B cell lymphoma, BCL1. *J.Immunol* 138: 628 (1987).
104. Aliasauskas R.M., Friedman C.A., Ponzio N.M. Influence of T-helper cell specific monoclonal antibody on progressive growth of B-cell lymphomas in SJL/J mice: correlation of acute treatment dosage with tumor dormancy or complete remission in long-term survivors. *Cancer Communication* 2: 33 (1990).
105. Gimbrone M.A., Leapman S.B., Cotran R.S. Folkamn J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J.Exp.Med.* 136: 261 (1972).
106. Brem S., Brem H., Folkman J., Finkelstein D., Patz A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in vitreous. *Cancer Res.* 36: 2807 (1976).
107. Gimbrone M.A.Jr., Cotton R.S., Leapman S.B., Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J.Natl.Cancer Inst.* 52: 413 (1974).
108. Vaage J., Ghandbir L. Local cellular responses associated with dormancy and regression of a syngeneic C3H mammary carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother* 4: 265 (1975).
109. Stein-Werblowsky R. On the latency of tumor cells. *Brit.J.Exp.Path* 59:386 (1978).
110. Folkman J., Klagsbrun M. Angogenic factors. *Science* 235: 442 (1987)
111. Noble R.L., Hoover L. A classsification of transplantable tumors in Nb rats controlled by estrogen from dormancy to autonomy. *Cancer Res.* 35: 2935 (1975).

112. Huseby R.A. Estrogen-induced Leydig cell tumor in the mouse: a model system for the study of carcinogenesis and hormone dependency. *J. Toxicol. Envir. Health-Suppl.* 1: 177 (1976)

113. Yokoro K., Nakano M., Ito A., Nagao K., Kodama Y. Role of prolactin in rat mammary carcinogenesis: detection of carcinogenicity of low-dose carcinogens and of persisting dormant cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:1777 (1977).

114. Voigt K.D., Knabbe C. (eds) *Endocrine -dependent tumors*. Raven Press, New York (1991).

115. Weinstein I.B. Cell culture system for studying multifactor interactions in carcinogenesis. *Devel. in Toxicol. and Envir. Science* 8: 149 (1980).

116. Yamasaki H., Hollstein M., Martel N., Cabral J.R., Galendo D., Tomatis L. Transplacental induction of a specific mutation in fetal Ha-ras and its critical role in post-natal carcinogenesis. *Int. J. Cancer Res.* 40: 818 (1987).

117. Dickinson R., Lippman M. Growth factors and oncogenes. *Medical Management of breast cancer*. Powles T. and Smith I. eds. London (1991).

118. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Cramer P, Bonfil D, Pasqualini CD. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing non immunogenic murine on tumors. *Cancer Res* 50: 7159 (1990).

119. Houck J.C., Patt L.M. Lymphocyte Chalone: Fact or Artifact? In: *Lymphokines Vol.4*, Edgar Pick (ed), Academic Press, New York, (1981).

120. Young M.R., Sundharadas G., Cantarow W.D., Kumar P.R. Purification and Functional characterization of a low molecular weight immune modulating factor produced by Lewis carcinoma. *Int. J. Cancer*; 30:517 (1982).

121. Hevin M.B., Friguet B., Faure R.M. Inflammation and antitumor resistance V. Production of a cytostatic factor. *Int. J. Cancer* 46:533 (1990).

122. Akporiaye ET, Kudalore M, Stevenson AP, Kraemer PM, Stewart CC. Isolation and reactivity of host effectors associated with the manifestation of concomitant tumor immunity. *Cancer Res* 48:1158 (1988).

123. North R.J., Kirstein D.P., Tuttle R.L. Subversion of host defense mechanism by murine tumors I. A circulating factor that suppresses macrophage-mediated resistance to infection. *J. Exp. Med.* 143:559 (1976).

124.Cameron D.J. Inhibitory factors derived from human tumors: isolation of factors which suppress macrophage mediated cytotoxicity. *Int.J.Immunopharmacol*: 5:345 (1983).

125.Schatten W.E. An experimental study of post operative tumor metastases: I. Growth of pulmonary metastases following total removal of primary leg tumor. *Cancer* 11:455 (1958).

126.Van Dierendonck J.H., Keijzer R. Surgically induced cytokinetic responses in experimental rat mammary tumors models. *Cancer* 68:759 (1991).

127.Murphy S.M., Goldschmidt R.A., Rao L.N., Ammirati M., Buchmann T., Seanlon E.F. The influence of surgical trauma on experimental metastases. *Cancer* 64:2035 (1989).

128.D'amore P.A. Anti-angiogenesis as a strategy for antimetastasis. *Sem.in Thrombosis & Hemostasis* 14:73 (1988).

129.Der Hagopian R.P., Sugarbaker E.V., Ketcham A. Inflammatory oncotaxis. *J.Amer.Med.Assoc.* 240: 374 (1978).

130.Ehrlich P. Experimentelle Carcinonstudien an Mausem. In: Ehrlich P. ed. *Arbeiten aus dem Koiglichen Institut fur Experimentelle Therapie zu Frankfurt/AM.* pp 77-103, JENA: Fisher. (1906).

131.Bashford E., Murray J., Haaland M., General results of propagation of malignant new growth. In Bashford E. (ed), *Third scientific report investigation of the Emperial Cancer Res. Fund.*3: 262 (1908).

132.Prehn R., Main J. Immunology to methylcholanthrene induced sarcomas. *JNCI*.18:76 (1957).

133.Gorelik E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv.Cancer Res.*39: 71 (1983).

134.Dye E.S. Role of concomitant antitumor immunity in restraining tumor metastasis. In: RM Steinman and RJ North eds), *Mechanisms of host resistance to infectious agents, tumors and allografts*, pp 397-411. The Rockefeller University Press, New York, (1986).

135.Gorelik E. Resistance of tumor-bearing mice to a second tumor challenge. *Cancer Res* 43: 138 (1983).

136. Kumar R.K., Lykke A.W., Penny R. Immunosuppression associated with SJL.J murine lymphoma. Suppression of cell-mediated immune responses after tumor transplantation. JNCI 67:1269 (1981).

137. Bonfil DR, Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. Int J Cancer: 41, 415 (1988).

138. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, Pasqualini CD. "Concomitant immunity" in mice tumors of non-detectable immunogenicity. Br J Cancer 51: 37 (1985).

140. Meiss RP, Bonfil RD, Ruggiero RA, Pasqualini CD. Histologic aspects of concomitant resistance induced by non-immunogenic murine tumors. JNCI 76:1163 (1986).

141. Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Cramer P, Bonfil D, Pasqualini CD. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing non immunogenic murine on tumors. Cancer Res 50: 7159 (1990).

142. di Gianni P.D., Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D. Caracterizaci6in parcial de un factor s6rico presumiblemente asociado a la resistencia concomitante. Medicina (Bs As) 51 (5):413 (1991).

143. Kjonnsen I., Hoifodt H.K., Fostad O.: Different metastasis patterns of a melanoma cell line in nude mice and rats: Influence of microenvironment. J.Natl.Cancer Inst. 83: 1020 (1991)

144. Attia M.A., Weiss D.W. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. Cancer Res. 26: 1787 (1966).

145. Davel H., Miguez M., Sacerdote de Lustig E. Angiogenesis induction by lymphocytes from tumor-bearing mice in a syngeneic combination. Transplantation 37:327 (1984).

146. Boyum A., Scan D. Separation of leukocyte from blood and bone marrow. J.Lab.Invest. 22: 77 (1968).

147. Geffner J.R., Giordano M., Palermo M.S., Prat A., Serebrinsky G., Isturiz M. Neutrophil mediated cytotoxicity triggered by immune complexes: the role of reactive oxygen metabolites. Clin.Exp.Immunol. 67: 668 (1987).

148. Schiffman E, Showell HV, Corcoran BA, Ward PA. The isolation and partial characterization of neutrophil hemostatic factors from *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 114:1831 (1975).
149. Worthington Enzyme manual. Charles C. Worthington (ed), Worthington Biochemical Corporation. Freehold, New Jersey, USA, (1988).
150. Pataki G., Techniques of thin layer chromatography in amino acid and peptide chemistry. Ann Arbor Scientific Publications, Ann Arbor, Mich. p.667 (1968).
151. Klein G.; Klein E. Rejection of virus-induced tumors and non-rejection of spontaneous tumors: a lesson in contrast. *Transplantation Proceedings* 9: 1095 (1977).
152. Hewitt H.B.; Blake E.R.; Walder A.S. A critique of the evidence for active host defense against cancer, based on personal study of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33: 241 (1976).
153. Middle J.G.; Embleton M.J. Naturally arising tumors of inbred WAB/NOT rat strain. II Immunogenicity of transplanted tumors. *J.N.C.I.* 67: 637 (1981).
154. Byers V.S.; Baldwin R.W. Inmunologia de los tumores. En *Inmunologia Clinica*, eds H.H. Fudenberg. El Manual Moderno SA. México, pp. 316 (1980).
155. Gasic G.J., Gasic T.B., Stewart C.C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 46 (1968)
156. Pearlstein E., Ambrogio C.M., Karpatkin S. Effect of platelet antibody on the development of pulmonary metastasis following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma and B16 amelanotic melanoma tumor cells into mice. *Cancer Res.* 44: 3884 (1984).
157. Gorelik E., Bere W.W., Hreberman R.B. Role of NK Cells in the antimetastatic effect of anticoagulant drugs. *Int. J. Cancer* 33: 87 (1984).
158. Sugarbaker E.V., Ketchman A.S. Mechanism and prevention of cancer dissemination: An overview. *Semin. Oncol.* 4: 19 (1977).
159. Fontan E., Faure R.M. Inflammation and anti-inflammation resistance IV. Induction of cytostatic activity of murine peritoneal cells by a mouse granuloma protein. *Int. J. Cancer* 42: 267 (1988).

160. Medrano E.E., Cafferata E., Algranati I.D. Control de la proliferación en células normales y tumorales por regulación de los niveles endógenos de poliaminas. Medicina (Bs. As.) 45: 35 (1985).

161. Klein S., Miret J.J., Algranati L.D., Lustig E.S. Effect of alfa-difluoromethylornithine in lung metastases before and surgery of primary adenocarcinoma tumors in mice. Biol. Cell. 53:33 (1985).

162. Reichard S., Kojima M. Progress in Leukocyte Biology. Vol 4. Liss A.R. Inc, New York. pp:339 (1984).

163. Byrd W.J., Jacobs D.M., Amoss M.S. Adv. Polyamine Res. 2:71 (1978)

164. Alarcon R.A. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. Arch. Biochem. Biophys. 137: 365 (1970).

165. Alarcon R.A., Foley G.E., Modest E.J. Effects of spermine on mammalian cells. Arch. Biochem. Biophys. 94:540 (1961).

166. Campbell R.A. Adv. Polyamines Res. Vol 2. Raven. New York. (1978).

167. White M., Kaliner M.A. Histamine. In: Inflammation. basic principles and clinical correlates. Gallin J., Goldstein I.M., Snyderman R. eds. Raven Press, NY (1988).

FLC
PSM