Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Acción de la heparina y glicosaminoglicanos relacionados en el desarrollo tumoral

Bertolesi, Gabriel Esteban

1998

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:
Bertolesi, Gabriel Esteban. (1998). Acción de la heparina y glicosaminoglicanos relacionados en el desarrollo tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3009_Bertolesi.pdf

Cita tipo Chicago:
Bertolesi, Gabriel Esteban. "Acción de la heparina y glicosaminoglicanos relacionados en el desarrollo tumoral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3009_Bertolesi.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

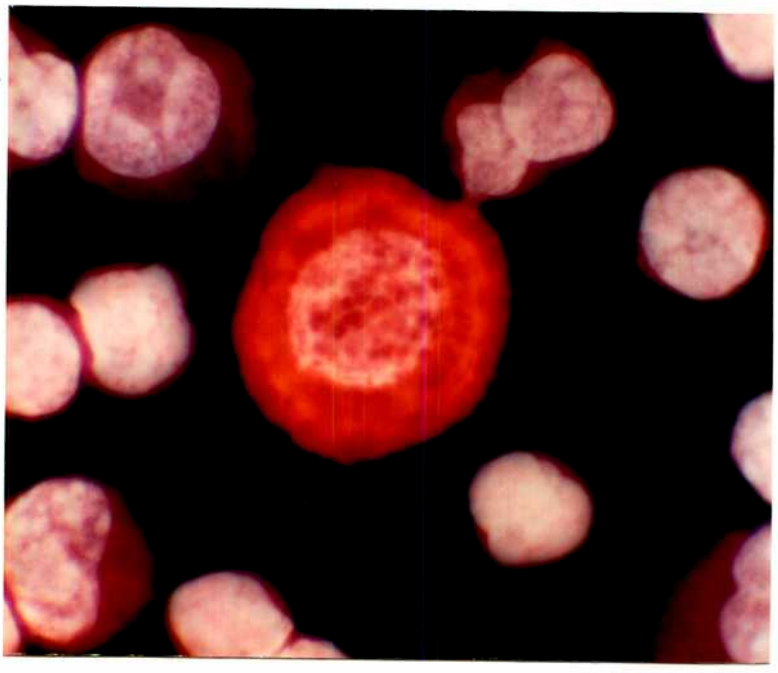
UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCIÓN DE LA HEPARINA Y GLICOSAMINOGLICANOS RELACIONADOS EN EL DESARROLLO TUMORAL



Autor: **Lic. GABRIEL ESTEBAN BERTOLESI**

Director: **Dra. LÍLIA LAURÍA DE CIDRE**

Codirector: **Dra. ANA MARÍA EIJÁN**

Lugar de Trabajo: **ÁREA INVESTIGACIÓN, INSTITUTO DE ONCOLOGÍA 'A. H. ROFFO', UBA, Y LABORATORIO DE HISTOLOGÍA ANIMAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, F.C.E. y N., UBA**

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

(Orientación en Ciencias Biológicas)

1998

Nº 3009

FACULTY OF EXACT AND NATURAL SCIENCE,
BUENOS AIRES UNIVERSITY

HEPARIN AND RELATED GLYCOSAMINOGLYCANS EFFECTS ON TUMORAL DEVELOPMENT.

Author: **GABRIEL ESTEBAN BERTOLESI**

Director: **PhD. LÍLIA LAURÍA DE CIDRE**
Codirector: **PhD. ANA MARÍA EIJÁN**

Work Place:
RESEARCH AREA, INSTITUTE OF ONCOLOGY 'A. H. ROFFO', UBA.
and
ANIMAL HISTOLOGY LABORATORY, BIOLOGY DEPARTMENT, FACULTY OF EXACT AND NATURAL SCIENCE, UBA

1998

A Vani y Alu,

por ser las mujeres que siempre soñé,

aún antes de conocerlas.

Foto de Tapa:

Frotis de lavado de cavidad peritoneal de ratón, teñidos con dos nuevos fluorocrómos en la siguiente secuencia tintorial: Tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II) (Rubipy) (50 μg/ml; 5 min) y M & B 938 (1μg/ml; 5 min); λ exc.: U.V. (365 nm). Se observa un mastocito con sus gránulos conteniendo heparina color naranja mientras que el núcleo de ésta célula y el de los linfocitos, los polimorfo nucleares y los macrófagos se observan de color blanco. Los citoplasmas adquieren una tinción rojiza.

AGRADECIMIENTOS

- A Lilia Lauría por enseñarme ciencia y humanidad, por acompañarme todos estos años, por su criterio y por compartir esta mezcla hermosa e irrepetible de tanada y dulzura.

- A Ana María Eiján, quien me enseñó los primeros pasos del quehacer científico, me apoyó y me acompañó no solo en el caminar sino que permitió que mi mente vuele.

- A quien representa el mejor ejemplo de trabajo, dedicación y humildad, la Dra. Lustig.

- No figura como director en esta tesis, pero es mi guía en el viejo continente y mi director espiritual en la pasión por el saber. Por enseñarme muchisimas cosas y brindarse como nadie. Por acompañarme todos estos años electronizados. Muchas gracias Juan Carlos Stockert.

- A Martín, el ausente y extrañado, Daniel y Eduardo por compartir sus conocimientos y por hacer del laboratorio un lugar sin paredes ni barreras para la discusión y con "redes" y cerveza para la diversión.

- A Madela, Lilia, Silvia y Lina por tantisimas horas de convivencia y por ser parte activa en la generación de un hermoso y apacible lugar de trabajo.

- A todos los que con su trabajo incansable permitieron que pueda hacer "esto", por sus enseñanzas, solidaridad y compañerismo, muchas gracias, Elisa, Lidia, Alicia, Gloria, Virginia, Julio, Lucas, Alejandro, Antonia, Cata, Queca y Mirta.

- Muchas gracias a Danka, Miriam, Adriana y los demás integrantes del bioterio, quienes rompen algunos preceptos biológicos y siendo hermosamente humanos son capaces de procrear ratones para poder satisfacer pedidos siempre urgentes.

- A los becarios nuevos, presentes e idos, que siempre me ayudaron para revitalizarme y colaboraron para que uno se desempolve y se quite las telas de arañas permanentemente. Gracias, Gabriela, Esteban, Laura, Juan e Ileana.

- Quiero agradecer a Syntex S.A. y especialmente a algunos miembros del personal (Víctor Díaz, Ricardo Dománico y Raúl Alvarez) que me brindaron las heparinas y contestaron voluntariosamente varias dudas que me surgieron.

- A la Universidad de Buenos Aires por solventarme todos estos años.

- A Deby, Jeffy, Martín, Gabriela, Andy y Adriana por ser AMIGOS y compañeros durante tantos años. A ellos y a la nueva generación (Luci) les agradezco hasta el sentimiento que me generan al escribir esta línea.

- A Aldo, Ana, Ale, Mariana y los locos bajitos, muchas gracias.

- A mis viejos (de espíritu joven) y mis hermanos (Marcel, Andrea y Deby) que siempre están y estarán. Por su apoyo incondicional durante todos mis años de vida y por todo el amor que me brindan.

- Un agradecimiento especial a mi abuela y mi Oma de 90 años que continúan enseñándome lo valioso de las cosas pequeñas.

- A mi familia nueva, aunque no tan nueva, por quererme y dejarse querer. Gracias Betty, Gise, Eli y Rosa.

ÍNDICE

Pg

Resumen ---------- 1
Abstarct ---------- 2

SECCIÓN I. Aspectos teóricos. -3-

1. Introducción general ---------- 4
1.1. Procesos que involucran el desarrollo tumoral y metastásico ---------- 4
1.2. Mastocitos ---------- 6
1.3. Heparina ---------- 8
1.3.1. Breve historia sobre la heparina ---------- 8
1.3.2. Biosíntesis y estructura de la heparina ---------- 9
1.3.3. Estructura de la heparina con afinidad por la ATIII ---------- 12
1.3.4. Heparinas modificadas químicamente ---------- 14

2. Objetivos generales ---------- 16

3. Modelo experimental ---------- 18

SECCIÓN II. Mastocitos. (Parte experimental) -21-

4. Identificación citoquímica de mastocitos ---------- 22
4.1. Introducción ---------- 22
4.2. Objetivos ---------- 24
4.3. Materiales y métodos ---------- 25
4.3.1. Material biológico ---------- 25
4.3.2. Metodología histológica ---------- 25
4.3.3. Coloración con Rubipy ---------- 25
4.3.4. Estudio del mecanismo de coloración con Rubipy ---------- 26
4.3.5. Estudios espectrofotométricos y fluorométricos ---------- 26
4.3.6. Microscopía óptica y estudios microfluorométricos ---------- 27
4.3.7. Detección de electrones electrodispesados (BSE) en microscopía electrónica de barrido, microanálisis de rayos X (X-RMA) y mapa de elementos ---------- 27
4.3.8. Interacción del Rubipy con distintas macromoléculas ---------- 27
4.4. Resultados ---------- 29
4.4.1. Tinción y tratamientos ---------- 29
4.4.2. Decaimiento de la fluorescencia y medios de montaje ---------- 33
4.4.3. Detección de electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE) en microscopía electrónica de barrido, estudios microanalíticos (XRMA) y mapa de elementos ---------- 33
4.4.4. Interacción del Rubipy con distintas macromoléculas ---------- 36
4.5. Discusión ---------- 37

5. Mastocitos y proliferación ---------- 40
5.1. Introducción ---------- 40
5.2. Objetivos ---------- 41
5.3. Materiales y métodos ---------- 42
5.3.1. Tumores ---------- 42
5.3.2. Suspensión y purificación de mastocitos ---------- 42
5.3.3. Estudios microfluorométricos ---------- 42
5.3.4. Análisis de imagen de MCN y MCP ---------- 42
5.3.5. Suspensión de células tumorales ---------- 43
5.3.6. Cultivos celulares primarios ---------- 43
5.3.7. Modulación de la proliferación de células tumorales por MCN y MCP ---------- 43
5.3.8. Evaluación del crecimiento celular ---------- 44
5.3.9. Evaluación de la incidencia tumoral ---------- 44
5.3.10. Análisis estadístico ---------- 44
5.4. Resultados ---------- 45
5.4.1. Diferencias morfológicas entre mastocitos de cavidad peritoneal de animales normales (MCN) y de portadores de tumor (MCP) ---------- 45
5.4.2. Efecto de los MC sobre la proliferación celular in vitro ---------- 48
5.4.3. Efecto de los MCN y MCP sobre la incidencia y el crecimiento tumoral ---------- 48
5.5. Discusión ---------- 50

SECCION III. Heparina y células tumorales (Parte experimental) -53-

6. Heparina y proliferación celular ---------- 54
6.1. Introducción ---------- 54
6.2. Objetivos ---------- 56
6.3. Materiales y métodos ---------- 57
6.3.1. Tumores ---------- 57
6.3.2. Suspensión de células tumorales y cultivos primarios ---------- 57
6.3.3. Evaluación del crecimiento celular ---------- 57
6.3.4. Extracción de factores de crecimiento del SFB ---------- 57
6.3.5. Ensayos de reversibilidad de la acción de la heparina y N-des N-Ac 57
6.3.6. Ensayos de toxicidad ---------- 58
6.3.7. Análisis estadístico ---------- 58
6.4. Resultados ---------- 59
6.4.1. Acción de la heparina sobre el crecimiento tumoral in vitro ---------- 59
6.4.2. Reversibilidad de la acción antiproliferativa de la heparina ---------- 60
6.4.3. Determinación de la acción de la heparina, en función de la presencia en el SFB, de factores de crecimiento con afinidad por la heparina ---------- 61
6.4.4. Acción de heparinas de distinta actividad anticoagulante sobre la proliferación celular ---------- 61
6.4.5. Acción de heparinas modificadas sobre la proliferación celular -- 63
6.5. Discusión ---------- 65

7. Receptores para heparina e internalización ---------- 68
7.1. Introducción ---------- 68
7.2. Objetivos ---------- 69
7.3. Materiales y métodos ---------- 70
7.3.1. Suspensión celular y cultivos primarios ---------- 70
7.3.2. Estudios de receptores para H^3-heparina ---------- 70
7.3.3. Inhibición y reversibilidad del crecimiento de células M3 por heparina y N-desul N-Ac marcados con isotiocianato de fluoresceina (FITC) ---------- 71
7.3.4. Internalización de la heparina-FITC y N-desul N-Ac FITC ------ 71
7.4. Resultados ---------- 72
7.4.1. Unión de la H^3-heparina a células M3 y MM3 ---------- 72
7.4.2. Número de receptores para heparina y tiempo de duplicación celular ---------- 74
7.4.3. Relación entre actividad antiproliferativa y el desplazamiento de la H^3-heparina por la heparina y las heparinas modificadas -------- 75
7.4.4. Internalización de la heparina y la heparina N-desul N-Ac ------ 76
7.5. Discusión ---------- 78

8. Heparina y adhesión celular ---------- 83
8.1. Introducción ---------- 83
8.2. Objetivos ---------- 84
8.3. Materiales y métodos ---------- 85
8.3.1. Células tumorales ---------- 85
8.3.2. Suspensión de células tumorales ---------- 85
8.3.3. Ensayos de adhesión y sustratos ---------- 85
8.3.4. Determinación del número de células adheridas ---------- 86
8.3.5. Agregación celular ---------- 86
8.4. Resultados ---------- 87
8.4.1. Aumento de la adhesión en función del tiempo ---------- 87
8.4.2. Aumento de la adhesión en función de la concentración -------- 88
8.4.3. Efecto de las heparinas modificadas sobre la adhesión celular --- 88
8.4.4. Asociación entre adhesión y número de receptores ---------- 90
8.4.5. Efecto de la heparina sobre la agregación celular ---------- 91
8.5. Discusión ---------- 92

SECCION IV. Heparina y desarrollo tumoral (Parte experimental) -95-

9. Heparina y desarrollo tumoral ---------- 96
9.1. Introducción ---------- 96
9.2. Objetivos ---------- 98
9.3. Materiales y métodos ---------- 99
9.3.1. Animales ---------- 99
9.3.2.. Ensayo de toxicidad de la heparina y N-des N-Ac in vivo ------- 99
9.3.3. Suspensión de células tumorales ---------- 99

9.3.4. Estudio del efecto de la heparina y el N-des N-Ac sobre el crecimiento tumoral ---------- 99
9.3.5. Medición del crecimiento tumoral y determinación del tiempo de latencia ---------- 99
9.3.6. Medición de las metástasis espontáneas en pulmón ---------- 100
9.3.7. Determinación del número de metástasis experimentales ---------- 100
9.3.8. Obtención de euglobulinas ---------- 101
9.3.9. Caseinólisis radial ---------- 101
9.3.10. Zimografías ---------- 102
9.3.11. Agregación de células tumorales en plasma y videomicroscopía -- 102
9.4. Resultados ---------- 103
9.4.1. Ensayos de toxicidad de la heparina y N-des N-Ac ---------- 103
9.4.2. Estudios del efecto de la heparina y N-des N-Ac sobre el desarrollo tumoral y las metástasis espontáneas ---------- 104
9.4.3. Efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre la formación de metástasis experimentales ---------- 106
9.4.4. Efecto del compuesto B623 en combinación con heparia sobre la formación de metástasis experimentales ---------- 107
9.4.5. Inhibición de la fibrinólisis por B623 ---------- 107
9.4.6. Agregación de las células tumorales en el plasma ---------- 108
9.5. Discusión ---------- 110

10. Actividad fibirnolítica mediada por el activador de plasminógeno tipo uroquinasa ---------- 115
10.1. Introducción ---------- 115
10.2. Objetivos ---------- 117
10.3. Materiales y métodos ---------- 118
10.3.1. Ensayos de unión del Pg y el uPA a las heparinas ---------- 118
10.3.2. Caseinólisis radial ---------- 118
10.3.3. Animales y tratamientos in vivo ---------- 118
10.3.4. Valoración del efecto anticoagulante de la heparina y las heparinas modificadas químicamente ---------- 119
10.3.5. Obtención de euglobulinas ---------- 119
10.3.6. Zimografias ---------- 119
10.3.7. Western blotting ---------- 119
10.3.8. Análisis densitométrico ---------- 119
10.4. Resultados ---------- 120
10.4.1. Unión de las heparinas a Pg y uPA ---------- 120
10.4.2. Actividad caseinolítica inducida por uPA en presencia de heparinas 122
10.4.3. Valoración del efecto anticoagulante de la heparina y las heparinas modificadas ---------- 123
10.4.4. Fibrinólisis mediada por uPA ex vivo ---------- 124
10.5. Discusión ---------- 127

11. Coagulación ---------- 130
11.1. Introducción ---------- 130
11.2. Objetivos ---------- 131
11.3. Materiales y métodos ---------- 132

11.3.1. Animales ---------- 132
11.3.2. Células y cultivos celulares---------- 132
11.3.3. Crecimiento tumoral ---------- 132
11.3.4. Obtención del plasma citratado ---------- 132
11.3.5. Ensayos de coagulación ---------- 132
11.4. Resultados ---------- 133
11.4.1.Crecimiento del tumor y actividad procoagulante in vivo ---------- 133
11.4.2. Actividad procoagulante de las células tumorales ---------- 134
11.5. Discusión ---------- 136

12. Heparanasa ---------- 138
12.1. Introducción ---------- 138
12.2. Objetivos ---------- 140
12.3. Materiales y métodos ---------- 141
12.3.1. Obtención de heparinas de alto peso molecular por tamiz molecular ---------- 141
12.3.2. Determinación del contenido de heparina ---------- 141
12.3.3. Electroforésis en geles de poliacrilamida ---------- 141
12.3.4. Estudios densitométricos ---------- 142
12.3.5. Determinación fluorométrica del contenido de Rubipy ---------- 142
12.3.6. Degradación con heparanasas I, II, y III ---------- 142
12.3.7. Degradación de la heparina y heparinas modificadas por células tumorales ---------- 142
12.4. Resultados ---------- 144
12.4.1. Obtención de heparinas de alto peso molecular ---------- 144
12.4.2. Características de la unión heparina-Rubipy ---------- 145
12.4.3. Sensibilidad de las heparinas modificadas a ser degradadas por las heparinasas bacterianas I, II y III ---------- 148
12.4.4. Degradación de la heparina y las heparinas modificadas por células tumorales tumorales ---------- 150
12.5. Discusión ---------- 152

14. Discusión Generales ---------- 155

Bibliografía ---------- 163

ABREVIATURAS

AT III:	Antitrombina III.
BSE:	Electrones secundarios retrodispersados
EGF:	Factor de crecimiento epitelial.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceina
aFGF:	Factor de crecimiento fibroblástico ácido.
bFGF:	Factor de crecimiento fibroblástico básico
CTMC:	Mastocitos de tejido conectivo.
GAG/s:	Glicosaminoglicano/s
HBGF:	Factores de crecimiento con afinidad por la heparina.
i.p.:	intraperitoneal.
i.v.:	intravenosa.
LN:	Núcleos de linfocitos.
m.b.:	Membrana basal.
MC:	Mastocitos.
MCG:	Gránulos de mastocitos.
ME:	Matriz-extracelular
MEM:	Medio escencial minimo Eagle.
m.p.:	Membrana plasmática
MCN:	Mastocitos de cavidad peritoneal de animales normales
MCP:	Mastocitos de cavidad peritoneal de animales portadores de tumor.
MCU:	Máxima capacidad de unión.
PBS:	Buffer fosfato salino.
Pg:	Plasminógeno
s.c.:	Subcutánea.
SE:	Electrones secundarios.
SFB:	Suero fetal bovino
SMC:	Células musculares lisas.
tPA:	Activador de plasminógeno tipo tisular.
uPA:	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa.
XRMA:	Microanálisis atómico de rayos X.

RESUMEN

Se estudió el efecto de los mastocitos (MC), la heparina y heparinas sin actividad anticoagulante sobre el desarrollo tumoral. Empleando el fluorocromo tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II), que se une a los grupos sulfatos de la heparina, se realizó la identificación citoquímica de MC de cavidad peritoneal y se cuantificó comparativamente el contenido de heparina de los gránulos de MC de ratones portadores de tumor (MCP) y de ratones normales (MCN) mediante análisis de imagen. Los MCN que poseen el doble de heparina que los MCP inhibieron la proliferación in vitro y la incidencia tumoral in vivo de un adenocarcinoma mamario murino de moderada capacidad metastásica en pulmón (M3).

Observamos que las células M3 poseen receptores para heparina de alta afinidad, a los que pueden también unirse una heparina parcialmente N-desulfatada N-Acetilada (N-des N-Ac). Ambas heparinas inhibieron la proliferación de las células tumorales in vitro e incrementaron la adhesión celular mientras que otras heparinas modificadas (parcialmente O-desulfatada (O-des), N-desulfatada (N-des), O/N-desulfatada N-Acetilada (O/N-des N-Ac)) no se unen a los receptores y no tuvieron efecto sobre la proliferación y la adhesión. Estos resultados muestran que la unión de la heparina a los receptores se correlaciona con el efecto antiproliferativo y el aumento de la adhesión celular. Solamente la heparina inhibió la formación de metástasis experimentales en pulmón, siendo el efecto revertido por un inhibidor selectivo del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) (el compuesto B623). Para determinar el mecanismo por el cual la heparina posee efecto antimetastásico se estudió: a) el efecto fibrinolítico de las heparinas mediado por uPA; b) la actividad procoagulante de ratones portadores de tumor y el efecto de las heparinas en la coagulación y c) la producción de actividad heparinasa por parte de las células tumorales M3 y la susceptibilidad de las heparinas a ser degradadas por esta enzima. El análisis global de los resultados sugiere que el efecto antimetastásico se asocia a la actividad anticoagulante.

Palabras clave: Mastocitos, heparina, heparinoides, tumor, adenocarcinoma, metástasis, fibrinolisis, heparanasa, tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II).

ABSTRACT

We have investigated the effect of mast cells (MC), heparin and chemically modified heparins, without anticoagulant activity, on tumoral development. We describe the use of tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II) (Rubipy) fluorochrome, which binds to N and O-sulfate grups of heparin, for MC cytochemical identification. Peritoneal cavity MC from normal mice (NMC) showed two-fold increase of heparin content than tumor-bearing mice (TMC), as measured by image analysis. NMC inhibited in vitro M3 cell proliferation (murine mammary adenocarcinoma with moderate metastatic lung capacity) and in vivo tumoral incidence, while TMC had not effect.

Specific M3 cell-membrane heparin-receptors were described. Heparin and partially N-desulfated N-acetylated heparin (N-des N-Ac) had the capability of binding to heparin receptor, inhibited cell proliferation and increased cell adhesion. Chemically modified heparins without heparin-receptor interaction capacity, lacked the antiproliferative and adhesive cell effect. These results suggest that heparin-receptor interaction mediated the antiproliferative effect and the increase of cell adhesion.

Heparin decreased M3 cells experimental lung metastasis. This effect was reverted by a selective inhibitor (B623) of the plasminogen activator type-urokinase (uPA). In order to know the mechanism by which heparin inhibit M3 metastasis formation, we studied a) heparins fibrinolytic activity mediated by uPA, b) procoagulant activity of M3 cells and tumor-bearing mice, as well as the heparins effect on coagulation, and c) the presence of heparinase activity produced by M3 cells and heparins susceptibility to this enzyme activity. The analysis of result suggests that antimetastatic effect was related to the anticoagulant activity.

Key words: Mast cell, heparin, heparinoids, tumor, murine adenocarcinoma, metastasis, fibrinolysis, heparanase, tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II).

SECCIÓN I

ASPECTOS TEÓRICOS

En esta sección se presentan los aspectos teóricos generales y consta de tres capítulos. El primero consiste en una introducción general. A pesar de que cada capítulo de la parte experimental contiene un introducción más detallada del tema que se está investigando, esta introducción general permite entender las distintas etapas del desarrollo tumoral, las características de la heparina, y los conceptos básicos que llevaron a la realización de las investigaciones que se describen en la presente tesis.

Los objetivos generales de las investigaciones se describen en el capítulo 2.

Finalmente, en el último capítulo de esta sección (capítulo 3) se describen las características más importantes de los tumores y las células en cultivo que se emplearon durante el desarrollo experimental.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. PROCESOS QUE INVOLUCRAN EL DESARROLLO TUMORAL Y METASTÁSICO.

El desarrollo de un tumor sólido y su posterior diseminación para originar metástasis, es un proceso continuo que a los fines de comprenderlo en su totalidad puede dividirse en varias etapas como son el crecimiento del tumor primario, la angiogénesis y el crecimiento del tumor secundario (Paweletz & Boxberger 1994).

La formación de un tumor comienza con un evento de **carcinogénesis** que, mediante compuestos llamados carcinógenos, altera el genotipo de células normales por mutación. Esta mutación afecta su comportamiento normal (varía según los tejidos) y las células pueden morir o sufrir un proceso de **transformación** que implica cambios en la expresión de genes y la consiguiente estimulación para modificar el ciclo celular, iniciando la **proliferación** descontrolada (Nowel 1976).

Esta célula neoplásica, o pequeño grupo de ellas, comienzan a dividirse hasta formar un pequeño tumor de unos pocos milímetros que produce y libera factores que desencadenan un proceso complejo conocido como **angiogénesis o neovascularización**, que involucra la proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Folkman 1990). Los factores que liberan las células tumorales también pueden inducir a otras células del huésped a favorecer la angiogénesis, tal es el caso de células del sistema inmune como los linfocitos y los mastocitos (MC) (Davel et al. 1984; Davel & Sacerdote de Lustig 1993).

La angiogénesis, además de permitir el acceso de O_2 y nutrientes, facilita la diseminación metastásica. El primer paso de la cascada metastásica es el desprendimiento o **disociación** de pequeños grupos de células de la masa tumoral, seguido de un proceso de **invasión** de la matriz extracelular de los tejidos normales circundantes (Heidtmann 1992). La invasión y entrada de las células tumorales a la circulación (**intravasación**) requiere de la participación de enzimas hidrolíticas aportadas por las células tumorales y también por las células normales del huésped que infiltran o forman parte del tejido peritumoral como macrófagos, granulocitos, fibroblastos y el endotelio vascular (Pauli & Knudson 1988; Liotta 1986).

Una vez en circulación, las células tumorales se encuentran en un medio muy hostil, y solo un pequeño número de ellas sobreviven y son capaces de generar un crecimiento tumoral secundario (Fidler 1970; 1976; 1978). Las células tumorales en circulación se encuentran con células NK (natural killers), linfocitos citotóxicos, fagocitos y otras células del sistema inmune. Como contrapartida y para defenderse de este medio hostil, las células tumorales viajan en grupos (**embolismo**), y en varios tipos de cáncer se observó un aumento de la capacidad coagulante del paciente y una deficiencia del sistema fibrinolítico. Esto favorece la deposición de fibrina circundante a las células tumorales, lo que las protege del sistema inmune y facilita su **transporte** y posterior **arresto** o **anclaje** en el órgano blanco (Al-Mondhiry.1984; Carty et al 1992).

El arresto o anclaje, es la detención, por impedimento mecánico, de las células tumorales en la microvasculatura, que continúa con la **adhesión** de éstas con las células del endotelio vascular. A diferencia del anclaje que es un procesos físico, la adhesión requiere una serie de procesos moleculares tales como la expresión de moléculas específicas en la membrana plasmática de las células endoteliales y en las propias células tumorales (Raz et al 1984, Raz & Lotan 1987; Weiss et al 1989).

Los hallazgos en el sentido de que ciertos órganos permiten y otros no permiten la colonización metastásica se conoce como la "teoría del suelo y la semilla" (Paget 1889). Esta teoría plantea que la célula tumoral (semilla) solo podrá proliferar y dar origen a una metástasis, si el órgano o tejido en el que se encuentra (suelo) es adecuado. Hoy se sabe que un evento esencial es el reconocimiento entre moléculas de la superficie de las células tumorales y lectinas específicas presentes en endotelios activados (Lauri et al 1991, Bereta et al 1991).

Una vez adherida, la célula metastásica degrada la lámina basal del endotelio empleando enzimas hidrolíticas y completa la **extravasación** (Nicolson 1989). Las enzimas involucradas son en muchos casos las mismas que se requirieron durante la invasión del tumor primario y durante la intravasación de alguna de las células tumorales. La células migran por la matriz extracelular (ME) de la misma manera que los leucocitos y luego de un proceso similar al que llevaron a cabo durante la invasión primaria, comienzan a proliferar para dar origen al **establecimiento de la metástasis** (Figura 1.1.).

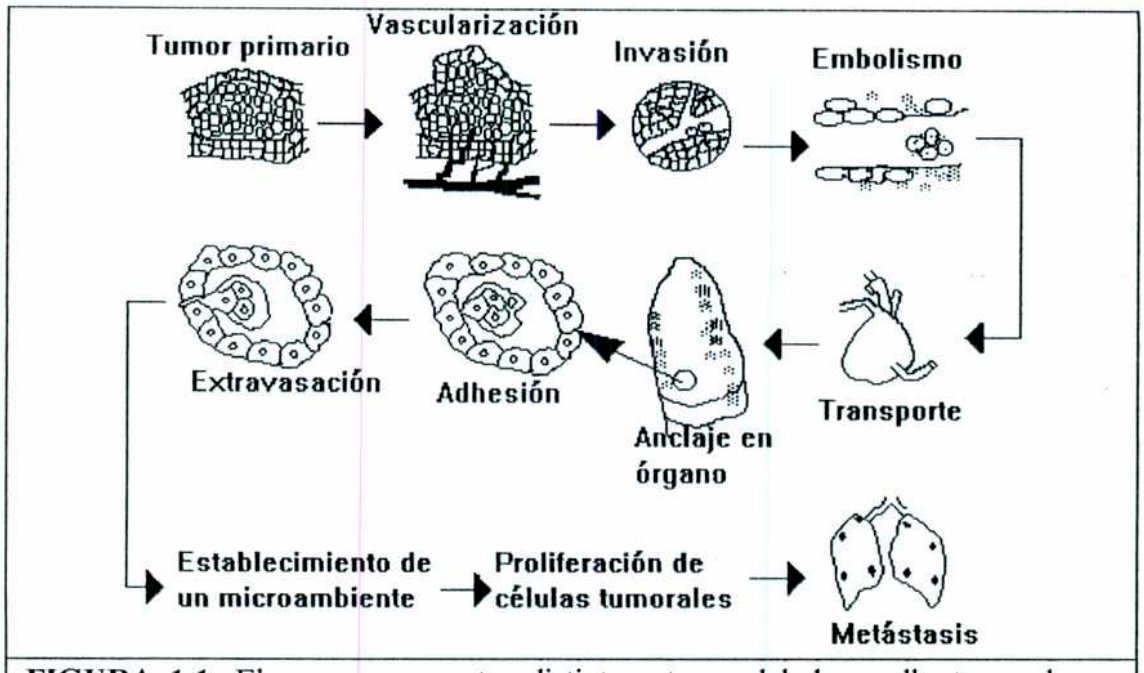


FIGURA 1.1. El esquema muestra distintas etapas del desarrollo tumoral con alguno de los eventos que ocurren durante la formación de metástasis.

1.2. MASTOCITOS.

Una de las células del huésped que se encuentra frecuentemente asociada a los procesos tumorales es el MC. En nuestro laboratorio se observó que el número de MC peritumorales aumenta a medida que el tumor progresa, pero el papel que desempeñan aún no se conoce completamente (Lauría de Cidre & Sacerdote de Lustig 1990).

Los MC fueron identificados en el año 1879 por Ehrlich (1879) quien los denominó Mastzellen debido a que los gránulos citoplasmáticos lo indujeron a pensar que estas células actuaban como nodrizas en el tejido conectivo. La gran heterogeneidad celular debido al contenido de muchos mediadores químicos, llevó a una variada clasificación que retrasó la comprensión de la funcionalidad de los mismos.

Enerbäck (1966a y 1966b) aplicando criterios de coloración y fijación histoquímica, los clasificó en dos poblaciones, los presentes en la dermis o cavidad peritoneal (MC de tejido conectivo; CTMC) o MC "típicos", y aquellos presentes en la mucosa de órganos del tubo digestivo y respiratorio (MMC) o "atípicos".

Coombs y colaboradores (1965), estudiando propiedades histoquímicas de los MC, los diferenciaron en 4 estados: "inmaduros" (I) semejantes a los MMC y los "maduros" (IV)

semejante a los CTMC. Definen también a los estados II y III con mayor similitud al estado I y IV respectivamente.

En la década del 80, empleando técnicas de cultivo y con los recientes conocimientos de las interleuquinas, pudo inducirse la formación de un gran número de MC a partir de células precursoras de médula ósea cultivadas en presencia de interleuquina 3 (IL3) (Ilhe et al. 1983) o conjuntamente con otras interleuquinas (IL4, IL9, IL10.) (Thompson-Snipes et al. 1991). Esto originó una nueva clasificación y aparecieron los términos "diferenciados" para referirse a los CTMC e "indiferenciados" para los MMC, que sumados a "típicos y atípicos" y "maduros e inmaduros" suscitaron un caos conceptual en lo referente a heterogeneidad celular, ya que maduración y diferenciación implican distintos procesos que se suceden desde la ontogenia.

Los MC llamados típicos, maduros y diferenciados corresponden a los CTMC y los atípicos, inmaduros e indiferenciados, corresponderían a los MMC quedando así definidos en forma grosera dos fenotípos característicos por su localización organográfica, que difieren en sus propiedades tintoriales e histoquímicas, las que dependen cuali y cuantitativamente en los mediadores químicos contenidos en los gránulos.

Dentro de los mediadores químicos presentes en los MC se podrían mencionar a la histamina (quizás la más conocida por su acción en procesos inflamatorios y alérgicos), la serotonina, mediadores lipídicos (prostaglandina D2 y leucotrieno C4), proteasas, carboxipeptidasa, triptasas, hidrolasas ácidas (ß-hexosaminidasa y ß-glucuronidasa), varias interleuquinas y proteoglicanos como el condroitín sulfato y la heparina (Galli 1993; Schwartz 1994).

La heparina esta confinada esencialmente a los MC de vertebrados con excepción de algunas especies de moluscos. Por el contrario, el heparán sulfato y el condroitín sulfato son glicosaminoglicanos (GAG) que se encuentran en membranas plasmáticas y ME, tanto en vertebrados como en invertebrados (Cassaro & Dietrich 1977, Nader et al 1984, 1996).

A pesar de que la heparina resulta ser un mediador importante dentro de los MC, el conocimiento de su estructura y su función no se vio acompañada de estudios celulares de los MC, sino que adquirió ribetes de indole farmacológico por su efecto anticoagulante.

1.3. HEPARINA.

1.3.1. Breve historia sobre la heparina.

En el año 1916, Mc Lean aisló una sustancia de hígado que poseía una fuerte actividad anticoagulante. Dos años más tarde Howell y Holt (1918) la denominaron heparina (de hepato=higado).

En la década del 30, dos grupos de investigadores trabajabando en forma independiente en Toronto, dirigidos por Charles Best, y en Estocolmo, por Jorpes, purificaron la heparina a gran escala e iniciaron estudios para su utilización clínica, los que fueron rápidamente aceptados (Lane et. al. 1992).

Transcurridos más de 50 años desde el inicio de su aplicación farmacológica, hoy se la emplea para el tratamiento de la trombosis, embolias pulmonares, infartos agudos de miocardio, oclusiones agudas de arterias periféricas y embolias cerebrales agudas (Verstraete 1990).

Las actividades anticoagulante y antitrombótica de la heparina se deben fundamentalmente a su capacidad para unirse y acelerar la actividad de la antitrombina III (AT III), a su interacción con varias proteasas de la cascada de la coagulación y también a sus efectos sobre la agregación plaquetaria.

Poco se sabía de la estructura de la heparina cuando comenzaron los ensayos clínicos y no fue hasta los años 70, merced a los estudios para caracterizar la región de unión a la AT III, cuando se conocieron con mayor precisión las características bioquímicas y moleculares de la heparina (Damus, et al. 1973; Lindahl et al. 1979). Esto permitió que desde los años 80 hasta la fecha se realizaran diversas investigaciones para conocer la utilidad potencial de la heparina y moléculas análogas en eventos terapéuticos distintos del control de la coagulación.

Entre ellos debe destacarse:

1) Posibles implicancias en el control de eventos moleculares de la ME, dada la similitud existente entre la heparina con el heparán sulfato, un GAG presente en ME y en la membrana plasmática. Además, su unión a numerosas proteínas constituyentes de la ME y la membrana basal, tales como fibronectina, laminina, colágeno, trombospondina y vitronectina puede alterar señales celulares y mecanismos de adhesión.

Por otra parte, participa en procesos angiogénicos debido a que numerosos factores de crecimiento endoteliales y fibroblásticos tienen afinidad por la heparina. La unión y liberación de factores de crecimiento y la inhibición de heparanasa por la heparina han sugerido un posible efecto en el control de la invasión tumoral y la metástasis.

2) La heparina se une también a lipoproteínas y libera la lipoproteinlipasa unida al heparán sulfato de las paredes vasculares. Este hecho, conjuntamente con su actividad antiproliferativa sobre células musculares lisas (SMC), dificultaría la formación de ateromas por lo que se están realizando estudios que sugieren que podría actuar como antiaterosclerótico (Edelman & Karnovsky 1994).

3) También interactúa con proteínas del sistema complemento y se la ha estudiado como posible inhibidor de la inflamación y regulador del sistema inmune (Gorski et al. 1991).

4) El heparán sulfato de la membrana plasmática es el receptor de varios virus. Estudios experimentales con heparina y dextrán sulfato, como inhibidores de la infección del virus de inmunodeficiencia humana tipo I han permitido especular sobre un posible efecto terapéutico de la heparina contra infecciones de retrovirus humanos (Lederman et al. 1989; Baba et al. 1988).

A pesar de que la heparina podría ser utilizada en distintas terapias, el mayor obstáculo para el uso no anticoagulante es el riesgo a la producción de hemorragias. Un camino para reducir los niveles de actividad anticoagulante es la utilización de heparinas modificadas que carezcan de la secuencia de unión a la ATIII.

1.3.2. Biosíntesis y estructura de la heparina.

Dos características estructurales relevantes de la molécula de heparina son su alta densidad de carga, debido fundamentalmente al contenido de grupos sulfato, y su gran heterogeneidad.

La heparina esta constituida básicamente, por una larga cadena de carbohidratos de ácido hexurónico (D-glucurónico o L-idurónico) y D-glucosaminas unidos por interacciones 1-4, que se repiten secuencialmente a lo largo de la cadena. La localización variable de los grupos sulfatos sobre los tres azúcares esenciales podría generar al menos 10 unidades monosacarídicas diferentes, que unidas azarosamente originarían un número extraordinariamente grande de secuencias diferentes (Casu 1985). Sin embargo, durante el proceso biosintético, la formación

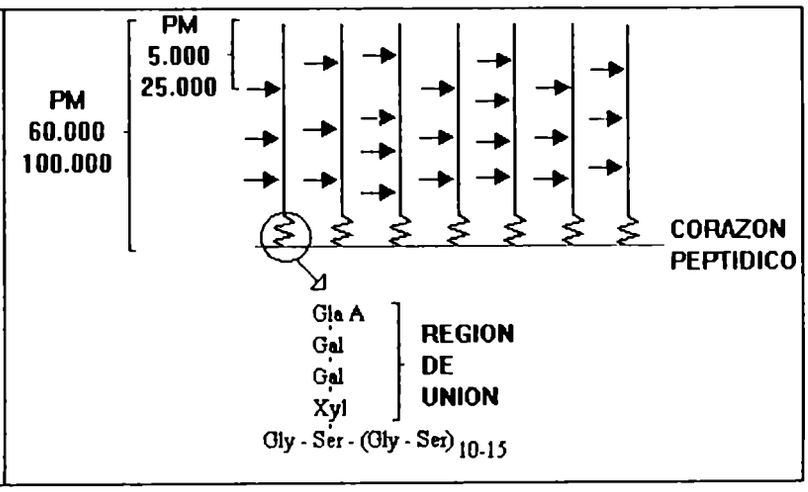
de ciertas unidades de monosacáridos están favorecidas respecto de otras, limitando, al menos en parte, la heterogeneidad.

La mejor manera de describir e ilustrar cómo se genera la estructura compleja y heterogénea de la heparina es a través de los distintos pasos que operan en el proceso biosintético.

La heparina se sintetiza en los MC como un proteoglicano constituido por 10 o más cadenas polisacarídicas unidas a un "corazón peptídico" de residuos serina y glicina alternados. El proceso se inicia en el retículo endoplasmático rugoso mediante la formación del corazón peptídico y continúa con una O-xilosilación de los residuos serina y la posterior adición de dos galactosas, dando origen a un trisacárido (galactosil-galactosil-xilosil) denominado "región de unión" (Figura 1.2.) (Casu 1985; Lindahl et al. 1986).

La elongación de la cadena ocurre en el aparato de Golgi mediante transferencias alternadas de unidades de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina de los correspondientes UDP- azúcares, que se unen al extremo no reductor del polímero en crecimiento. Estas reacciones producen un proteoglicano constituído por un corazón peptídico [$(Ser\text{-}Gly)_n$] altamente sustituído con cadenas polisacarídicas conteniendo de 100 a 200 unidades disacarídicas (glucuronosil-N-acetil-glucosaminil) (Figura 1.2.) (Lidholt et al. 1989).

FIGURA 1.2. Representación esquemática del proteoglicano de heparina. Las cadenas polisacarídicas se unen al corazón peptídico a través de la región de unión. Las flechas indican los cortes de endoglicosidasas tisulares.



El proteoglicano no sulfatado sufre una serie de modificaciones sobre el polímero, que comprenden: 1) Desacetilaciones del residuo N-acetil-glucosamina.; 2) N-sulfataciones del amino libre producido; 3) Conversión de algunos ácidos D-glucurónicos en L-idurónicos

mediante epimerización del C5; 4) O-sulfataciones en el C2 de residuos de ácidos L-idurónicos; 5) O-sulfataciones en el C6 de unidades glucosaminas. Otras O-sulfataciones ocurren en menor medida en el C3 del residuo glucosamina y el C2 del residuo glucurónico (Figura 1.3.) (Pettersson et al. 1991; Lindahl 1986,1989).

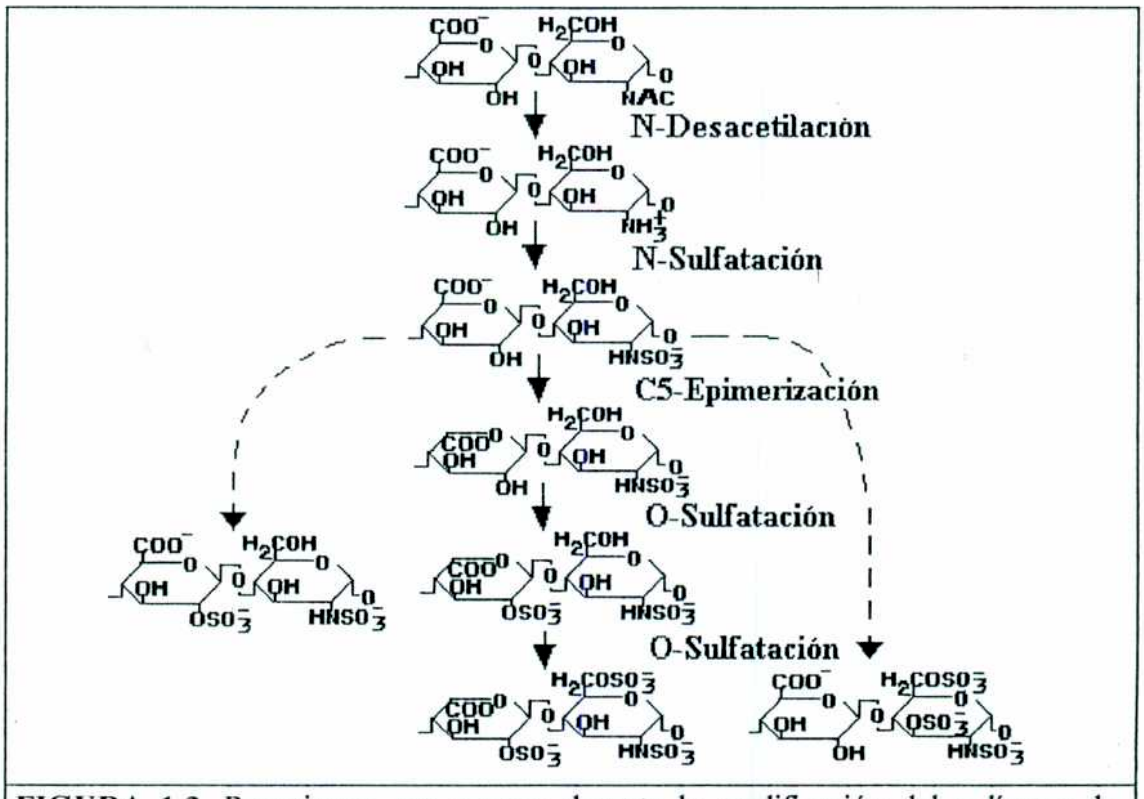


FIGURA 1.3. Reacciones que ocurren durante la modificación del polímero de heparina y heparán sulfato en el proceso biosintético. Las reacciones más frecuentes se indican con flechas continuas mientras que las O-sulfataciones menos comunes se indican con lineas punteadas

Los pasos de las modificaciones son ordenados pero incompletos, de manera tal que cada enzima actúa solo en la unidad monosacarídica que satisface la especificidad de sustrato, pero no todas las N-acetil glucosaminas son desacetiladas. Por ejemplo, las unidades N-acetil-glucosaminas que no son desacetiladas no pueden N-sulfatarse. No se conoce el mecanismo que determina cuales unidades N-acetil-glucosaminas son desacetiladas y cuales permanecen intactas.

La N-desacetilación N-sulfatación se produce ampliamente en el proceso biosintético de la heparina, así como también se presenta una alta relación de ácidos idurónicos respecto de glucurónicos y un alto contenido de grupos sulfatos. Contrariamente, el heparán sulfato, una

molécula estructuralmente relacionada con la heparina y abundante en la ME, mantiene mayoritariamente la secuencia (glucuronosil-N-acetil-glucosaminil)$_n$ con un mayor contenido de ácidos glucurónicos y un menor contenido de grupos O-sulfatos.

Las N-sulfataciones influyen de manera muy importante en la estructura de la heparina. Por ejemplo, dos unidades sacarídicas ubicadas a ambos lados de un residuo glucosamina N sulfato, son sustratos potenciales de la epimerasa. Sin embargo, solo uno de los ácidos glucurónicos sufrirá la epimerización del C5 (Jacobsson et al. 1984).

Las reacciones de epimerización y O-sulfatación, al igual que las N-desacetilaciones, son incompletas, de manera tal que varias unidades que son sustratos potenciales de las enzimas escapan a las modificaciones. No se conocen los mecanismos que operan en la selección enzimática, aunque no pueden descartarse posibles implicancias azarosas.

Como resultado de estas modificaciones incompletas en el polímero, se produce una marcada heterogeneidad entre y dentro de las cadenas polisacarídicas.

Cada cadena de un polímero recién sintetizado posee un peso molecular que oscila entre 60.000 y 100.000 D (200-400 unidades monosacarídicas) lo que resulta ser mucho mayor que las heparinas comercialmente disponibles (6.000 a 25.000 D). Esto se debe a la acción de glucuronidasas tisulares (endo-ß-D-glucuronidasa) que clivan a la cadena polisacarídica en sitios específicos (Figura 1.2.).

1.3.3. Estructura de la heparina con afinidad por la antitrombina III.

Los requerimientos estructurales de la heparina en cuanto a sus propiedades anticoagulantes, comenzaron a descubrirse después del año 1968, cuando se aisló el llamado cofactor de la heparina (Abildgaard 1968), hoy denominada ATIII. La ATIII actúa inactivando varias serino-proteasas en la cascada de la coagulación siendo una de las más importantes la trombina (Tr). Varias investigaciones mostraron que la naturaleza de esa interacción se debe a la formación de un complejo entre la ATIII y la Tr en una relación estequiométrica 1a 1. La formación de dicho complejo se acelera marcadamente en presencia de heparina, como consecuencia de un cambio alostérico en la molécula de ATIII, que favorece la unión con la Tr (Rosenberg & Damus 1973).

Dentro de una preparación comercial de heparina, aproximadamente 1/3 puede unirse con alta afinidad a la ATIII ($Ka=10^8$ M^{-1}) y posee una alta actividad anticoagulante (aproximadamente 300 UI/mg.), mientras que la fracción restante posee una afinidad baja o intermedia ($Ka=10^5$ M^{-1}) y resulta esencialmente inactiva en cuanto a su actividad anticoagulante (Andersson et al. 1976; Evans et al. 1992).

La figura 1.4. muestra la secuencia de la heparina con alta afinidad por la ATIII (Lindahl et al. 1984; Casu 1985).

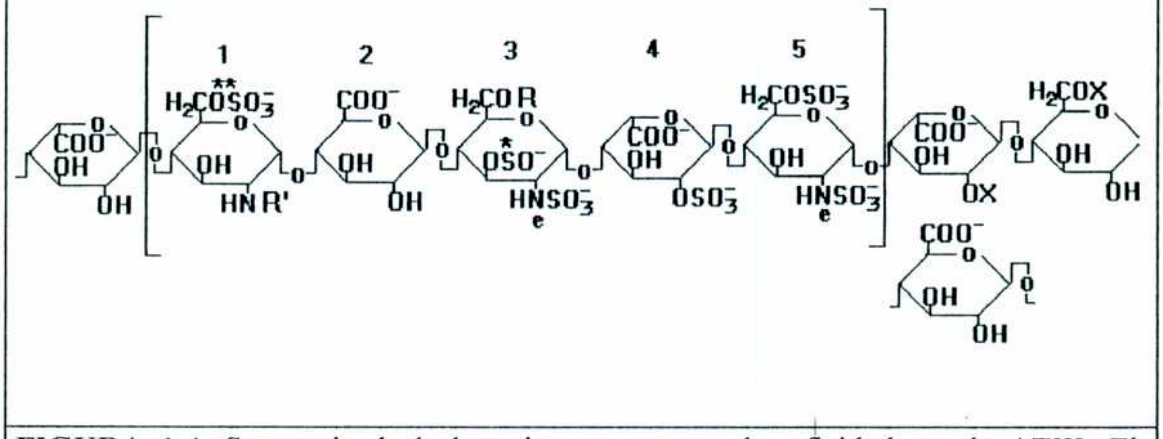


FIGURA 1.4. Secuencia de la heparina que posee alta afinidad por la ATIII. El pentasacárido se compone de tres glucosaminas (unidades 1,3 y 5) , un ácido glucurónico (unidad 2) y un ácido idurónico (unidad 4). Los grupos variables se indican con R (H o SO_3) o R' ($COCH_3$ o SO_3). El grupo 3-O-sulfato (*), el 6-O-sulfato (**) y los N-sulfato (e) esenciales en la unión con la antitrombina están señalizados.

Es importante remarcar algunos aspectos de esta secuencia:

1. Las unidades constituyentes no se repiten durante la secuencia de manera tal que los ácidos urónicos son diferentes y las tres glucosaminas están sustituidas diferencialmente. Por lo tanto, esta secuencia es el resultado de modificaciones incompletas del polímero.

2. La secuencia se encuentra altamente conservada aunque pueden encontrarse dos sustituyentes distintos en el C2 de la glucosamina del extremo no reductor (N-acetilo o N-sulfato) y en el C6 de la unidad glucosamina intermedia (hidroxilo o O-sulfato).

3. Dos grupos O-sulfato, resultan esenciales para la interacción de la heparina y la ATIII, tales como el grupo O-sulfato del C3 de la glucosamina interna (no se la encontró en la fracción

de heparina de baja afinidad (Lindahl et al 1980) y el del C6 de la glucosamina del extremo no reductor (Lindahl et al 1983).

4. Los grupos N-sulfatos en el C2 de las glucosaminas intermedias y del extremo reductor, son también importantes para la unión de alta afinidad con la ATIII (Lindahl et al. 1984; Riesenfeld et al. 1981).

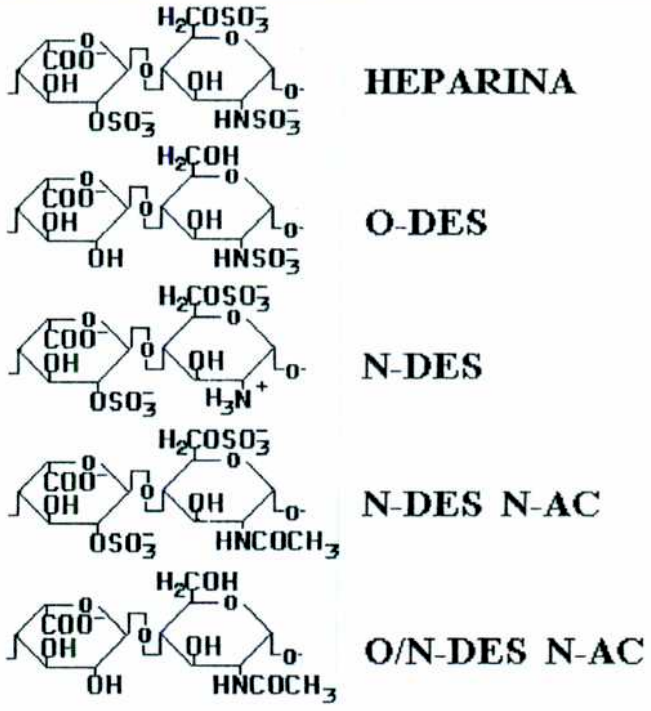
Como puede observarse, al igual que lo que ocurre con otros polisacáridos y proteoglicanos complejos, existe una amplia diversidad y una gran heterogeneidad en la secuencia de la heparina. Por lo tanto debe considerarce la posibilidad de que secuencias especificas dentro de la molécula de heparina, desencadenen respuestas celulares o bioquímicas distintas.

1.3.4. Heparinas modificadas químicamente.

El empleo de heparinas modificadas químicamente, podría permitir seleccionar algunas que retengan ciertas propiedades (por ej. antiproliferativas) y carezcan de otras (por ej. anticoagulante). Esto podría conseguirse empleando heparinas modificadas en alguno de los grupos funcionales esenciales para la unión con la ATIII.

La figura 1.5., muestra las unidades disacarídicas más frecuentes de la heparina y las heparinas modificadas químicamente, empleadas durante el transcurso de nuestras investigaciones, las que fueron producidas y donadas por Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina. Las fórmulas químicas esquematizadas corresponden a: a)heparina, b)heparina parcialmente O-desulfatada, c) heparina parcialmente N-desulfatada; d) heparina parcialmente N-desulfatada N-acetilada (Mediante la acetilación se neutraliza la carga positiva generada por la desulfatación); y e) heparina parcialmente O/N-desulfatada N-acetilada.

FIGURA 1.5. Esquema de las unidades disacarídicas básicas más frecuentes de las heparinas modificadas utilizadas en las investigaciones de la presente tesis. Heparina; heparina parcialmente O-desulfatada (O-des); heparina parcialmente N-desulfatada (N-des); heparina parcialmente N-desulfatada N-Acetilada (N-des N-Ac) y heparina parcialmente O/N-desulfatada N-Acetilada (O/N-des N-Ac)



2. OBJETIVOS GENERALES

El desarrollo tumoral es un proceso complejo que involucra múltiples etapas que van desde el crecimiento del tumor primario hasta la diseminación metastásica. Tal como se mencionó anteriormente, la vascularización o angiogénisis, la migración e invasión del tejido circundante, la intravasación o ingreso de las células tumorales en el torrente circulatorio o linfático, el transporte, el anclaje en el órgano blanco, la adhesión al endotelio vascular, la extravasación y posterior migración de la célula tumoral son procesos intermedios fundamentales para dar origen a las metástasis.

Los MC podrían modular todas estas etapas debido a que contienen una gran variedad de mediadores químicos en sus gránulos citoplasmáticos. Uno de ellos, la heparina, podría regular el crecimiento de las células tumorales interactuando directamente con ellas o, indirectamente, modulando la acción de varios factores de crecimiento o enzimas que participan en la angiogénesis, en la invasión tumoral y en el desarrollo de las metástasis. El contenido de heparina puede variar en MC que se encuentran en distinto estado funcional llevando a la célula a cambios fenotípicos y a ejercer diferentes efectos.

A partir de lo expuesto y teniendo en cuenta los múltiples y complejos efectos que pueden ejercer los MC y especialmente la heparina, nosotros hemos estudiado algunos de los mecanismos de acción que consideramos relevantes en el desarrollo tumoral.

Se fijaron así tres objetivos generales:

1) El primero de ellos fue ***estudiar la acción de los MC en el desarrollo tumoral de adenocarcinomas mamarios murinos***.

Considerando las dificultades histoquímicas para la detección de MC, estudiamos la capacidad de un nuevo fluorocromo en facilitar la identificación de MC con el objetivo de determinar las diferencias en el contenido de GAG entre MC de cavidad peritoneal de ratones normales (MCN) y de portadores de tumor (MCP), para finalmente establecer la acción de estos dos tipos de MC sobre el desarrollo tumoral.

Los resultados obtenidos de estos objetivos se presentan en la sección II, parte experimental, capítulos 4 y 5.

2) El segundo objetivo fue ***estudiar la acción directa de la heparina sobre las células tumorales***. Para ello nos propusimos estudiar el efecto sobre la proliferación celular in vitro y la presencia y número de receptores de heparina en las células tumorales. Considerando que el estudio de la acción de la heparina en el crecimiento tumoral in vivo, se ve obstaculizado por su efecto anticoagulante, también estudiamos heparinas químicamente modificadas en los grupos O y N sulfato, que tienen alterada la capacidad de unirse a la ATIII. Finalmente, estudiamos el efecto de las heparinas en la adhesión celular.

Los resultados obtenidos se presentan en la sección III, parte experimental, capítulos 6, 7 y 8.

3) El tercer objetivo fue ***estudiar el efecto que poseen la heparina y las heparinas modificadas en el desarrollo tumoral*** por lo que analizamos su acción sobre el crecimiento del tumor primario y sobre la formación de metástasis.

Surgieron tres hipótesis que podrían explicar los resultados obtenidos sobre el efecto de la heparina sobre la formación de metástasis experimentales, por lo que nos propusimos estudiar cada una de ellas.

Considerando que la sobrevida de las células tumorales se ve modificada por los eventos que regulan la homeostasis en el torrente sanguíneo, nos propusimos estudiar el efecto de la heparina y las heparinas modificadas en la coagulación, particularmente en animales portadores de tumor. Por otro lado el sistema fibrinolítico participa en la regulación homeostática y podría intervenir en el desarrollo de metástasis por lo que decidimos estudiar el efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre la fibrinólisis mediado por el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa. Finalmente, se estudió la producción de enzimas de tipo heparanasa por parte de las células tumorales dado que se requieren en la intravasación y extravasación durante la formación de metástasis.

La sección IV, parte experimental, capítulos 9, 10, 11 y 12 contiene los resultados obtenidos durante el desarrollo de estas investigaciones.

3. MODELO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo, se emplearon como modelo de estudio dos tumores mamarios murinos de diferente capacidad metastásica en pulmón (M3 y MM3).

El tumor M3, de origen espontáneo en un ratón Balb/c, presenta una latencia de 6-8 días y alcanza un tamaño de 25 mm a los 25 días post-trasplante subcutáneo, con una incidencia de metástasis pulmonares espontánea del 40% (2-6 nódulos por ratón). El tumor MM3 fue obtenido experimentalmente por el Dr. Colombo (1980, 1986) por trasplantes subcutáneos sucesivos de metástasis pulmonares de M3 en ratones singeneicos. Una vez estabilizada la línea, el tumor MM3 , se mantiene al igual que el M3, por transplantes subcutáneo de fragmentos de tumor en flanco de ratones singenéicos. La variante MM3 presenta una latencia de 12-14 días y su tamaño es de 12 mm a los 25 días, con una incidencia metastásica del 95% (30 nódulos por ratón).

El tiempo de sobrevida de los ratones portadores de tumor es de 45 y 60 días para el tumor M3 y el MM3 respectivamente.

Los estudios histopatológicos, muestran que el tumor M3 y el MM3 son adenocarcinomas poco diferenciados con elementos glandulares aislados y cordones celulares sólidos bien definidos rodeados por delgados haces de estroma fibroso. El tumor MM3 presenta mayor número de áreas necróticas que el M3. En ninguno de ellos de detecta la presencia de células inflamatorias infiltrantes.

Las células M3 son poliédricas, de tipo epitelioide y heterogéneas en cuanto a forma y tamaño mientras que las células MM3, que también poseen morfología epitelioide, son más homogéneas en ambos parámetros. El tiempo de duplicación in vitro es más corto para las células M3 que para las MM3, lo que se correlaciona con el crecimiento in vivo, la agresividad y el tiempo de sobrevida de los ratones (Bal de Kier Joffé et al 1983; 1986). Se demostró que el tumor MM3 in vitro puede crecer en agregados celulares, tiene disminuida su capacidad adhesiva a sustratos y menor expresión de fibronectina que el tumor M3. Todos estos eventos explican en parte la mayor capacidad metastásica del tumor MM3 (Bal de Kier Joffé et al. 1983; Muro et al. 1991).

La inducción de la angiogénesis está incrementada en las células MM3 respecto de las M3 (Davel et al. 1984).

Los estudios cromosómicos de ambos tipos celulares mostraron que las células M3 son mayoritariamente tetraploides, mientras que la distribución cromosómica de las células MM3 es más homogénea y diploide.

La tabla 3.1. resume, de manera comparativa, las características relevantes de ambos tumores o sus células en cultivo.

TABLA 3.1. Comparación del crecimiento tumoral y el tipo celular entre los adenocarcinomas M3 y MM3.

TUMOR	M3	MM3
Tiempo de sobrevida (días)	45	60
Tiempo de latencia (días)	6-8	12-14
Metástasis en	pulmón	pulmón
Incidencia metastásica (%)	40	90
Estructura	Pseudo glandular	Pseudo glandular
Angiogénesis	+	++
Población celular: forma	Epitelioide	Epitelioide
tamaño	Más grandes y heterogéneas	Más pequeñas y homogéneas
Número cromosómico	mayoritariamente tetraploides	mayoritariamente diploides
Adhesividad	++	+
Tiempo de duplicación in vitro (hs)		
en 10 % SFB	24-28	40-48
en 2 % SFB	48-60	90-100
sin SFB	90-96	120-130

Tanto las células M3 como las MM3 han sido establecidas y caracterizadas recientemente como líneas celulares (LM3 y LMM3 respectivamente), mediante repiques continuos in vitro, alcanzando actualmente más de 100 pasajes (Urtreger et al 1997) .

Algunos de los estudios presentados en esta tesis, se realizaron con la línea celular F3II. La misma es una subpoblación clonal del tumor M3, obtenida por el Dr. Alonso y colaboradores (1994, 1996a) mediante dilusión límite. Al igual que las células parentales, la línea F3II crece in vitro formando monocapas con un tiempo de duplicación similar a las células M3.

La morfología de las células F3II en monocapa es fusiforme y de tamaño homogéneo, a diferencia de las células M3 cuya estructura celular es epitelioide y heterogénea. Estudios in vivo demuestran que las células F3II inducen más angiogénesis y presentan mayor capacidad metastásica en pulmón (> 90 %) que el tumor parental. Estudios histopatológicos demuestran que este tumor crece de manera poco diferenciada, con características de carcinoma (carcinoma sarcomatoide) y con una muy marcada capacidad de invasión local.

Una característica importante es que aunque las células F3II producen menos de un tercio de uroquinasa (una proteasa que participa en los procesos de invasión y metástasis) que las células parentales M3, la mayor parte se encuentra asociada a la membrana plasmática mientras que las células M3 poseen un 85 % de la uroquinasa total en citoplasma.

SECCIÓN II

MASTOCITOS

PARTE EXPERIMENTAL

El papel que desempeñan los mastocitos durante el desarrollo tumoral es controvertido aunque hay unanimidad de criterio en el hecho de que su número aumenta durante la progresión tumoral.

La heparina, que es uno de los mediadores químicos más abundantes de los MC, se libera durante la exocitosis y podría ejercer diversos efectos biológicos sobre las células tumorales vecinas.

La detección histoquímica de MC se realiza habitualmente empleando algunos colorantes catiónicos como el azul de toluidina o el azul alcian a bajo pH, lo que incrementa la selectividad de la interacción de estos compuestos con los grupos sulfatos de los glicosaminoglicanos. Por otra parte, también se han empleado algunos fluorocromos metacromáticos como el naranja de acridina.

En los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos fluorescentes que podrían ser sumamente útiles para la detección de MC, que acompañados de técnicas como microscopía electrónica o análisis de imagen permitirían estudios comparativos entre MC en diversos estados funcionales.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la detección de MC empleando el compuesto tris (2, 2'-bipiridina) rutenio (II) [que hemos denominado Rubipy] (capítulo 4) y los estudios sobre las diferencias en el contenido de glicosaminoglicanos entre MC normales (MCN) y de portadores de tumor (MCP) y el efecto que poseen ambos MC durante el crecimiento de las células tumorales in vitro y el desarrollo tumoral in vivo (capítulo 5).

4. IDENTIFICACIÓN CITOQUÍMICA DE MASTOCITOS.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Los MC desempeñan un papel importante dentro de las células presentes en el tejido conectivo, debido a la gran cantidad de mediadores químicos que poseen. Se los conoce especialmente por los efectos adversos que producen en distintas patologías, especialmente en aquellas de origen inmunológico, asociados a la liberación de histamina de sus gránulos citoplasmáticos.

La diversidad fenotípica de MC, sumado al hecho de que no son visibles en preparados histológicos de rutina, a excepción de que se los coloree diferencialmente, ha postergado el conocimiento y la caracterización de los distintos tipos de MC, en comparación con otros elementos celulares que participan en el mantenimiento de la homeostasis (Lauría de Cidre 1994).

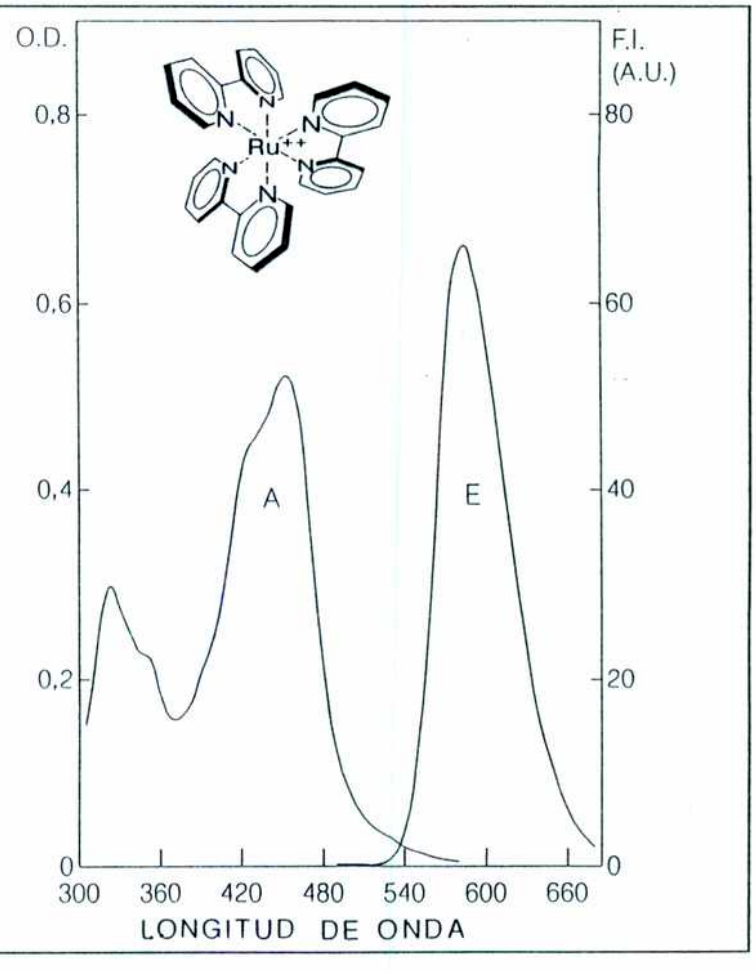
Las técnicas clásicas para la identificación de MC, se basan en la afinidad de los polisacáridos sulfatados por colorantes como el azul alcian (Lev & Spicer 1964) o el azul de toluidina (Johnson & Helewing 1963; Thompson 1966) trabajando a bajo pH. Algunas técnicas más sensibles emplean fluorocromos como el naranja de acridina (Love 1979; West et al. 1976) y el sulfato de berberina (Enerbäck et al. 1976; Módis & Batschwarowa 1969). En los últimos años, se desarrollaron nuevos fluorocromos que comenzaron a comercializarse recientemente, y que podrían resultar de gran utilidad para la identificación de estas células.

El rutenio y otros iones metálicos (Fe, Cu, Co, etc.) tienen la capacidad de formar compuestos quelato estables al unirse con moléculas bi- o tri-dentadas con grupos α, α' diimina. Algunos de estos compuestos han sido empleados en química analítica (Schilt 1969). Su aplicación como catalizadores de reacciones foto- y electroquímicas (Krasan 1980; Tunuli & Fendler 1981) y como ligandos selectivos de macromoléculas (Kelly et al. 1985; Rehmann & Barton 1990; Murphy et al. 1993) han generado un interés creciente en estudios fisicoquímicos y bioquímicos.

El rutenio puede unirse con distintos ligandos polipiridílicos tales como la 1,10-fenantrolina [$Ru(fen)_3^{2+}$]; la 2,2'-bipiridina [$Ru(bipy)_3^{2+}$] (De ahora en adelante lo denominaremos Rubipy); la 2,2',2"-terpiridina [$Ru(terpy)_2^{2+}$] y la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina [$Ru(DIP)_3^{2+}$], que adquieren una estructura quiral con dos formas enantioméricas, llamadas Λ y Δ. Estudios espectrales y de unión al ADN de los compuestos $Ru(fen)_3^{2+}$ y $Ru(DIP)_3^{2+}$ muestran una unión esteroselectiva, en la cual el enantiomero Δ se une al ADN B con giro direcho y el enantiomero Λ al ADN Z con giro izquierdo (Barton et al 1984, 1986; Rehmann & Barton 1990; Kelly et al. 1985).

Varios hechos sugieren que el Rubipy podría ser útil para la detección de MC en estudios citoquímicos de microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia: 1) Es un compuesto catiónico, por lo que podría unirse a la heparina de los gránulos citoplasmáticos; 2) Es un compuesto coloreado y altamente fluorescente (Figura 4.1.) (Kelly et al. 1985); 3) Complejos similares [ej. hierro (II) tris(1,10-fenantrolina)] han sido empleados en estudios histoquímicos (Stockert & Armas-Portela 1995).

FIGURA 4.1. Espectro de absorción (A) y emisión (E) del Rubipy (25 µg/ml) en agua destilada. Longitud de onda de excitación: 460 nm. DO: densidad óptica. IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. Interior: Estructura molecular del Rubipy.



El Rubipy, también podría servir para la observación de MC en microscopía electrónica. La detección de electrones secundarios (SE), es el método más común de obtención de imágenes en microscopía electrónica de barrido (Rochow & Rochow 1978). Sin embargo, el desarrollo de mejores detectores para registrar otras señales tales como fotones X y electrones retrodispersados (BSE) han permitido extender las aplicaciones biológicas de este instrumento. Así, el microanálisis de rayos X (XRMA) (Goldstein et al. 1984; Lawes 1987) y la detección de BSE (Abraham & DeNee 1973; Becker & Sogard 1979) se han convertido en métodos de elección para el estudio químico-estructural de células y tejidos (Ogura & Hasegawa 1980; Soligo et al. 1983; Kato & Gotoh 1990; Trigoso et al. 1992).

Mientras que la imagen por SE revela principalmente detalles topográficos (morfología de superficie), la detección de BSE permite obtener datos sobre la composición, debido a que genera un contraste basado en el número atómico (Z). A mayor Z, mayor es la retrodispersión de electrones, y esto hace posible que la señal de BSE revele detalles estructurales que están poco definidos o no quedan registrados en imágenes convencionales por SE.

Dado que el rutenio es un metal que posee un número atómico relativamente grande (Z=44), la obtención de imágenes de MC por BSE y XRMA constituiría un método complementario de gran interés en estudios citoquímicos.

4.2. OBJETIVOS.

El objetivo central fue:

1. Desarrollar una técnica citoquímica sensible y específica para la observación y detección de MC en estudios microscópicos y microfluorométricos, analizando las condiciones óptimas para la reacción y determinando el tipo de reacción que se establece entre los gránulos de los mastocitos (MCG) con el Rubipy.

2. Investigar la potencialidad de esta reacción, empleando metodologías asociadas a microscopía electrónica, como XRMA, imágenes por BSE y mapeo de elementos.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.3.1. Material Biológico:

Se estudiaron MC procedentes de A) lavado de cavidad peritoneal de ratón y B) cortes del adenocarcinoma mamario murino M3 y biopsia de un carcinoma mamario humano de tipo ductal infiltrante (Hartveit 1981), obtenida del Servicio de Archivos Tisulares del Hospital La Paz, Madrid (España).

4.3.2. Metodología histológica:

a) Preparación de frotis de lavado de cavidad peritoneal: Se realizaron lavados de cavidad peritoneal de ratones machos adultos Balb/c (10-12 semanas), según el método de Sterk y Ishizaka (1982) modificado. Se inyectaron 3 ml de buffer tris A-EDTA, pH: 7,6 conteniendo 25 mM de tris-HCl, 0,12 M de NaCl, 10 mM de EDTA y 0,1 mg/ml de albúmina bovina en la cavidad peritoneal, masajeando suavemente. Después de 1 minuto, la solución de lavado peritoneal fue extraída con pipeta Pasteur, se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 10 min. y el precipitado se resuspendió en el mismo buffer.

Se realizaron frotis con una baja densidad celular sobre portaobjetos de vidrio. Se fijaron en metanol absoluto durante 2 minutos y se secaron al aire.

b) Biopsias del carcinoma mamario humano y del tumor murino M3: La biopsia del carcinoma ductal se obtuvo fijada en formaldehído 4% en PBS, pH: 7,4 durante 12 hs e incluida en parafina. El mismo procedimiento se siguió para la obtención de las preparaciones correspondientes al tumor M3.

4.3.3. Coloración con Rubipy:

Los frotis se tiñeron con soluciones de Rubipy (Sigma) (50; 25; 12,5 y 6,25 μg/ml) preparadas en agua destilada (pH:5,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron al aire

Se estudiaron posibles procesos de autofluorescencia en frotis tratados de manera idéntica a la descripta previamente, pero sin el agregado del colorante.

Cortes desparafinados e hidratados de las biopsias, se tiñeron con solución acuosa de Rubipy (25 μg/ml). Posteriormente se lavaron con agua destilada, se deshidrataron con etanol, se diafanizaron con xilol y finalmente, se montaron en DePeX (Serva).

4.3.4. Estudio del mecanismo de coloración con Rubipy:

En los estudios para determinar el tipo de interacción que ocurre entre el Rubipy (25 µg/ml) y los componentes de los gránulos de los MC, se contemplaron las siguientes variables:

a) Influencia del pH de la solución colorante: se varió el pH de 1 a 5.

b) Pretratamientos de bloqueo del preparado, previo a la tinción con el colorante:

1. Con distintas soluciones salinas [$AlK(SO_4)_2$), $CaCl_2$, $BaCl_2$ (5% durante 5 minutos)].

2. Con soluciones conteniendo proteínas altamente catiónicas [protamina de salmón (Serva) o arenque (Sigma) (50 µg/ml durante 20 min.) o poli-L-lisina (Sigma) (25 µg/ml durante 20 min.)].

3. Metilación con HCl 0,1 N en metanol (24 hs a 60°C) (Pearse 1968).

4. Con tinción previa del ADN empleando hematoxilina de Mayer (10 minutos a temperatura ambiente).

Después de los distintos tratamientos, los preparados se lavaron con agua destilada, a excepción de la tinción con hematoxilina de Mayer para la que se empleó agua corriente, y se secaron al aire. Luego se tiñeron con Rubipy (25 µg/ml) como se explicó previamente.

Se ensayaron distintos medios de montaje tales como agua, glicerol 50% (Merck), Merckoglas (Merck), DePeX (Serva) u observación directa en aceite de inmersión.

Para los preparados empleados en microscopía electrónica, se realizaron suspensiones celulares de lavado de cavidad peritoneal tal como se describió previamente. Un pequeño volúmen de la suspensión (10-20 µl) se extendió sobre la superficie de soportes de grafito (EMS, Joel Carbon Mounts in SEM supplies) previamente pulido mediante papel esmeril especial para metalografía (N° 1200, Buehler, Illinois) y sometido a sonicación con éter. Las células se secaron al aire, se fijaron 2 minutos en metanol absoluto y se tiñeron con solución de Rubipy (25 µg/ml) en agua destilada durante 5 min.

4.3.5. Estudios espectrofotométricos y fluorométricos:

Los análisis espectrales se realizaron con solución acuosa de Rubipy (25 µg/ml) en cubetas de cuarzo, empleando instrumentos Perkin-Elmer (Norwalk, CT) (Espectrofotómetro UV/Vis 551-S y espectrofluorómetro 650-10S).

4.3.6. Microscopía óptica y estudios microfluorimétricos:

Los frotis se observaron en un fotomicroscopio (Zeiss) equipado con un condensador de epifluorescencia con lámpara de mercurio (HBO 100 W) y filtros para diferentes longitudes de onda de excitación tales como, ultravioleta (U.V. 365 nm), violeta (405 nm) azul-violeta (436 nm) y azul (455-495 nm).

Los estudios microfluorimétricos de las células teñidas con Rubipy se realizaron utilizando un fotómetro 03 (Zeiss) y un fotomultiplicador HTVR 466 anexados al microscopio. Se tomó como valor standard la emisión de un vidrio fluorescente de uranilo y los valores de las intensidades de fluorescencia de las distintas células se normalizaron respecto de este patrón.

4.3.7. Detección de electrones electrodispersados (BSE) en microscopio electrónico de barrido, microanálisis de rayos X (XRMA) y mapa de elementos:

Las preparaciones fijadas y teñidas en los soportes de grafito se observaron y estudiaron directamente (sin recubrimiento) mediante técnicas microanalíticas (XRMA) en un microscopio electrónico de barrido JSM 6300 (Jeol) trabajando a 10 kV, y equipado con un detector de SE, detector BSE de estado sólido (modo: composición; distancia 15 mm), y el sistema Link ISIS (Oxford Instruments) para XRMA. El detector usado fue un Link Pentafet ATW de silicio (distancia: 15 mm; inclinación 0°; resolución: 138 eV en la linea del Mn de 15,9 keV; tiempo de conteo: 100 seg.) Los mapas de los elementos se realizaron con el mismo sistema a 10 kV empleando el programa Speedmap y un tiempo total de registro de 30 minutos.

4.3.8. Interacción del Rubipy con distintas macromoléculas:

Se comparó la interacción del colorante con varias macromoléculas biológicas para lo cual se sembraron muestras de 2 µl de soluciones de 1 mg/ml de albúmina bovina (Sigma), pectina ácida, ADN, condroitín sulfato (Serva), heparán sulfato, heparina y heparinas químicamente modificadas en membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer, Mannheim, Alemania). Las siembras se secaron durante el transcurso de la noche a temperatura ambiente, se tiñeron con Rubipy (25 µg/ml) y se observaron en un transiluminador U.V. (Modelo TM 20 UVP, San Gabriel, CA). Las fotografías de las siembras se barrieron con un analizador de imagen (La Cie, modelo G 520 A, Seiko, Epson Japón) y se cuantificaron densitometricamente con el programa de computación NIH image 1.55 f de Macintosh.

4.4. RESULTADOS.

4.4.1. Tinción y tratamientos.

En los frotis de lavado peritoneal de ratón, teñidos con distintas concentraciones de Rubipy y excitados con luz azul o azul-violeta se observó una intensa emisión color naranja en los gránulos de los mastocitos (MCG) y en los núcleos de los linfocitos (LN). La utilización de filtros para excitación violeta o U.V. produjeron una disminución en la intensidad de la fluorescencia, con un cambio en el color de emisión de las estructuras celulares fluorescentes al naranja-rojizo. No se observó autofluorescencia en frotis controles (sin teñir).

La emisión de MCG fue aproximadamente el doble de la de los LN cuando se tiñó con concentraciones de Rubipy de 50 y 25 µg/ml, mientras que concentraciones menores (12,5 y 6,25 µg/ml) ocasionaron una disminución en la emisión de los MCG sin afectar la de los LN. Por lo tanto, se eligió la concentración de 25 µg/ml para los ensayos posteriores.

Tinciones a bajo pH, produjeron una fuerte emisión de los MCG mientras que los LN pierden casi totalmente la fluorescencia. Tinciones a pH inferior a 2, permiten detectar las mayores diferencias entre ambas estructuras celulares (Figura 4.2. y Figura 4.3.a.).

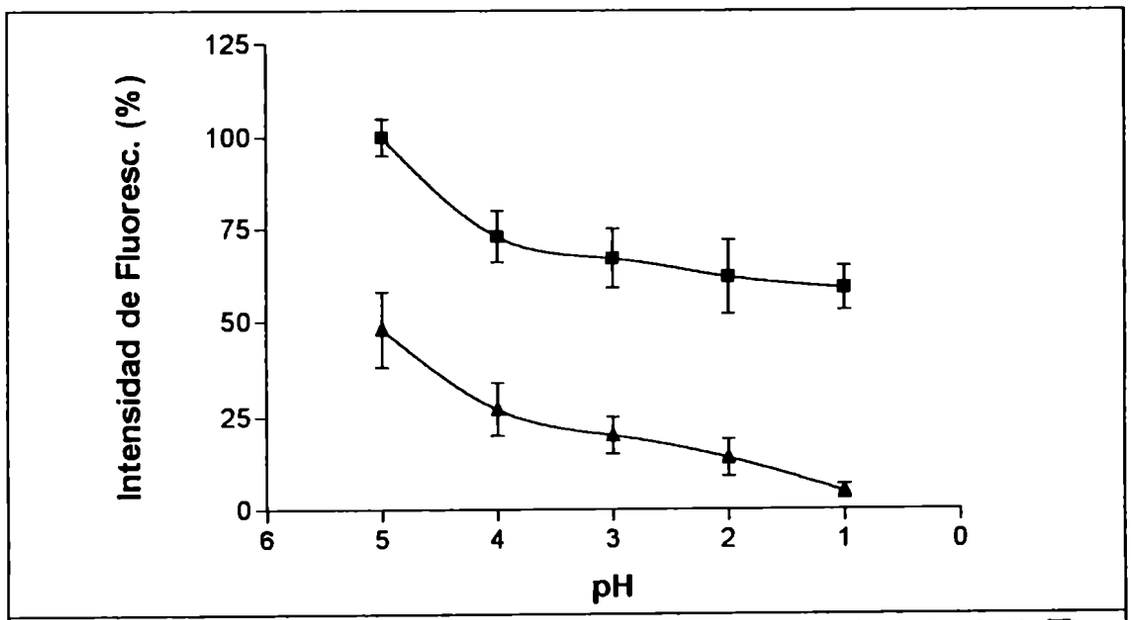


FIGURA 4.2. Efecto del pH sobre la intensidad de fluorescencia de los MC (■) y los linfocitos (▲) teñidos con Rubipy (25 µg/ml). La intensidad de fluorescencia se analizó con luz de excitación azul-violeta. La media de la intensidad de fluorescencia de los MC teñidos a pH 5 se consideró 100% (Media ± DS; n=10)

La tabla 4.1., muestra resultados comparativos de la intensidad de fluorescencia de los MCG y los LN después de realizar distintos pretratamientos. Mientras que la sal de aluminio solo disminuyó la fluorescencia de los LN, las sales de calcio y bario afectaron la intensidad de emisión de los MCG y no la de los LN. El proceso de metilación, también disminuyó la fluorescencia de los MCG, mientras que el pretatamiento con proteínas catiónicas impidió la emisión de todas las estructuras fluorescentes.

TABLA 4.1. Efecto de diferentes pretratamientos en la intensidad de fluorescencia de los mastocitos y los linfocitos teñidos con Rubipy (25 µg/ml) y observados bajo luz de excitación azul-violeta.

PRETRATAMIENTO	MASTOCITOS	LINFOCITOS
ninguno (control)	++++	++
$AlK(SO_4)_2$	++++	+
$CaCl_2$	+	++
$BaCl_2$	+	++
Protamina (salmón)	-	-
Protamina (Arenque)	-	-
Poli-L-lisina	-	-
Metilación	+	++
Hematoxilina de Mayer	+++	-

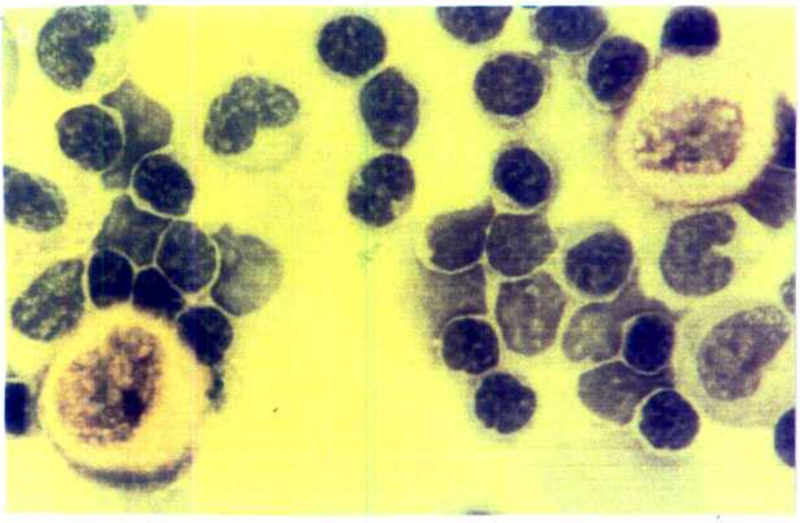
Se evaluaron un mínimo de 20 células en cada caso. La intensidad de fluorescencia se consideró en un rango con extremos en + + + + (mayor) a - (ninguna).

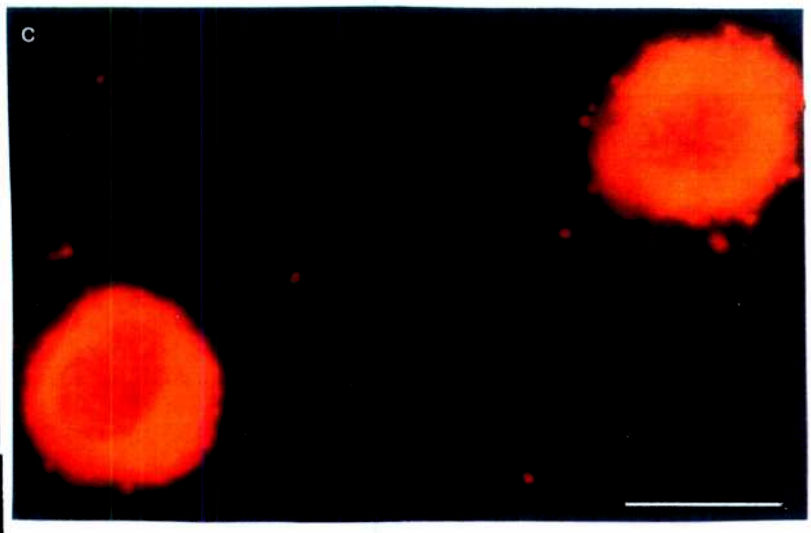
Un método específico para la detección de MC fue el pretratamiento con Hematoxilina de Mayer. Con esta técnica, los núcleos de los linfocitos y MC se ven azul-violeta bajo microscopía de campo claro, mientras que en microscopía de fluorescencia, solamente los MCG poseían una intensa emisión naranja bajo excitación con luz azul, o azul-violeta (Figura 4.3.b y 4.3.c).

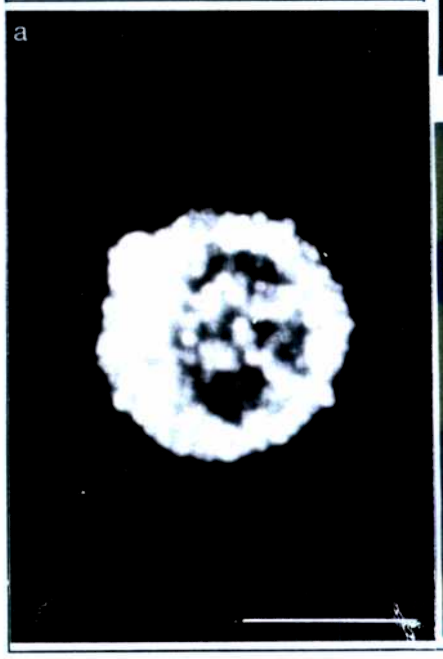
La secuencia de tinción Hematoxilina-Rubipy, también permitió detectar los MC de un carcinoma mamario humano, y su distribución topográfica en microscopía de fluorescencia, mientras que otras estructuras polianiónicas, como la cromatina, pueden visualizarse en

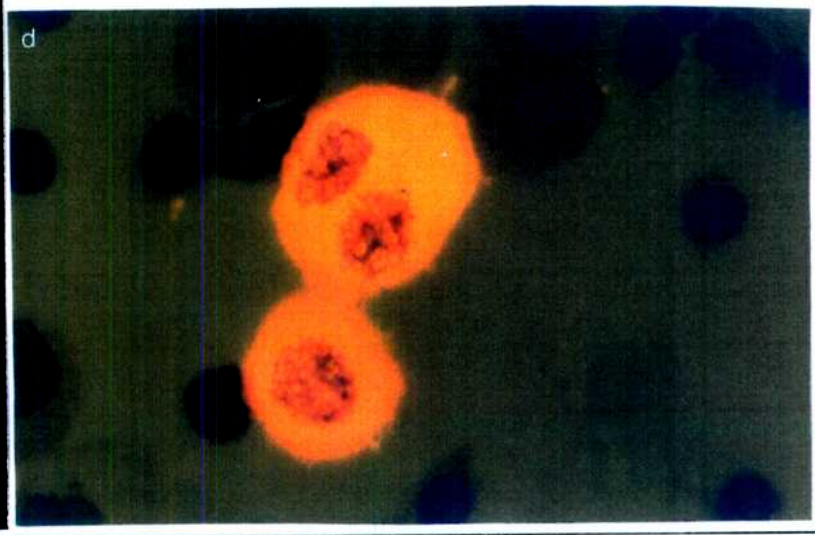
microscopía de campo claro (Figura 4.4.). A diferencia de lo que se observó en el carcinoma humano, donde los MC infiltran el tumor, en el adenocracinomam mamario murino M3, se localizan peritumorales (Figura 4.4.).

FIGURA 4.3.
a) Microfotagrafia de fluorescencia de un MC de cavidad peritoneal teñido con Rubipy (25 µg/ml) a pH 1,5. Se observa una fuerte emisión de los gránulos citoplasmáticos. Luz de excitación: azul-violeta.
b,c y d) MC y linfocitos teñidos con hematoxilina de Mayer antes de la coloración con Rubipy, a pH 5, y observados en microscopía de fluorescencia (b) o las mismas células observadas en campo claro (c) u otras células en microscopía de fluorescencia y campo claro simultaneamente. Los MCG se observan en microscopio de fluorescencia y los LN y el núcleo del MC en microscopía de campo claro. Barra: 20 µm.









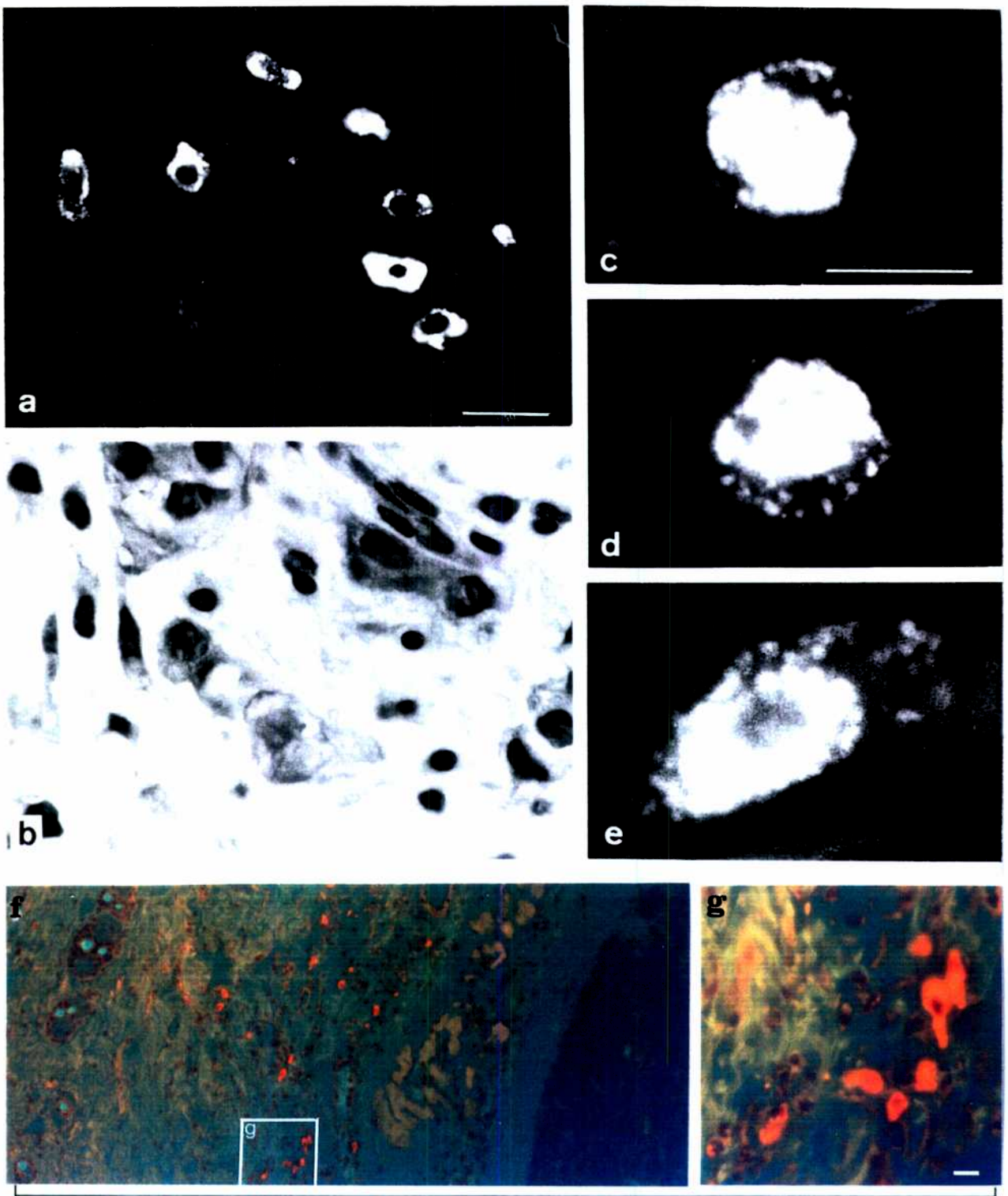


FIGURA 4.4. (a) Microfotografía de fluorescencia de una sección proveniente de un carcinoma mamario humano teñido secuencialmente con Hematoxilina de Mayer y Rubipy y observado bajo luz de excitación azul-violeta. Se observa una selectiva y fuerte emisión de varios MC. (b) La misma sección tisular observada en microscopia de campo claro. Se visualiza la morfología tisular, núcleos de MC y otros tipos tisulares. (c-e) Microfotografía de fluorescencia de algunos MC seleccionados y observados a mayor aumento. (f) Microfotografía de fluorescencia de una sección del tumor M3. (g) selección de algunos MC y observados a mayor aumento. Barras: a,b,f:=50 μm; c-e,g= 20 μm.

4.4.2. Decaimiento de la fluorescencia y medios de montaje.

La intensidad de la fluorescencia emitida en todas las preparaciones teñidas con Rubipy disminuyó cuando se observaron directamente en aceite de inmersión o se montaron en agua destilada. El decaimiento fue mayor aún en preparados montados con glicerol 50 % y Merckoglass. Por el contrario, no se observó decaimiento de la fluorescencia cuando se utilizó DePeX como medio de montaje (Figura 4.5.).

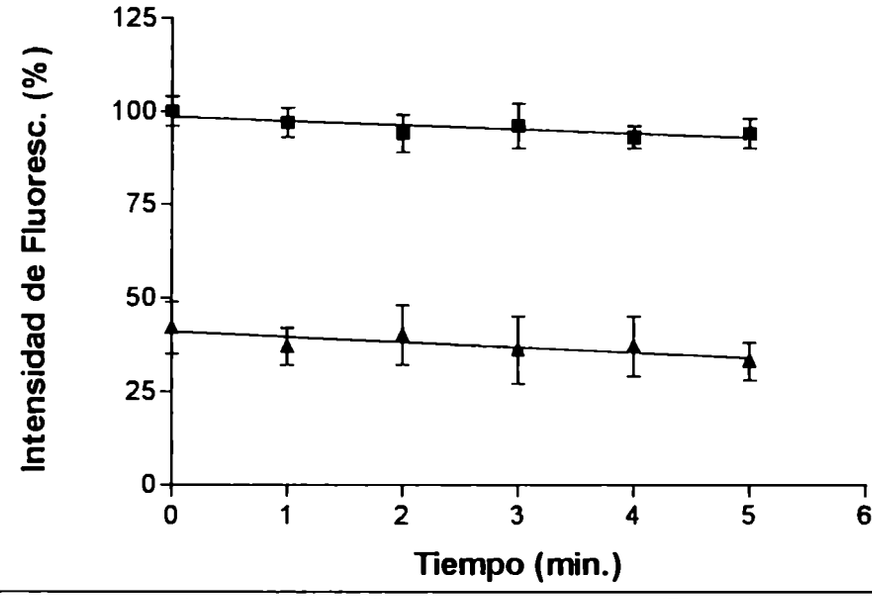


FIGURA 4.5. Decaimiento de la fluorescencia de MC (■) y linfocitos (▲) teñidos con Rubipy (25 µg/ml) a pH 5. Las células fueron irradiadas continuamente con luz de excitación azul-violeta, midiendo la emisión de las células durante 5 minutos. La media de la intensidad de fluorescencia de los MC en el tiempo cero se eligió como 100%. Cada punto representa los valores normalizados (Media ± DS; n=10)

4.4.3. Detección de electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE) en microscopía electrónica de barrido, estudios microanáliticos de rayos X (XRMA) y mapa de elementos.

Las células de lavado de cavidad peritoneal, teñidas con Rubipy (25 µg/ml) y observadas mediante la detección de SE aparecen pobremente definidas debido al muy escaso contraste topográfico ofrecido por la microscopía electrónica de barrido sobre muestras carentes de recubrimiento metálico. Por el contrario, la observación del material mediante el detector de BSE -que revela el contraste del número atómico- permite identificar fácilmente las células por

el tamaño y el brillo diferencial originado por la composición atómica de la muestra, siendo máxima en los MC.

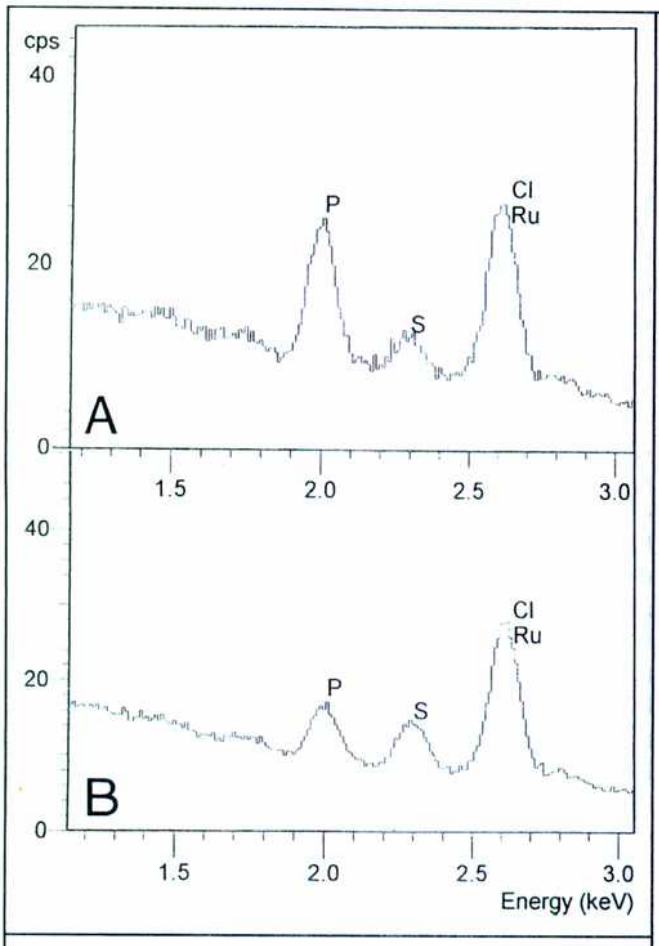
La figura 4.6. muestra el espectro de emisión de la energía dispersa, mediante X-RAM de los linfocitos y MC teñidos con Rubipy (25 μg/ml). Se observó la presencia de los elementos Ru, P y S. Los picos de P y S (correspondientes a las lineas Ka1 y Ka2, P:2,015 y 2,014 KeV, S: 2,308 y 2,306 KeV, respectivamente) fueron diferentes entre los MC y los linfocitos, siendo la relación S/P de 1 para los MC y 0,3 para los linfocitos.

El pico del Ru (La1: 2,558 KeV y Lb1: 2,683 KeV) se superpone con la señal del Cl (Ka1: 2,623 KeV). Sin embargo la señal producida por MC teñidos con Rubipy entre 2,55 y 2,69 KeV fue 7 veces superior que en controles no teñidos indicando una fuerte contribución del Ru.

Los espectros de XRMA permitieron observar también la presencia de zinc que ha sido descripta previamente en los MC (Padawer 1973).

El mapa de los elementos Ru, P y S de células teñidas con Rubipy cuya imagen por BSE correspondía a 3 linfocitos y un MC, se muestra en la figura 4.7. Se utilizó la señal Ka para el mapeo del P y del S, mientras que la distribución del Ru se visualizó a partir de la emisión Lb1.

Como puede observarse, la distribución de S y Ru es masiva en el MC, mientras que el P está relegado a una posición central correspondiente al núcleo de los linfocitos y el núcleo de los MC que también coincide con la presencia de Ru.



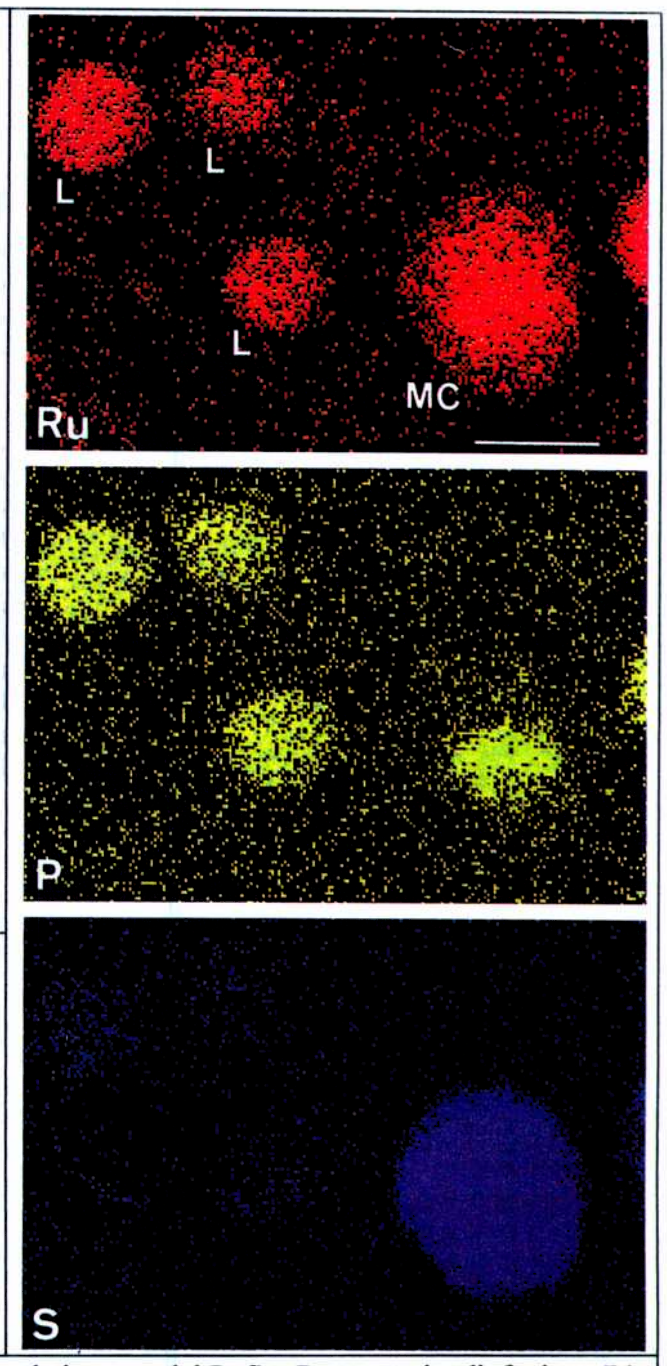


FIGURA 4.6. Espectro de emisión de rayos X de un linfocito (A) y un mastocito (B) teñidos con Rubipy (25 µg/ml) Se observa la posición de las señales del P, S, Cl y Ru. La ordenada corresponde a la intensidad de señal y la abscisa a la energía de emisión X.

FIGURA 4.7. Paneles de mapas de elementos con la imagen del P, S y Ru en varios linfocitos (L) y un mastocito (MC) teñido con Rubipy. Las células fueron previamente identificadas con el detector BSE. La señal del S se origina fundamentalmente de los grupos sulfato de la heparina de los MC y el mapa del P se corresponde con el ADN de la cromatina y refleja la posición nuclear. Barra: 10 µm.

4.4.4. Interacción del Rubipy con distintas macromoléculas.

La figura 4.8. muestra los patrones de fluorescencia de distintas macromoléculas teñidas con Rubipy. Mientras que la albúmina bovina no mostró reacción de fluorescencia, el ADN y la pectina ácida poseen una intensidad de emisión mayor cuando se los tiñe a pH 5 que a pH 1. La fluorescencia de polisacáridos sulfatados como la heparina, el heparán sulfato y el condroitín sulfato resulta poco afectada por modificaciones del pH. La emisión de la siembra de heparina, fue siempre superior a la del heparán y el condroitín sulfato (Figura 4.8a).

Las siembras pretratadas con agua destilada a pH 1,5 y posteriormente teñidas a pH 5, mostraron una emisión muy similar a aquellas sin pretratamiento ácido, lo que sugiere que la adhesión de las macromoléculas a la membrana de nylon no se afectó por el bajo pH.

Se estudió la importancia de los grupos O y N-sulfato en la interacción de la heparina con el Rubipy, empleando las heparinas modificadas químicamente. Las heparinas parcialmente N-desulfatadas (N-des y N-des N-Ac) poseían una fluorescencia similar a la heparina sin modificar, mientras que las heparinas parcialmente O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) emitían una menor intensidad de fluorescencia (Figura 4.8.b).

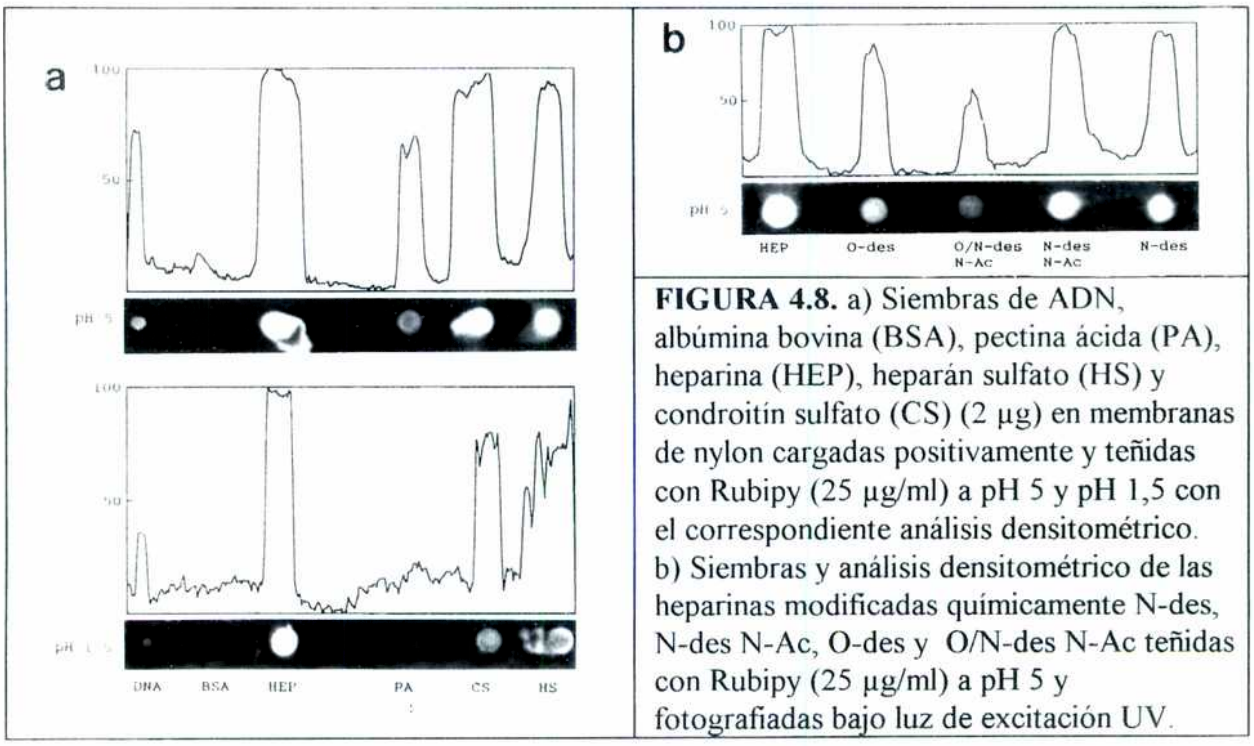


FIGURA 4.8. a) Siembras de ADN, albúmina bovina (BSA), pectina ácida (PA), heparina (HEP), heparán sulfato (HS) y condroitín sulfato (CS) (2 µg) en membranas de nylon cargadas positivamente y teñidas con Rubipy (25 µg/ml) a pH 5 y pH 1,5 con el correspondiente análisis densitométrico. b) Siembras y análisis densitométrico de las heparinas modificadas químicamente N-des, N-des N-Ac, O-des y O/N-des N-Ac teñidas con Rubipy (25 µg/ml) a pH 5 y fotografiadas bajo luz de excitación UV.

4.5. DISCUSIÓN.

El lavado de cavidad peritoneal posee una abundante cantidad de MC, así como también de linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Estas células, a excepción de los MC, son fácilmente identificables por su morfología nuclear, con colorantes de rutina con afinidad por los grupos fosfato del ADN. Los MC, además del ADN, posee otra macromolécula aniónica, la heparina, contenida en los gránulos citoplasmáticos, los que coloreados con colorantes catiónicos enmascaran la morfología nuclear (Lagunoff 1974). De esta manera, los frotis de lavado peritoneal son un buen modelo para el estudio de nuevos colorantes y fluorocromos potencialmente capaces de interactuar con polianiones como la heparina de los MCG y el ADN de otras células.

En los últimos años se ha generado un gran interés en el estudio de la aplicación bioquímica de moléculas constituidas por complejos entre el rutenio y ligandos polipiridílicos (ej. 2,2'-bipiridina; 1,10-fenantrolina).

Estos ligandos poseen poca reactividad química a excepción de la formación de compuestos quelatos, y a pesar de no poseer carga neta, los complejos tris-quelato son invariablemente catiónicos. Por lo tanto, resultan esperables interacciones electrostáticas entre el Rubipy y sustratos polianiónicos y, de hecho, han sido descriptas entre el Rubipy y el ADN (Kelly et al. 1985)

Los estudios citoquímicos realizados a distintos pH o en presencia de distintas sales, permiten suponer la existencia de una interacción iónica del Rubipy con la heparina y el ADN. En este sentido, el pretratamiento de los frotis con iones Al^{3+}, los cuales se unen fuertemente al ADN (Llorente et al. 1989; Scott 1973), disminuyeron la fluorescencia de los LN, mientras que iones Ca^{2+} y Ba^{2+}, que poseen alta afinidad por grupos sulfatos (Pearse 1968; Thompson 1966), disminuyeron la fluorescencia de los MCG sin afectar la de los LN. El tratamiento con proteínas policatiónicas (protamina y poli-L-lisina) bloqueó la fluorescencia de ambas estructuras celulares, y la metilación prolongada, que bloquea y/o remueve grupos sulfatos (Pearse 1968, Thompson 1966), impidió la fluorescencia de los MCG.

Se observó una buena correlación entre los estudios microscópicos de los frotis de cavidad peritoneal y la emisión del colorante cuando interactuó con varias macromoléculas sembradas

en membrana de nylon. Cuando se tiñó a pH 5, la fluorescencia fue mayor en las moléculas que contienen grupos sulfato como la heparina, el heparán sulfato y el condroitín sulfato, que en las que contienen fosfatos (ADN) o carboxilos (pectina ácida). Concordantemente, la fluorescencia de los MCG fue mayor que la de los LN. A pH 1,5, la afinidad por los carboxilos y los fosfatos disminuye (Hadler et al. 1978; Lev & Spicer 1964) y es cuando se observa la mayor diferencia en la fluorescencia entre polianiones sulfatados y no sulfatados. En estas condiciones, fluorescían solamente los MCG.

La potencialidad y selectividad del fluorocromo para la identificación de macromoléculas, especialmente por la heparina, quedó de manifiesta, además de su aplicación en microscopía de fluorescencia por el brillo diferencial que se observa en los MC cuando se emplea microscopía electrónica de barrido con detector de BSE. Una importante contribución a la intensa señal de BSE en MC, es la correspondiente al componente de rutenio del complejo utilizado en la tinción.

El mapeo de los elementos permite corroborar el hecho de que el Rubipy interactúa con los fosfatos del ADN dado que el P y el Ru se superponen en la localización nuclear de los linfocitos y en el núcleo del MC; además se observa que interactúa con los sulfatos de la heparina debido a la superposición existente entre el S y el Ru en los gránulos citoplasmáticos de los MC.

Hemos mencionado previamente que la heparina posee grupos O-sulfatos y N-sulfatos. Se estudió la influencia de cada uno de ellos en la interacción con el Rubipy empleando las heparinas modificadas químicamente. Se conoce que los grupos N-sulfato son menos ácidos que los O-sulfatos, lo que se refleja en la interacción heparina-Rubipy. La N-desulfatación genera un amino libre, el que puede estar protonado o acetilado. La interacción del Rubipy con las heparinas parcialmente N-desulfatadas (N-des y N-des N-Ac) no se vio afectada, pero por el contrario, las heparinas parcialmente O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) interactuaron menos que las N-desulfatadas.

El Rubipy posee varias ventajas para la detección de polisacáridos sulfatados respecto de otros colorantes catiónicos empleados a bajo pH como el alcian blue (Lev & Spicer 1964), el azur A (Spicer & Duvenci 1964) y el azul de toluidina (Johnson & Helwing 1963; Thompson

1966) o fluorocromos como el naranja de acridina (Love 1979; West et al. 1976) y la berberina (Enerbäck et al. 1976; Módis & Batschwarowa 1969):

1. La emisión naranja puede observarse con diferentes filtros de excitación.

2. Posee poco o ningún decaimiento por exposición continua a la luz.

3. La fluorescencia se preserva muy bien y por tiempos prolongados en preparados montados en DePeX.

4. Puede emplearse también en microscopía electrónica de barrido con detector de BSE.

5. Es un método selectivo para la detección de polisacáridos sulfatados en MC cuando se utiliza la secuencia de tinción hematoxilina-Rubipy que bloquea la emisión de la cromatina lo que permite visualizar los núcleos en microscopía de campo claro y los MCG en microscopía de fluorescencia o empleando ambos métodos simultáneamente. Esto resulta de gran utilidad para estudios histopatológicos.

5. MASTOCITOS Y PROLIFERACIÓN.

5.1. INTRODUCCIÓN.

Los MC se encuentran numéricamente aumentados en patologías tumorales. Ehrlich (1879), a un año de haberlos descubierto, ya los encontró asociados a procesos de proliferación celular malignos. El incremento en el número de MC, se produce gradualmente durante el crecimiento tumoral, observándose la presencia de heparina en la matriz extracelular periférica a MC desgranulados. También se observan cambios fenotípicos, revelados por modificaciones en las propiedades tintoriales consecuencia de la liberación de algunos mediadores (Lauría de Cidre & Sacerdote de Lustig 1990).

No se conoce con exactitud si la exocitosis de los MC, gatillada por procesos inmunológicos y/o no inmunológicos, produce una liberación controlada de los diversos mediadores químicos que posee. De todas maneras, éstos participan modificando la ME y el comportamiento de las células vecinas.

En las neoplasias, los procesos de invasión y las metástasis dependen del grado de proliferación celular, de la microvascularización y de la degradación de la ME. Los MC pueden intervenir en cada uno de estos procesos modificando por ejemplo el crecimiento tumoral ya sea inhibiéndolo (Farram & Nelson 1989; Henderson et al. 1981) o exaltándolo (Hartveit 1981; Nordlund & Askenase 1983; Norby 1985; Roche 1985); pueden actuar potenciando el proceso angiogénico (Smith & Basu 1970; Kessler et al. 1976; Azizkhan et al. 1980), o facilitando la invasión mediante la liberación de enzimas proteolíticas capaces de clivar colágeno de tipo IV, fibronectina, elastina y proteoglicanos (Choi & Claman 1987; Hatamochi et al. 1985; Dexter et al. 1981) o bien activando la procolagenasa de los fibroblastos y estimulando su secreción (Dabbous et al. 1986).

Los mecanismos por los cuales los MC participan en estos procesos no se conoce con precisión. Sin embargo, la liberación de heparina y de las proteasas de los gránulos citoplasmáticos, intervienen en el control fisiológico que ejercen estas células (Pejler & Berg 1995). Por lo tanto, es esperable que MC que difieran fenotipicamente y/o posean diferencias cuali y cuantitativas de sus mediadores, ejerzan respuestas biológicas distintas.

En los últimos años, se desarrollaron técnicas que, empleando imágenes digitalizadas de muestras microscópicas y análisis computarizados, permitieron tomar medidas morfológicas e histoquímicas para comparar diversas muestras biológicas. Empleando esta metodología se ha podido revelar y cuantificar diferencias estructurales difíciles de discernir a simple vista (Morgas et al 1993; Mello et al 1994; Stauber et al 1995), que además podrían ser útiles para la caracterización de los MC.

5.2. OBJETIVOS.

El objetivo del presente capítulo, es el estudio de la acción recíproca que se establece entre MC y células tumorales. Para ello estudiamos:

1. El contenido de GAG en los gránulos citoplasmáticos de MC procedentes de cavidad peritoneal de ratones normales (MCN) y de ratones portadores de tumor (MCP).

2. La acción de los MC sobre el crecimiento tumoral in vivo e in vitro.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.3.1. Tumores:

Se utilizaron los adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3 que poseen distinta capacidad metastásica.

5.3.2. Suspensión y purificación de MC:

Se efectuó el lavado de la cavidad peritoneal de 15 ratones normales y 15 portadores de tumor, para cada ensayo, con buffer tris, albúmina y EDTA, tal como se mencionó en el punto 4.3.2. El lavado de la cavidad peritoneal de los ratones portadores de tumor se llevó a cabo cuando éstos alcanzaron 2/3 del tiempo total de sobrevida para cada tumor.

Las suspensiones celulares mixtas obtenidas, se concentraron independientemente a un volumen de 1,5 ml, cada una en el mismo buffer, y se sembraron sobre sendos gradientes discontinuos de metrizamida al 24 %, 22 %, 20 % y 18 %. Se centrifugaron a 1200 G durante 30 minutos. Los MCN y los MCP se obtuvieron en el fondo del tubo. Una pequeña alícuota se citocentrifugó y se tiñó con hematoxilina-Rubipy como se describió en el punto 4.3.3. determinándose la pureza, que fue superior al 95%.

5.3.3. Estudios microfluorométricos:

Los estudios microfluorométricos de los MCN y los MCP se realizaron en un microscopio Zeiss, equipado con un fotomultiplicador, tal como se detalló en el punto 4.3.6. Las fotografías de MCN y MCP fueron barridas y analizadas densitométricamente de acuerdo a lo explicado en el punto 4.3.8.

5.3.4. Análisis de imagen de MCN y MCP:

Un análisis más detallado para caracterizar los MCN y MCP fue realizado mediante la observación de MC teñidos con la secuencia hematoxilina de Mayer-Rubipy y el procesamiento y posterior análisis de la imagen obtenida con una video cámara blanco y negro (Sony CCD-iris SSC M370CE) acoplada al microscopio de fluorescencia, empleando una plaqueta digitalizadora Matrox PIP1024. El formato de la imagen digitalizada fue de 512 x 512 pixels para cada MCN y MCP (n=22) con niveles de grises que variaban entre 0 y 255. El procesamiento de las imagenes se realizó con el programa VISILOG 4 versión 1.3 instalado en una computadora personal (80486; 66 MHz; 16Mb RAM equipada con un coprocesador

aritmético). A partir de la imagen binaria obtenida mediante una función en la cual cualquier pixel con una intensidad de gris superior a un determinado nivel arbitrario (se seleccionó 43 para eliminar el basal de fluorescencia) es tomado como positivo y los niveles de gris inferiores como negativo, se estudiaron distintas características que mostraban diferencias entre MCN y MCP en el programa VISILOG. Los parámetros analizados fueron: a) área (número total de pixels de la imagen binaria); b) perímetro (número de pixels periféricos de la imagen binaria); c) factor forma (σ = perímetro^2 / 4 π área); d) número de Euler (número de pixels positivos unidos menos el número de pixels negativos).

5.3.5. Suspensión de células tumorales:

Las células tumorales se obtuvieron a partir del tumor extirpado de 2 a 4 ratones de 30 días de portación para el M3 y 40 días de portación para el MM3, tiempo equivalente a los 2/3 de sobrevida. La cápsula conectiva y las zonas necróticas se eliminaron en condiciones de esterilidad en ambos tumores los que se seccionaron en pequeños fragmentos que fueron tratados por agitación con pronasa al 0,01% y DNasa al 0,0035% en medio MEM (medio esencial mínimo Eagle) durante dos ciclos de 30 y 15 minutos a 37°C. Las células tumorales en suspensión se lavaron 3 veces en medio de cultivo. La viabilidad celular de los cultivos primarios se determinó por medio del test de exclusión con azul tripán, siendo ésta superior al 80% en todos los ensayos.

5.3.6. Cultivos celulares primarios:

Se sembraron 5 x 10^4 células tumorales en 500 µl de medio MEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-Glutamina (2 mM) y gentamicina (80 µg/ml) en cada uno de los 24 hoyos de cada caja de cultivo. Se incubaron durante 24 hs. en estufa gaseada con atmósfera húmeda de CO_2 a 37°C, para permitir la adherencia de las células a las placas de cultivo. Al cabo de este tiempo, las células adheridas se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y el medio se remplazó por medio fresco con SFB al 2 % con o sin MCN y MCP.

5.3.7. Modulación de la proliferación de células tumorales por MCN y MCP:

A cultivos de células tumorales en MEM con 2 % de SFB, se añadieron MCN o MCP purificados en distintas relaciones respecto del número de células tumorales (1:10 a 1:1).

Cultivos de células tumorales sin la adición de MC se consideraron controles. A las 48 hs, se lavaron los cultivos con PBS y se evaluó el crecimiento celular.

5.3.8. Evaluación del crecimiento celular:

La evaluación del crecimiento celular se realizó mediante la cuantificación del contenido proteico de la monocapa de cultivo, por el método de Lowry, de acuerdo con la técnica de Oyama-Eagle (1956). Debido a que algunas sustancias pueden modular la síntesis proteica sin afectar la tasa de duplicación celular, el contenido proteico se correlacionó con el contenido de ADN, medido como fue descripto previamente (Labarca & Paigen 1980) y por recuento del número de células. Tanto para las células tratadas como para las del control los parámetros medidos se correlacionaron completamente.

5.3.9. Evaluación de la incidencia tumoral:

Ratones Balb/C se dividieron en tres grupos. Los animales de grupo control se inocularon por vía subcutánea (s.c.) en el flanco con 100 µl de una suspensión conteniendo 3×10^5 células tumorales M3 o MM3. Los animales de los grupos experimentales recibieron el mismo número de células tumorales con el agregado de 3×10^4 MCN o MCP. Se realizaron palpaciones diarias para determinar la presencia del tumor y se consideró presencia tumoral o prendido cuando alcanzó un diámetro de 0,5 mm y continuó creciendo.

5.3.10. Análisis estadístico:

Las diferencias en el área, perímetro, factor forma, media de grises, así como los estudios de proliferación celular in vitro, se evaluaron empleando análisis de varianza (ANOVA). Para el número de Euler se empleó el test Mann Whitney y para la incidencia tumoral el test de X^2. En todos los casos se utilizó el programa de computación STAT-PRIMER, asumiendose diferencias significativas con $p<0,05$.

La intensidad de fluorescencia de los MC pudo cuantificarse mediante el análisis de imagen multiplicando la media de los niveles de gris para cada pixel del MC por el número total de pixels que ocupa (área). Empleando este método puede observarse que los MCP poseen un 37,6% de fluorescencia respecto de los MCN, lo que sugiere un menor contenido de grupos sulfato y consiguientemente una menor concentración de heparina por MC. Para poder observar en forma gráfica la diferencia en la emisión de los MCN y MCP, se seleccionó un MC de cada tipo, que poseían áreas similares. La imagen digitalizada y la representación de la intensidad de emisión por pixel se muestra en la figura 5.1.

Las diferencias en la intensidad de emisión son visualmente evidentes en el microscopio de fluorescencia y fueron también cuantificadas mediante análisis microfluorométricos y densitométricos de las fotos. En ambos estudios se observó que los MCP poseen menos de la mitad de la fluorescencia que los MCN (Figura 5.2.a y 5.2.b).

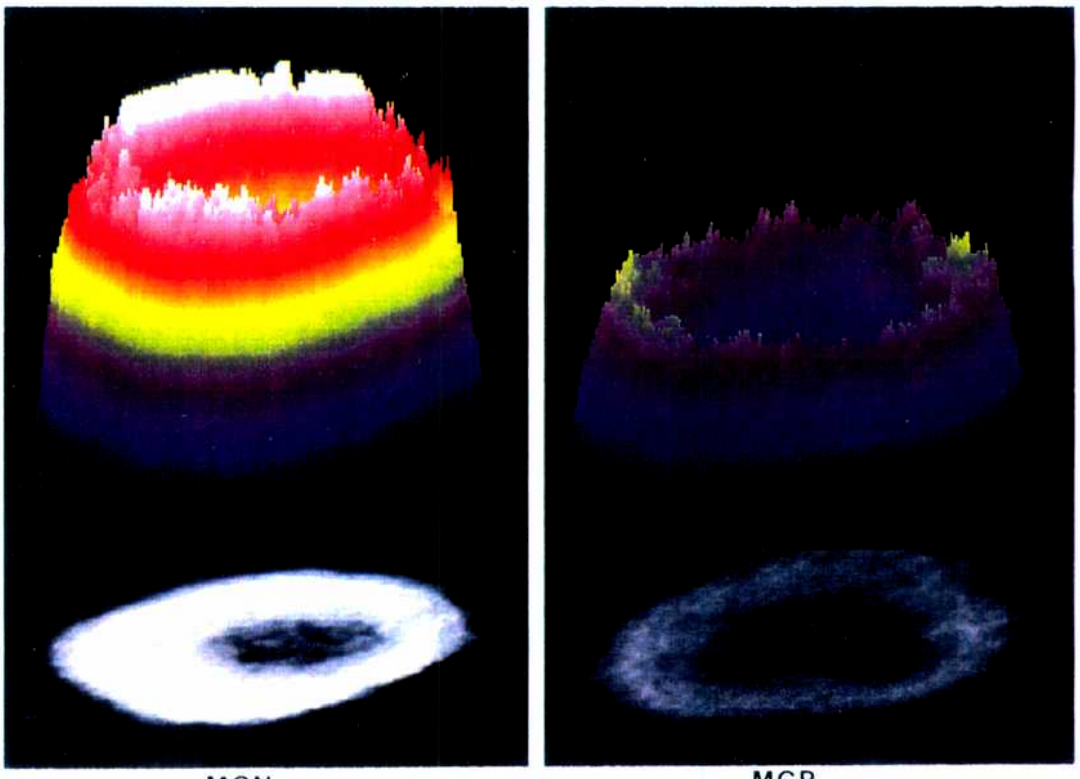
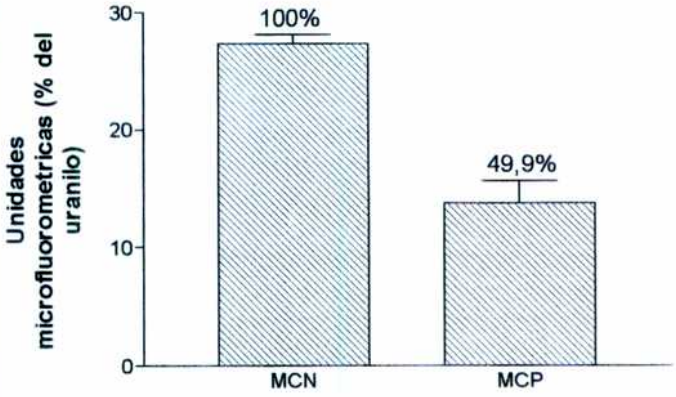
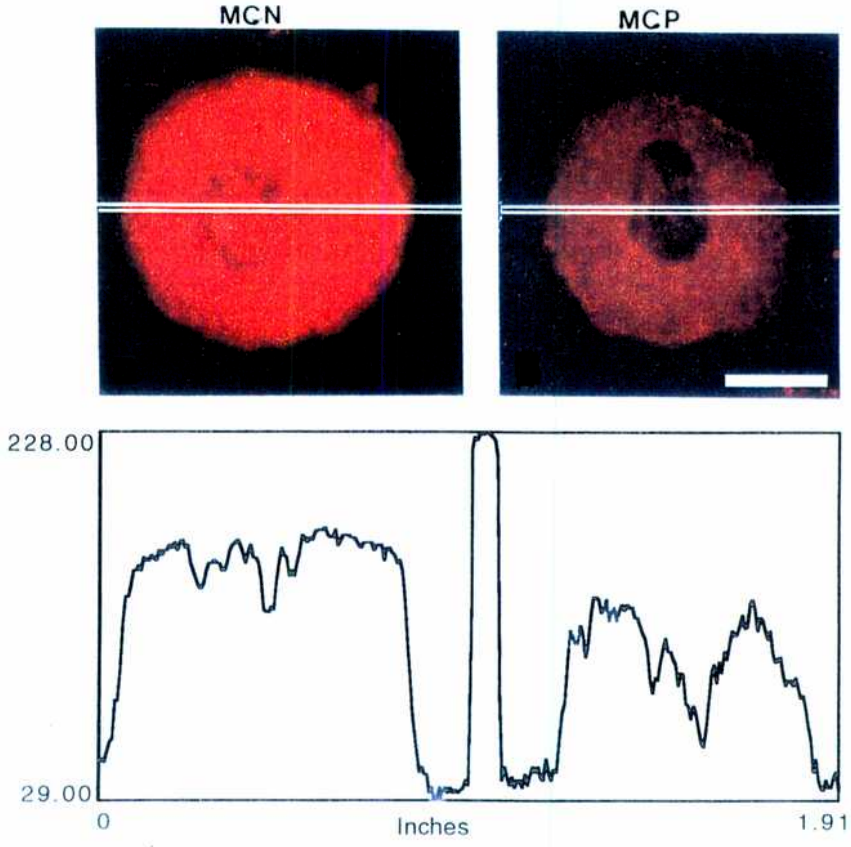


FIGURA 5.1. Imagen digitalizada de un MCN y un MCP con la correspondiente intensidad de gris (mostrado en colores) para cada uno de los pixels constituyentes de la célula

FIGURA 5.2.
a) Análisis microfluorométrico de MCN y MCP teñidos con la secuencia de tinción hematoxilina-Rubipy (25 µg/ml) La intensidad de fluorescencia se analizó con luz de excitación azul-violeta tomando la emisión del uranilo como 100 % (media ± DS; n=20). Sobre la barra se expresa la emisión porcentual del MCP respecto del MCN.
b) Microfotografía de fluorescencia de un MCN y un MCP con el correspondiente análisis densitométrico de las células.





5.4.2. Efectos de los MC sobre la proliferación de células tumorales in vitro.

Se investigó la acción de los MCN y de los MCP sobre el crecimiento in vitro de los adenocarcinomas M3 y MM3. Los MCN inhibieron significativamente el crecimiento de las células M3 en cultivo, mientras que no se observó modificación en el crecimiento de las células MM3 (Figura 5.3.). Por otro lado, los MCP no afectaron la proliferación celular de ninguno de los adenocarcinomas empleados.

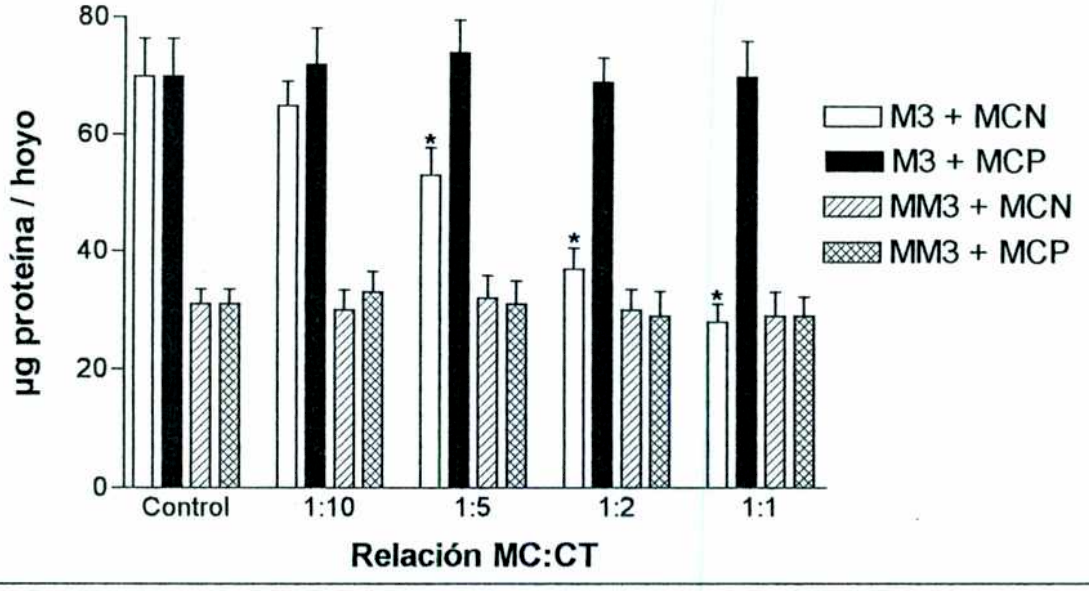


FIGURA 5.3. Efecto de los MCN y los MCP sobre la proliferación de las células M3 y MM3. Las células proliferaron en medio con 2 % de SFB en ausencia (Control) o en presencia de distintas relaciones de MC y células tumorales (CT) (1:10 a 1:1). Los resultados se expresan como el contenido proteico por hoyo (media ± DS; n=4). *$p<0,05$ vs cultivos sin MC.

5.4.3. Efecto de los MCN y los MCP sobre la incidencia y el crecimiento tumoral.

El estudio de las modificaciones de la tumorigenicidad del adenocarcinoma M3 cuando se inocula conjuntamente con MCN o MCP permitió observar que los MCN disminuyeron la incidencia tumoral en un 70% ($p<0,05$), mientras que los MCP no ejercieron acción inhibitoria alguna. No se observó una variación en la incidencia tumoral del adenocarcinoma MM3 ni en presencia de MCN ni de MCP (Tabla 5.2.).

TABLA 5.2. Efecto de los MCN y los MCP sobre la incidencia tumoral.

		CONTROL	MCN	MCP
CÉLULAS INOCULADAS	CT	3×10^5	3×10^5	3×10^5
	MC	----------	3×10^4	3×10^4
TIEMPO DE LATENCIA	M3	8/10 (80%)	3/3 (100%)	10/10 (100%)
	MM3	10/10 (100%)	5/10 (50%)	10/10 (100%)
INCIDENCIA TUMORAL	M3	10/10 (100%)	3/10 (30%) *	10/10 (100%)
	MM3	12/12 (100%)	10/12 (83%)	9/9 (100%)
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (mm/dia)	M3	0,209 ± 0,02	0,210 ± 0,02	0,220 ± 0,02
	MM3	0,163 ± 0,02	0,175 ± 0,02	0,167 ± 0,02

CT: Células tumorales.
Tiempo de Latencia: Número de animales con un tamaño tumoral de 0,5 mm el día 7 o el día 16 para el tumor M3 y el MM3 respectivamente y que continuaron creciendo.
*; $p<0,05$ vs control y MCP (test X^2).

Aunque los MCN disminuyeron la incidencia del tumor M3, la velocidad de crecimiento de los tumores que prendieron fue igual a la de los controles. Sin embargo, el tiempo de toma tumoral se retrasó 3 a 4 días respecto de los controles.

5.5. DISCUSIÓN.

Los estudios citoquímicos de MCN y MCP muestran que estos últimos poseen diferencias en el contenido de heparina y diferencias morfológicas.

Los MC peritumorales se encuentran activados y parcialmente degranulados (Lauría de Cidre & Sacerdote de Lustig 1990). Sin embargo, estas observaciones se realizaron en MC peritumorales y no en MC de cavidad peritoneal por lo que queda abierta la posibilidad de que factores solubles liberados por el tumor puedan activar directa o indirectamente a MC distantes.

Esta activación trae aparejada la pérdida de heparina, con los consiguientes cambios morfológicos asociados a la fusión de las membranas de los gránulos con la membrana plasmática, que se refleja en un aumento del perímetro y una disminución del área de los MCP respecto de los MCN.

El efecto de los MCN y los MCP fue diferente en el tumor M3 o MM3. Los estudios realizados in vitro, muestran que los MCN inhiben la proliferación de las células tumorales en el caso del adenocarcinoma M3 pero no en el MM3. En el mismo sentido, la inoculación conjunta de MCN y células tumorales, in vivo, disminuyó la incidencia tumoral solo del adenocarcinoma M3.

Si bien ambos son adenocarcinomas mamarios, el hecho de ser uno derivado de las metástasis pulmonares del otro, habla ya de diferencias entre ambos tumores, las que se corroboraron con estudios citogenéticos previos (Bal de Kier Joffé et al. 1983) en los que se observó que el MM3 tiene mayor homogeneidad en el número cromosómico y una moda diploide, mientras que el M3 tiene mayor heterogeneidad cromosómica y una moda tetraploide. La selección de aquellas células de mayor capacidad metastásica y de resistencia a los mecanismos de defensa del organismo, que originaron el MM3, explicaría las diferencias observadas en el comportamiento de ambos tumores con respecto a la incidencia tumoral, cuando son desafiados con MCN. Así el M3 de origen espontáneo en el tejido mamario de ratones Balb/C se manifiesta sensible al control ejercido por los MCN. Contrariamente, el tumor MM3 procedente de poblaciones celulares que lograron vencer los mecanismos de defensa "in situ" para metastatizar ya no son sensibles al mecanismo de control mediado por los MC.

Los MCP, que poseen menor contenido de heparina que los MCN, no ejercieron acción inhibitoria sobre el crecimiento in vitro e in vivo de ninguno de los tumores lo que se correlaciona con su menor contenido de heparina. La disminución en el contenido de heparina en los MCP parece ser consecuencia de la desgranulación de los mismos a causa del estímulo continuo que aporta el tumor.

Aunque resulta tentador pensar que las diferencias en el efecto ejercido por los MCN y los MCP son consecuencias del contenido de heparina, no debe olvidarse la existencia de otra gran variedad de mediadores como la serotonina (Fisher & Fisher 1965; Manda et al. 1988), el TNFα y diversas citoquinas (Galli 1993) que pueden modular el crecimiento tumoral y que no fueron analizados en este trabajo. Mas aún, como se verá en capítulos posteriores, las células MM3 son mas susceptibles al efecto antiproliferativo de la heparina y poseen un mayor número de receptores para ella que las M3, a pesar de ser insensibles al efecto antiproliferativo de los MC.

Además de la posible acción de otros mediadores distintos de la heparina, existen diversas proteasas presentes en los MC (por ejemplo la proteasa 1 de MC) que se almacenan y se liberan de los MC como complejo quimasa/ proteoglicano de heparina. En este caso, el GAG aumenta la actividad de la serino proteasa, aumenta su vida media y la protege de la inactivación producida por diversos inhibidores (Pejler & Berg 1995).

Es importante destacar que las células MM3 tienen una menor adhesión a sustrato y son de menor tamaño, lo que se refleja en las diferencias registradas en los microgramos de proteínas (figura 5.3.). Además, el tiempo de duplicación celular es mayor que para el M3 (Bal de Kier Joffé et al. 1983, 1986). El ensayo para determinar el efecto antiproliferativo de los MC, se realizó durante 48 hs y en ese lapso las células M3 casi cumplieron un ciclo de duplicación celular en 2 % de SFB (48-60 hs). Por el contrario, las células MM3 no, ya que necesitan 90 hs. La falta de inhibición de las células MM3 por los MCN podría adjudicarse a la necesidad de que el ciclo celular ocurra para que se manifieste el efecto. Sin embargo, éste no parecería ser el caso ya que los mismos resultados se observaron in vivo.

Nuestros resultados demuestran que los MCN están involucrados en el control del crecimiento del tumor M3. Resultados similares se observaron en modelos murinos (Fisher &

Fisher 1965; Burtin et al. 1985) y en neoplasias humanas como cáncer de mama (Fisher et al. 1985), cáncer de cuello uterino (Graham & Graham 1966), sarcoma de partes blandas (Ueda et al. 1988) en los que la presencia de MC peritumorales es signo de un pronóstico favorable.

Sin embargo Roche (1985) obtiene resultados contrarios. Tratando ratas con compuestos que inhiben la desgranulación de los MC, observó una disminución en el crecimiento de un fibrosarcoma inducido por 3 metilcolantreno. Dado que en estudios in vitro comprueba que este agente desgranulante evita la liberación de la heparina por parte de los MC, supone que este GAG es un agente mitogénico en su modelo tumoral. Del mismo modo, Dabbous y colaboradores (1991) experimentando con un adenocarcinoma mamario MTLn3 derivado de las metástasis pulmonares de otro tumor mamario, observó un crecimiento tumoral disminuido en ratas tratadas con un agente estabilizante de la desgranulación y un aumento con la suspensión del tratamiento. Frente a estos dos experimentos, no puede descartarse que metabolitos derivados de la droga, ejerzan in vivo una inhibición del crecimiento tumoral.

Nuestros resultados y otros realizados con la cepa W/W^v, deficientes congénicos en MC, que tienen disminuida la incidencia tumoral cuando se los transplanta con médula ósea de ratones congénicos normales (Tonooka et al. 1982), indican que los MC estarían involucrados en el control de la aparición o el crecimiento inicial del tumor no teniendo efecto en estadíos avanzados. Una pregunta por responder sería: ¿Es la heparina presente en los MCN responsable del efecto antiproliferativo de las células tumorales in vitro?

SECCIÓN III

HEPARINA Y CÉLULAS TUMORALES

PARTE EXPERIMENTAL

La heparina puede tener distintos efectos en cada una de las etapas del desarrollo tumoral. Sin embargo alguno de ellos pueden estar mediados por acciones directas, que implicarían un contacto de la heparina con las células tumorales, y otros ser consecuencia de acciones indirectas a través de efectos biológicos sistémicos (ej. coagulación).

En esta sección se presentan los estudios en los que el efecto biológico se asocia con una interacción heparina-célula.

En el capitulo 6 se describe el efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre el crecimiento in vitro de los dos adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3. En el capítulo siguiente (capítulo 7) se demuestra la presencia de receptores para heparina, encontrándose una correlación muy estrecha entre efecto antiproliferativo y la capacidad de las heparinas de unirse a los receptores.

Finalmente, en el capítulo 8, se describe el efecto de las heparinas sobre la adhesión de las células tumorales.

6. HEPARINA Y PROLIFERACIÓN CELULAR

6.1 INTRODUCCIÓN:

En el capítulo anterior, hemos observado que los MC de ratones portadores de tumor poseen un menor contenido de heparina que los MC de ratones normales. Además, la inoculación conjunta de MC normales y células tumorales disminuye la incidencia tumoral mientras que los MC de portador no poseen esta capacidad. Mas aún, los MC normales y no los de portador inhiben la proliferación de las células M3 in vitro.

Dado que la heparina es uno de los principales mediadores liberados por los MC y que podría ser el causante del efecto antiproliferativo, será objeto de estudio del presente capítulo, la acción que ejercen la heparina y las heparinas modificadas, sin actividad anticoagulante, sobre el crecimiento de las células tumorales in vitro.

La heparina inhibe el crecimiento de varios tipos celulares, tales como células musculares lisas (SMC) (Clowes & Karnovsky 1977; Castellot et al. 1981), células mesangiales (Castellot et al. 1985a), ciertos fibroblastos (Paul et al. 1980), células epiteliales (Wrigth et al. 1985; Wrigth & Karnovsky 1987) y queratinocitos de piel (Ristow & Messmer 1988). Sin embargo, hay poca información respecto del efecto de la heparina sobre células tumorales (Halper & Carter 1989).

La acción antiproliferativa de la heparina parece no ser un proceso generalizado, tal como lo demuestran los estudios en células endoteliales, donde potencia la proliferación (Terranova et al. 1985), u otros tipos celulares, donde no altera el crecimiento (Tiozzo et al. 1991).

La heparina puede actuar sobre el crecimiento celular de manera indirecta, modulando la acción de factores de crecimiento, o directamente sobre las células.

Varios factores de crecimiento poseen afinidad por la heparina (HBGF), por lo que se los ha clasificado de acuerdo a la afinidad y a su punto isoeléctrico en dos grandes grupos. El factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) pertenece a la familia de los HBGF de clase I y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) a la de clase II (Lobb et al. 1986).

La heparina tiene un efecto modulador sobre la acción de los FGF, regulando la unión a sus receptores de alta afinidad (Yayon et al. 1991), o protegiéndolos de la desnaturalización y la

hidrólisis enzimática (Rosengart et al. 1988). Dado que el FGF es un fuerte mitógeno de células endoteliales, estos datos podrían explicar el efecto potenciador que posee la heparina sobre ellas. Sin embargo, en otras células, la heparina actúa en forma distinta frente a otros factores de crecimiento ya que disminuye la unión del factor de crecimiento epitelial (EGF) a sus receptores en SMC (Reilly et al. 1987; 1988) y en queratinocitos impide la acción de su factor específico de crecimiento (Ristow & Messmer 1988).

Por otro lado, el efecto antiproliferativo de la heparina, en muchos casos se estudió sobre células que requieren SFB para su proliferación. De esta manera, la acción inhibitoria del crecimiento podría explicarse como consecuencia del secuestro de factores provenientes de suero que tienen afinidad por la heparina.

Existen evidencias que demuestran una acción directa de la heparina sobre el crecimiento celular. Se describió la presencia de receptores de heparina en células endoteliales (Glimelius et al. 1978), monocitos (Leung et al. 1989), células hepáticas (Kjellen et al. 1977), SMC (Castellot et al. 1985b), plaquetas (Gogstad et al. 1983; Horne & Hart 1986) y macrófagos (Bleiberg et al. 1983). También se describió la presencia de receptores de heparina en células tumorales, tal es el caso del melanoma B16 (Biswas 1988), y de dos rabdomiosarcomas (Redini et al. 1989).

La heparina inhibe la expresión de los oncogenes c-fos y c-myc en SMC (Wrigth et al. 1989; Pukac et al. 1990), actuando selectivamente en el camino metabólico dependiente de la proteína quinasa C (Wrigth et al. 1989; Castellot et al. 1989; Pukac et al 1992). Inhibe también la expresión de otros genes asociados con el ciclo celular (Reilly et al. 1989). En todos estos casos no se sabe si es consecuencia de una acción directa de la heparina sobre la célula, o mediada a través de la modulación de factores de crecimiento.

6.2 OBJETIVOS:

Las evidencias detalladas hasta aquí indicarían que la heparina tiene un rol regulatorio del crecimiento celular, pero los conocimientos que se tienen hasta el presente, no permiten generalizar su mecanismo de acción, el que parecería depender del modelo utilizado.

En algunos casos la heparina favorece la unión de factores de crecimiento a sus receptores específicos o modula su acción, y en otros casos puede unirse a sus propios receptores específicos. En ambos casos, parecería regular la expresión de genes asociados con el ciclo celular, ejerciendo su acción a través de segundos mensajeros.

Dado que la bibliografía sobre el efecto de la heparina y el mecanismo de acción en el crecimiento de células tumorales es escasa, se estudió:

1. La acción de la heparina sobre la proliferación de dos adenocarcinomas de diferente capacidad metastásica (M3 y MM3) in vitro y si su acción está mediada por factores de crecimiento.

2. Además, se estudió si el efecto sobre el crecimiento celular se relaciona con su actividad anticoagulante, con el objeto de seleccionar heparinas que careciendo de actividad anticoagulante, retengan su capacidad antiproliferativa.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS:

6.3.1. Tumores:

Se utilizaron los adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3

6.3.2. Suspensión de células tumorales y cultivos celulares primarios:

La suspensión de células tumorales y los cultivos primarios se realizaron tal como fue descripto en los puntos 5.3.5 y 5.3.6. respectivamente.

Las células tumorales se sembraron en placas de 24 hoyos en medio con 10 % de SFB para permitir la adhesión de las mismas. Al cabo de 24 horas, las monocapas se lavaron con PBS y se reemplazó el medio por medio fresco sin SFB o con SFB al 2 % (controles). Los hoyos considerados experimentales contenían además distintas concentraciones de heparina o heparinas modificadas químicamente (N-des; O-des; N-des N-Ac y O/N-des N-Ac) (20 o 200 µg/ml). Cada 48 hs se realizaron nuevos cambios de medio, manteniendo las condiciones anteriores.

6.3.3. Evaluación del crecimiento celular:

La evaluación del crecimiento celular se realizó de la manera descripta en el punto 5.3.8. mediante la cuantificación del contenido proteico (Oyama & Eagle 1956), la determinación del contenido de ADN (Labarca & Paigen 1980) y el recuento celular.

6.3.4. Extracción de factores de crecimiento del SFB:

Medio conteniendo 2% de SFB se dividió en dos alícuotas. Una alícuota control se guardó a 4°C y la otra se cromatografió en una columna de afinidad Heparina-Sepharosa CL-6B (1x20 cm.) previamente equilibrada con medio sin SFB, a un flujo de 16-18 ml/h.

6.3.5. Ensayos de reversibilidad de la acción de la heparina y N-des N-Ac:

Se realizaron dos procedimientos experimentales diferentes para determinar la reversibilidad del efecto antiproliferativo de la heparina.

a) Reversibilidad en presencia de distintas concentraciones de SFB a tiempos cortos: Se sembraron células M3 y MM3 en placas de 24 hoyos en medio suplementado con 10% de SFB durante 24 hs. para permitir la adhesión. Luego se cambió el medio por medio fresco con 2% de SFB con el agregado de 200 µg/ml de heparina, durante dos días. Transcurrido este tiempo, en el que ya se observó una inhibición del crecimiento, se lavaron las monocapas y se dividieron los

cultivos en cuatro grupos. Un grupo recibió medio con 2% de SFB y 200 μg/ml de heparina. En los tres grupos restantes se ensayó la reversibilidad del efecto antiproliferativo eliminando la droga y agregando medio con 2%, 5% y 10% de SFB. Las células se cultivaron durante 24 hs. adicionales y luego se evaluó el crecimiento celular. El grupo control del crecimiento celular recibió siempre medio con 2 % de SFB sin el agregado de heparina. El valor del contenido proteico de estos controles se consideró 100%. El mismo procedimiento se llevó a cabo con la heparina parcialmente N-des N-Ac.

b) Reversibilidad en presencia de 2 % de SFB a tiempos largos. Cultivos celulares de ambos tumores se trataron con heparina de la misma manera que en a), pero en este caso se ensayó la reversibilidad producida cuando solo se agrega al medio 2% de SFB. Se evaluó el crecimiento celular a distintos tiempos luego de eliminar la droga hasta un máximo de 5 días.

6.3.6. Ensayos de toxicidad:

El ensayo de citotoxicidad de la heparina sobre las células tumorales se realizó a partir de sendas suspensiones de células M3 y MM3 en medio suplementado con 2 % de SFB, a una concentración de 1 x 10^7 células/ml. Se marcaron alícuotas de 0,2 ml. de estas suspensiones con 20 μCi de cromato de sodio (^{51}Cr) durante 1 hora a 37°C. Al cabo de ese tiempo, las células se lavaron, resuspendieron y se sembraron en placas de 96 hoyos de fondo plano en una proporción de 1 x 10^4 células cada 0,15 ml, en presencia de 2, 20 y 200 μg/ml de heparina. Después de 4 hs de incubación a 37°C , los cultivos se centrifugaron y se midió la radioactividad en el sobrenadante y en el precipitado. La medida de liberación del ^{51}Cr en ensayos cuadruplicados se expresa como porcentaje de la radioactividad total. La liberación espontánea del ^{51}Cr fue siempre inferior al 20%.

6.3.7. Análisis estadísticos:

Se realizaron empleando los mismos análisis estadísticos que los descriptos en el punto 5.3.10.

6.4 RESULTADOS:

6.4.1. Acción de la heparina sobre el crecimiento tumoral in vitro.

En la figura 6.1 puede observarse como la heparina inhibe la proliferación de las células M3, de manera dosis dependiente. Este efecto se mantiene independientemente de que las células proliferen en ausencia o presencia de 2% de SFB.

Resultados similares se observaron con el adenocarcinoma de mayor capacidad metastásica MM3.

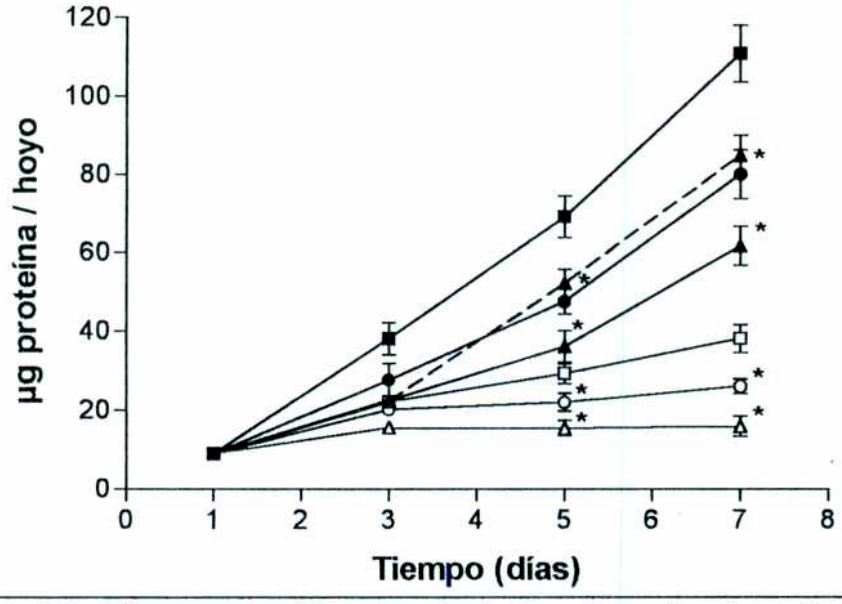


FIGURA 6.1: Efecto antiproliferativo de la heparina sobre las células M3. Las células M3 proliferaron en medio con 2% de SFB (■) suplementado con 20 (●) o 200 µg/ml (▲) de heparina o medio sin SFB (□) con 20 (○) o 200 µg/ml (Δ) de heparina. La línea punteada muestra el crecimiento de cultivos proliferando en 2 % de SFB después de eliminar la heparina (200 µg/ml). Los resultados se expresan como el contenido proteico por hoyo (media ± DS; n=4). *$p<0,05$ vs cultivos sin tratar con heparina.

En presencia de heparina a concentraciones de 200 µg/ml o menores, las células presentaron una apariencia similar a las del control, no observándose alteraciones morfológicas o de contacto. Estas observaciones fueron corroboradas por el ensayo de citotoxicidad con ^{51}Cr donde la liberación del isótopo radiactivo fue similar a la de los controles y nunca superó la liberación espontánea (< 20%).

6.4.2. Reversibilidad de la acción antiproliferativa de la heparina.

Con el objeto de corroborar que el efecto antiproliferativo de la heparina no es citotóxico sino citostático, se realizaron ensayos de reversibilidad con dos enfoques experimentales distintos:

a) *Reversibilidad producida por el estímulo de distintas concentraciones de SFB a tiempos cortos.*

La acción antiproliferativa de la heparina (200 μg/ml) se revirtió rápidamente (24 hs.) cuando el medio que contenía el GAG se reemplazó por medio nuevo suplementado con 5 o 10% de SFB ($p<0,05$) indicando que el efecto de la heparina es reversible (Figura 6.2).

b) Reversibilidad producida por el estímulo de 2% de SFB a lo largo del tiempo.

Cuando el medio conteniendo heparina, se remplazó por medio suplementado con 2% de SFB, el efecto inhibitorio del crecimiento, se revirtió en tiempos mas largos. Estos cultivos celulares proliferaron con el mismo tiempo de duplicación que las células sin tratamiento (Figura 6.1), sugiriendo que la heparina posee un efecto citostático y no citotóxico.

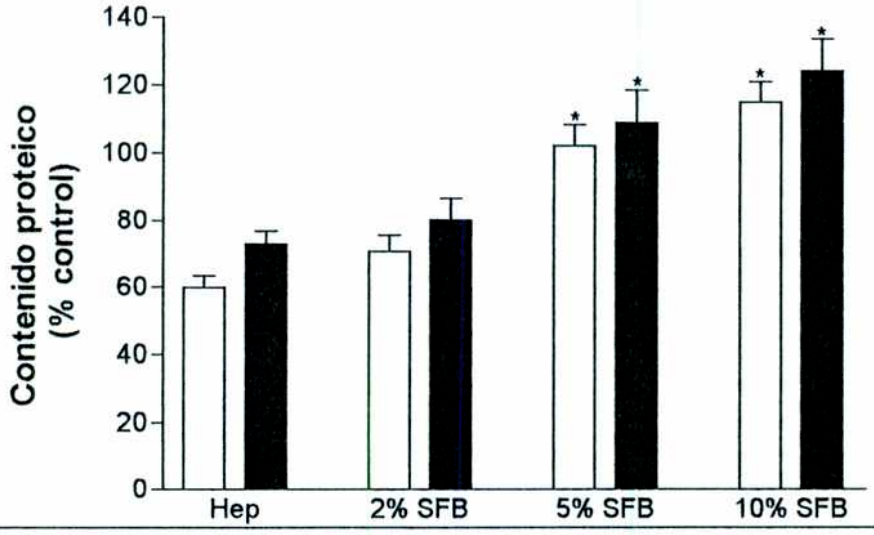


FIGURA 6.2: Reversibilidad del efecto antiproliferativo de la heparina (□) y heparina N-des N-Ac (■). Las células M3 proliferaron 2 días en medio con 2 % de SFB y los GAG (200 μg/ml) y un día adicional en medio con distintas concentraciones (2, 5, 10%) de SFB sin heparinas. Los resultados se expresan como el porcentaje del contenido proteico ± DS de células que proliferaron en medio con 2 % de SFB sin heparina (100%). * $p<0,05$ vs células tratadas.

6.4.3. Determinación de la acción inhibitoria de la heparina, en función de la presencia en el SFB de factores de crecimiento con afinidad por la heparina.

El suero posee una abundante cantidad de factores de crecimiento, muchos de los cuales podrían ejercer su acción moduladora a través de la heparina.

Para determinar la acción de los factores séricos con afinidad por la heparina sobre el crecimiento de las células tumorales, se realizó un experimento que consistió en la evaluación de la acción de la heparina sobre el crecimiento celular, en MEM con 2% de SFB, en MEM con 2% de SFB previamente cromatografiado en una columna de afinidad heparina-Sepharosa y en MEM sin SFB.

La eliminación por cromatografía de factores séricos de crecimiento con afinidad por la heparina, produjo una disminución del crecimiento celular del 18 % para el M3 y del 25 % para el MM3 respecto del medio con 2 % de SFB sin cromatografiar. La adición de heparina (200 µg/ml) al medio con SFB previamente cromatografiado, ejerció una inhibición adicional de la proliferación del 15 % para el M3 y del 17 % para el MM3, respecto de sus correspondientes controles ($p<0.05$) (Figura 6.3).

Tal como se demostró previamente, la heparina inhibió el crecimiento de las células M3 y MM3 tanto en presencia de 2 % de SFB (18 % y 23 % respectivamente) como en ausencia de SFB (23 y 30 % respectivamente).

Estos resultados demuestran que la heparina ejerce un efecto antiproliferativo *"per se"* que no sería consecuencia de una acción moduladora sobre los factores de crecimiento del SFB.

6.4.4. Acción de heparinas con distinta actividad anticoagulante sobre la proliferación celular.

El objetivo de este ensayo fue determinar si el efecto antiproliferativo de la heparina se correlaciona con su actividad anticoagulante. Para ello se utilizaron tres heparinas que difieren en su actividad anticoagulante (Hep 1: 210 UI/mg.; Hep 2: 173 UI/mg. y Hep 3: 12 UI/mg.).

En la figura 6.4, se observa que la inhibición fue dosis dependiente para las 3 heparinas: 40% para la dosis de 200 µg/ml, 20 % para la dosis de 20 µg/ml y menor al 10 % para las dosis de 2 y 0,2 µg/ml al quinto día de cultivo en presencia de 2% de SFB. No se observaron diferencias entre las distintas heparinas. En ausencia de SFB el efecto antiproliferativo de todas

las heparinas fue del 60-65% con concentraciones de 200 µg/ml. (Figura 6.4.b). Esto indica que la inhibición de la proliferación es independiente de la actividad anticoagulante.

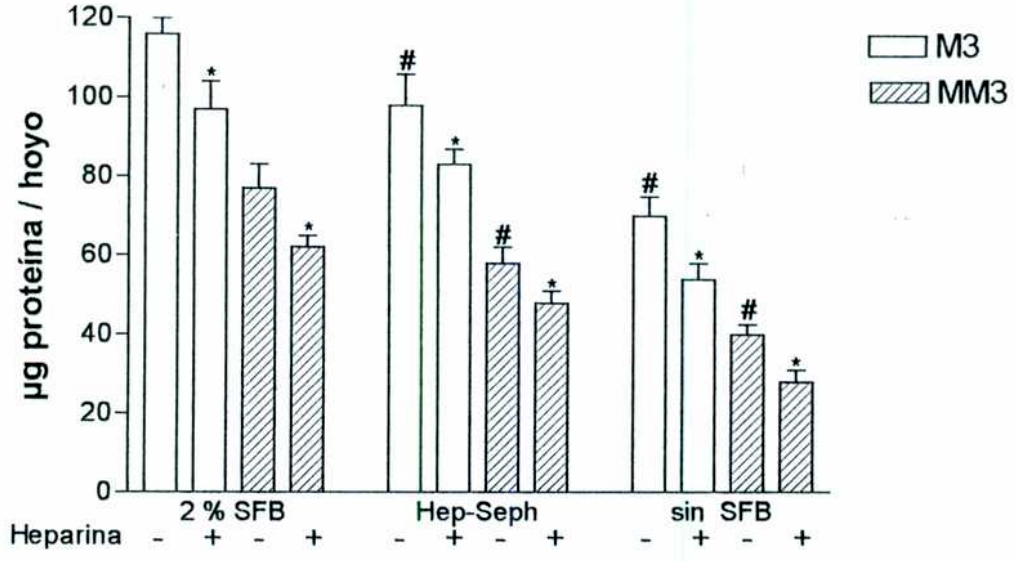


FIGURA 6.3: Efecto de la heparina en medio con SFB desprovisto de HBGF. Las células M3 y MM3 se cultivaron durante 3 días en medio con 2% de SFB, el mismo medio previamente cromatografiado en una columna de afinidad heparina-Sepharosa (Hep-Seph) o medio sin SFB, en presencia (+) o ausencia (-) de heparina (200 µg/ml) Los resultados se expresan como el contenido proteico por hoyo (media ± DS; n= 4). *p<0,05 respecto del control sin tratamiento. #p<0,05 respecto del medio con 2 % de SFB.

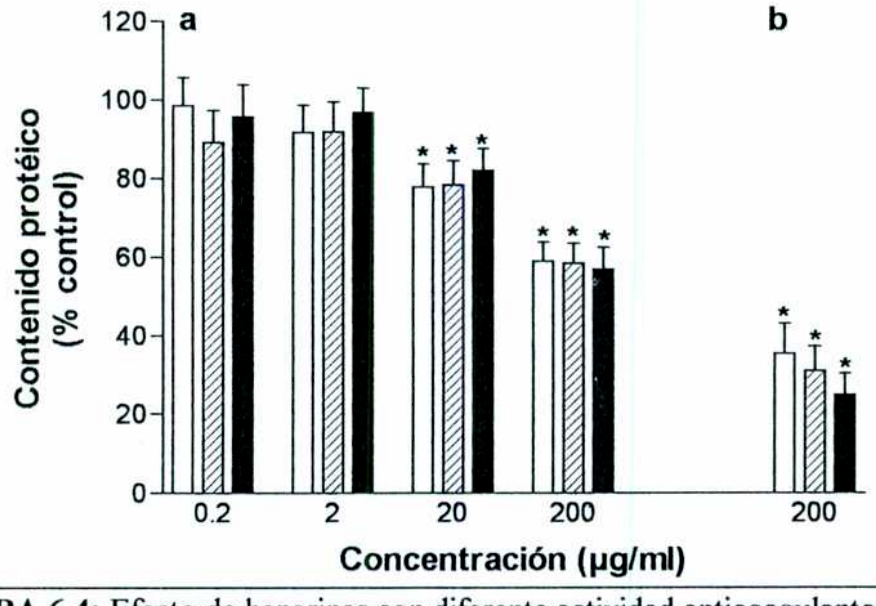


FIGURA 6.4: Efecto de heparinas con diferente actividad anticoagulante sobre la proliferación de células M3 al quinto día de cultivo. Las células proliferaron en medio sin (a) o con (b) 2% de SFB y distintas concentraciones (0,2; 2; 20 y 200 µg/ml) de heparina 1 (□), heparina 2 (□) y heparina 3 (■). Los resultados se expresan como el porcentaje del contenido proteico respecto del control sin tratamiento (media ± DS; n=4). *p<0,05.

6.4.5. Acción de heparinas químicamente modificadas sobre la proliferación celular.

Dado que la actividad anticoagulante de la heparina no está asociada con su efecto antiproliferativo, se ensayó el efecto que ejercen heparinas químicamente modificadas sobre la proliferación celular con el objeto de seleccionar alguna que retenga el efecto antiproliferativo y no posea actividad anticoagulante. Además, se intentó establecer que grupos funcionales de la molécula de heparina son responsables de la actividad antiproliferativa.

Tanto la heparina sin modificar como la heparina N-des N-Ac y el heparán sulfato inhibieron la proliferación de las células M3 en ausencia de SFB (Figura 6.5a). Cuando las células proliferaron en presencia de 2 % de SFB, la actividad antiproliferativa del heparán sulfato se perdió completamente. Sin embargo, la heparina N-desul N-Ac, perdió solo parcialmente esta actividad. (Figura 6.5b)

Todas la heparinas que fueron parcialmente O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) así como la heparina N-des, carecen de actividad antiproliferativa tanto en presencia como en ausencia de SFB.

Posteriormente se verificó que la inhibición de la proliferación celular ejercida por la heparina N-des N-Ac, al igual que la heparina, es dosis dependiente y reversible (Figura 6.2).

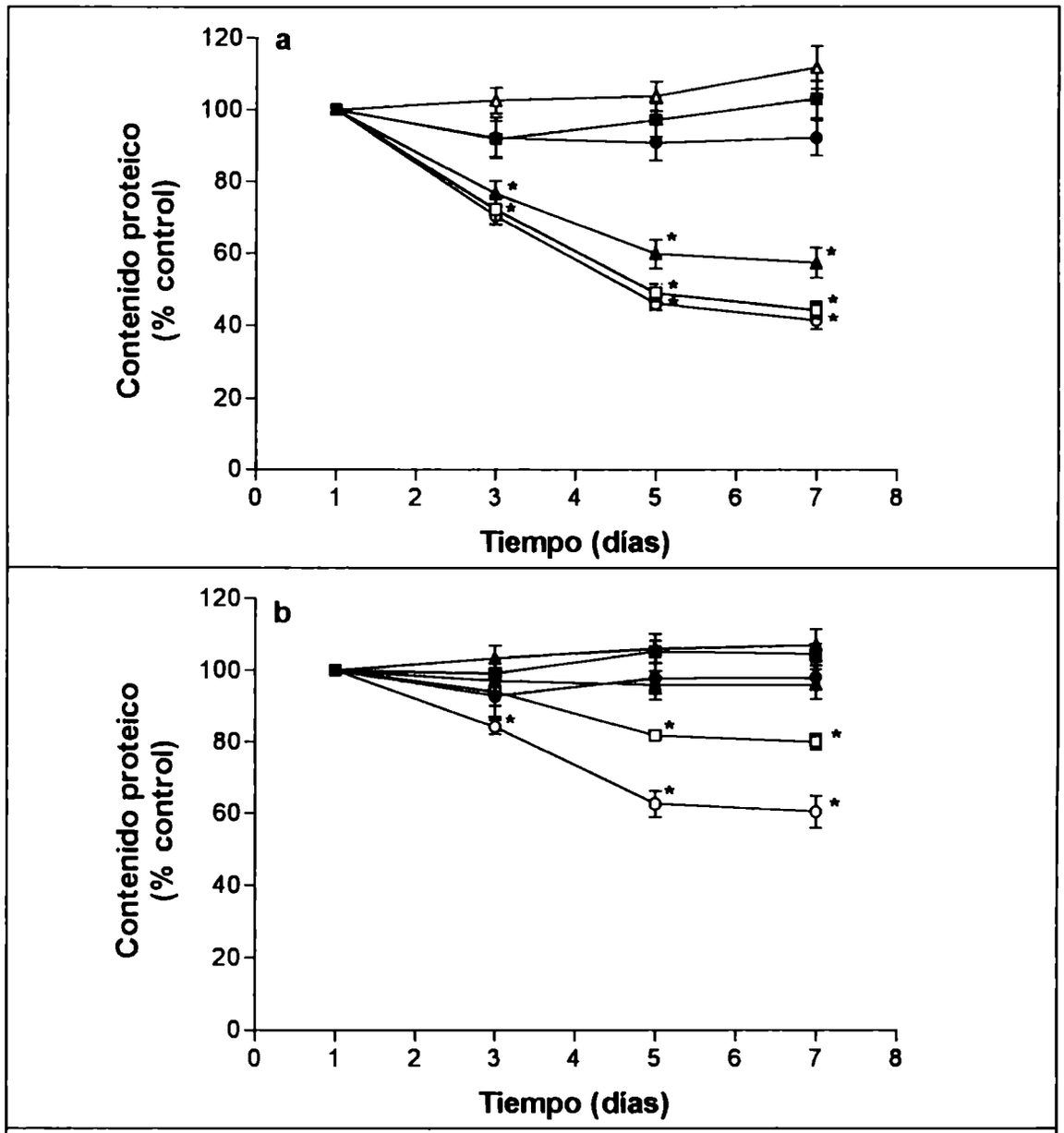


FIGURA 6.5: Efecto de heparinas químicamente modificadas en la proliferación de células M3 en medio sin (a) o con (b) 2 % de SFB suplementado con 200 μg/ml de heparina (○), heparina O-des (■), O/N-des N-Ac (Δ), N-des (●), N-des N-Ac (□) o heparán sulfato (▲). Los resultados se expresan como el contenido proteico respecto de células que proliferaron en medio sin heparina (100%) (media ± DS; n=4). *p<0,05.

6.5 DISCUSIÓN:

La heparina puede considerarse un inhibidor de la proliferación celular. Sin embargo, este efecto varía dependiendo del tipo celular.

En el presente capítulo se estudió la acción de la heparina en la modulación del crecimiento de dos tumores murinos de diferente capacidad metastásica. La heparina inhibió la proliferación celular de ambos tumores in vitro de manera dosis dependiente, reversible e independientemente de la actividad anticoagulante.

La inhibición ejercida por concentraciones que no provocaron alteraciones citológicas manifiestas al microscopio óptico ni en ensayos de citotoxicidad con ^{51}Cr, fue revertida por medio conteniendo 10% y 5% de SFB a las 24 hs. En medio con 2% de SFB, la reversión se obtuvo en tiempos más prolongados, posiblemente como consecuencia de que el tiempo de duplicación que poseen las células M3 y MM3 en esas condiciones es mayor. La reversibilidad del efecto antiproliferativo indica que la heparina ejerce un efecto citostático.

La acción antiproliferativa de la heparina fue menor en medio con 2% de SFB, que en medio previamente cromatografiado y menor aún que en medio carente de SFB. Este efecto puede explicarse como consecuencia de una acción contrapuesta entre la heparina (inhibitoria) y los factores de crecimiento del SFB (estimulatoria) que estarán en concentraciones decrecientes en medio con 2% de SFB, en medio cromatografiado y medio sin SFB, generando de esta manera una relación inversa entre efecto antiproliferativo de la heparina y la concentración de factores de crecimiento en las distintas condiciones. A pesar de ello, los resultados demuestran que la acción inhibitoria de la heparina no se debería a una acción de secuestro de factores de crecimiento del SFB que se unen a heparina, ya que se observa efecto antiproliferativo en ausencia de SFB y en SFB desprovisto de HBGF. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que las células M3 y MM3 produzcan y liberen factores de crecimiento autócrinos capaces de ser modulados por la heparina (Yayon & Klagsbrun 1990a; 1990b; Yamanishi et al. 1991).

En todos los experimentos el efecto antiproliferativo de la heparina (200 μg/ml) fue estadísticamente significativo ($p<0,05$) habiéndose comprobado que fue superior en el MM3 respecto del M3.

A pesar de haberse sembrado el mismo número de células (5 x 10^4 células/hoyo) en la figura 6.3, así como en la 5.3, puede observarse que el contenido proteico en los cultivos MM3 es menor que en los M3. Este punto, tal como se ha mencionado en el capítulo anterior, puede explicarse por tres motivos: 1) La adhesión a las placas de cultivo es menor en las células MM3 que en las M3 (Bal de Kier Joffé 1983); 2) Las células MM3 son de menor tamaño que las M3, y el contenido proteico por célula también es menor (1 μg de proteínas = 1300 células M3 y 1500 MM3) y 3) el tiempo de duplicación celular es mayor en las células MM3 que en las M3 (MM3 s/SFB=120-130 hs; MM3 2% SFB=90-100 hs; M3 s/SFB =90-96 hs; M3 2% SFB = 48-60 hs).

La acción antiproliferativa de la heparina no se relaciona con la actividad anticoagulante, a juzgar por el efecto inhibitorio similar que produjeron tres heparinas que diferían considerablemente en la actividad anticoagulante y que fue confirmado con el empleo de las heparinas modificadas.

El mínimo fragmento de heparina que retiene la actividad antiproliferativa sobre SMC es un hexasacárido (aproximadamente 2 KD) que casi no posee actividad anticoagulante (Castellot et al 1984). La heparina 3, utilizada en los ensayos descriptos en este capítulo, que posee un peso molecular promedio de 3 KD y una actividad anticoagulante de 12 UI/mg, conservó la actividad antiproliferativa.

Los estudios con heparinas modificadas químicamente muestran que los grupos O-sulfatos y N-sulfatos son importantes tanto para la actividad anticoagulante (Lindahl et al. 1980, 1983; Riesenfeld et al. 1981) como para la acción antiproliferativa pero por motivos diferentes. Las moléculas O-desulfatadas pierden las dos propiedades (anticoagulante y antiproliferativa). La N-desulfatación también produce heparinas que pierden ambas propiedades, posiblemente como consecuencia de la carga positiva que se genera, ya que la neutralización de dicha carga mediante una acetilación produce una molécula N-desulfatada N-acetilada que carece de actividad anticoagulante pero retiene parcialmente su efecto antiproliferativo. Así, mientras los grupos O-sulfatos son esenciales para ambas funciones, los N-sulfatos lo son solamente en la coagulación, pero no en su efecto inhibitorio del crecimiento.

El efecto antiproliferativo que ejercen los MC, tal como se discutió en el capítulo anterior, podría no deberse exclusivamente a la heparina. Otros mediadores podrían estar interviniendo, dado que la heparina inhibió el crecimiento de las células MM3 y éstas no fueron sensibles a la acción antiproliferativa de los MCN.

La heparina y la heparina modificada N-des N-Ac inhiben la proliferación de las células tumorales M3 y MM3 in vitro de manera dosis dependiente y reversible. El mecanismo de inhibición no esta mediado por la unión a factores de crecimiento del SFB. Sin embargo, la pregunta que aún requiere respuesta y se intentará contestar es: ¿El mecanismo de acción de la heparina es indirecto, a través de factores de crecimiento autócrinos o interactúa directamente con las células, por ejemplo a través de receptores específicos?

7. RECEPTORES PARA HEPARINA E INTERNALIZACIÓN

7.1. INTRODUCCIÓN.

La heparina inhibe la proliferación de ciertas células normales y células tumorales tales como el sarcoma humano SW13 (Halper & Carter, 1989) y los adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3, objeto de este estudio.

Se describió la presencia de receptores para heparina en células normales endoteliales (Glimelius et al. 1978), monocitos (Leung et al. 1989), células hepáticas (Kjellen et al. 1977), SMC (Castellot et al. 1985b), plaquetas (Gogstad et al. 1983; Horne & Hart 1986) y macrófagos (Bleiberg et al. 1983) y en células tumorales, en el melanoma B16 (Biswas 1988) y en dos rabdomiosarcomas (Redini et al. 1989).

Las características químicas de los receptores varían entre las distintas células y parece depender de la estirpe celular aunque en la mayoría de los casos no se conocen con claridad. La función biológica que se les adjudica es, en muchos casos, especulativa. En macrófagos, monocitos y linfocitos se ha sugerido que los receptores para heparina podrían estar asociados a procesos migratorios y de extravasación, mientras que en plaquetas participarían en los procesos de agregación.

Hasta el presente se sabe que entre las células que presentan receptores para heparina, solamente las SMC son inhibidas por este glicosaminoglicano (Castellot et al 1984;1985; Redini et al 1989). Mas aún, la heparina inhibe la expresión de los oncogenes c-fos y c-myc (Wrigth et al. 1989; Pukac et al. 1990), actuando selectivamente en el camino metabólico dependiente de la proteína quinasa C (Wrigth et al 1989; Castellot et al 1989; Pukac et al 1992). Inhibe también la expresión de otros genes asociados con el ciclo celular (Reilly et al. 1989).

Una asociación entre efecto antiproliferativo y unión de la heparina a receptores específicos fue sugerida recientemente por Bârzu y colaboradores (1994) quienes emplearon la heparina como un factor de presión de selección para obtener un cultivo de SMC resistentes al efecto antiproliferativo y observaron que estas células unen 10 veces menos heparina que las células parentales.

No se sabe si este mecanismo opera en células tumorales, pero de ser así, la selección de heparinas con efecto antiproliferativo tendría que estar dirigido a su potencial capacidad para unirse a los receptores.

7.2. OBJETIVOS.

El objetivo de este capítulo es comprender el mecanismo por el cual la heparina ejerce su acción inhibitoria en nuestro modelo tumoral. Por lo tanto se estudió:

1. La presencia de receptores para heparina en la membrana plasmática de células M3 y MM3.

2. La correlación entre la actividad inhibitoria de la proliferación y la unión a los receptores.

7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.3.1. Suspensión celular y cultivos primarios:

Se obtuvieron suspensiones celulares de los tumores M3 y MM3 y se realizaron los cultivos primarios según se describió en los punto 5.3.5. y 5.3.6.

7.3.2. Estudios de receptores para ^{3}H-heparina:

Se determinó la presencia, afinidad y número de receptores para heparina en células M3 y MM3, mediante ensayos de unión y empleando heparina marcada con tritio (^{3}H-heparina) (AE=0,57 mCi/mg). Los datos se evaluaron por el análisis de Scatchard.

Los ensayos de unión se realizaron en cultivos de células M3 o MM3 que alcanzaron un 70-80 % de confluencia. Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y continuaron en cultivo otras 24 h en medio sin SFB a menos que se especifique expresamente lo contrario. Luego las células se lavaron con PBS y se incubaron con ^{3}H-heparina en PBS (120 µl/hoyo) a 4 °C.

Se lavó cada hoyo tres veces con PBS a 4 °C agregando luego 100 µl de NaOH 0,2 N durante 30 minutos y neutralizando con HCl 2 N. Se recogió el contenido de cada hoyo y se añadió 2 ml de solución de Bray, determinándose la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La heparina libre se calculó como la diferencia entre la heparina total añadida a los cultivos celulares y la heparina unida. La determinación de la unión inespecífica de la heparina se realizó mediante la medición de la ^{3}H-heparina unida en presencia de 100 veces de exceso molar de heparina fría. Se expusieron hoyos sin células a ^{3}H-heparina y la unión al plástico (<5%) fue considerada basal y sustraída de los datos experimentales. En hoyos paralelos se determinó el contenido proteico de las monocapas celulares, convirtiéndose los datos a número de células, por la siguiente relación: 1 µg de proteína = 1300 células M3 = 1500 células MM3.

a) Ensayos de unión en función del tiempo: Se realizaron en presencia de un exceso de ^{3}H-heparina (2 x 10^6 cpm/hoyo) con el objeto de saturar los receptores y establecer el tiempo en el cual se alcanza el equilibrio de la unión de la ^{3}H-heparina a sus receptores.

b) Ensayo de máxima capacidad de unión (MCU): Se realizaron para determinar la capacidad de la ^{3}H-heparina para unirse a las células. Para esto, se cultivaron células desde 1x10^4 a 1x10^5 células/hoyo. Luego de 3-4 días de cultivo, cuando los hoyos con el de mayor

número de células alcanzó un 70-80 % de confluencia, se cambió el medio por medio sin SFB. A las 24 hs, se realizó el ensayo de unión por el agregado de $3x10^5$ cpm/hoyo de ^{3}H-heparina, durante 30 minutos a 4 °C.

c) Determinación del número y la afinidad de los receptores para ^{3}H-heparina: Se realizaron ensayos de unión a monocapas semiconfluentes añadiendo cantidades variables de ^{3}H-heparina durante 30 minutos a 4 °C. Se determinó el número de receptores por célula y su afinidad utilizando el análisis de Scatchard.

d) Estudios de competencia con heparinas modificadas químicamente: Se realizaron ensayos de unión añadiendo ^{3}H-heparina (2 x 10^5 cpm/hoyo) en presencia de cantidades variables de heparina o heparinas modificadas químicamente durante 30 minutos a 4 °C.

Todas los experimentos se realizaron como mínimo tres veces .Las mediciones se realizaron en tres hoyos como mínimo y los desvíos standard fueron menores al 7 % de la media.

7.3.3. Inhibición y reversibilidad del crecimiento de células M3 por heparina y N-des N-Ac marcadas con isotiocianato de fluoresceina:

La determinación del efecto de la heparina marcada con isotiocianato de fluoresceina (FITC) y la heparina N-des N-Ac FITC (200 µg/ml) (Syntex, Bs. As. Argentina) sobre el crecimiento de las células M3 y la reversión de dicho efecto se realizó tal como se describió en el capitulo anterior para heparina (6.3.3. y 6.3.5.).

7.3.4. Internalización de la heparina-FITC y la heparina N-des N-Ac-FITC:

Cultivos primarios de células M3 y MM3 crecidos durante 24 hs en medio sin SFB, se trataron con heparina FITC o N-desul N-Ac FITC (25 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS, y se cultivaron en medio sin GAGs durante 6 hs adicionales a 37 °C en atmósfera de 5 % CO_2-aire. Luego se lavaron con PBS y se montaron con glicerol-PBS 90 % a pH 7,4.

Los preparados se observaron antes de las 2 horas en un microscopio de fluorescencia Axioplan Zeiss.

7.4. RESULTADOS.

7.4.1. Unión de la ^{3}H-heparina a células M3 y MM3.

Se estudió la presencia de receptores específicos para heparina en células M3 y MM3.

La unión de la ^{3}H-heparina alcanzó el estado de equilibrio después de 30 minutos en ambos tipos celulares (Figura 7.1.). Las células MM3 unieron dos veces mas heparina que las M3.

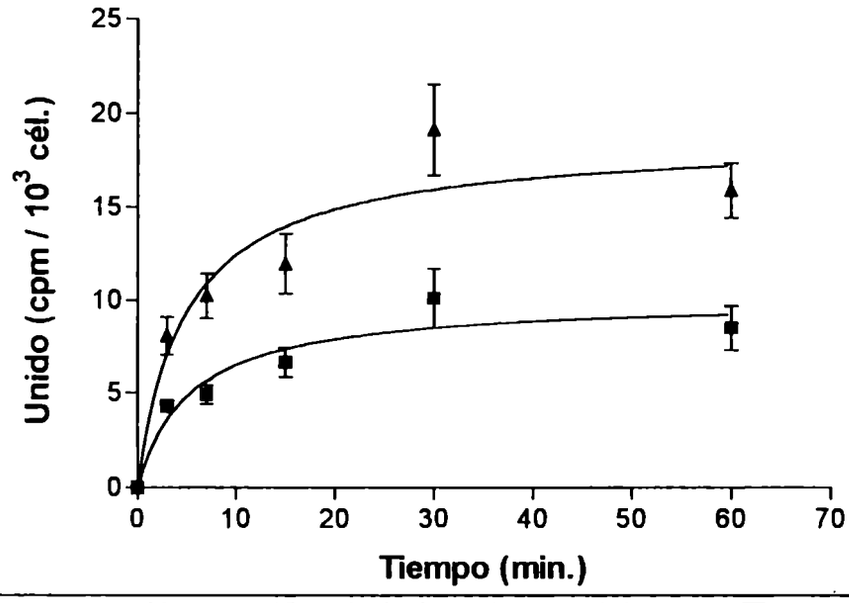


FIGURA 7.1. Unión específica de la heparina a células M3 (■) y MM3 (▲) en función del tiempo. Monocapas celulares subconfluentes que crecieron las últimas 24 horas en ausencia de suero, se incubaron con ^{3}H- heparina (2 x 10^6 cpm/hoyo, 4,4 µg/hoyo) a 4 °C durante distintos tiempos. Las células se lavaron 4 veces con PBS frío y se procesaron para la cuantificación de la radioactividad (media ± DS; n=3).

La unión específica de la heparina a las células fue directamente proporcional al número de células, alcanzándose la saturación con concentraciones de 2 x 10^5 células por hoyo (Figura 7.2.). Se empleó el análisis 1/unido vs 1/número de células para determinar la máxima capacidad de unión (MCU) de la ^{3}H-heparina (Figura 7.2. interior) la que fue solamente del 1 % de la heparina total empleada. Sin embargo, el 90 % de la ^{3}H-heparina unida se desplazó con 100 veces de exceso molar de heparina fría (Ver figura 7.5.). Se obtuvieron valores similares de MCU empleando las células MM3.

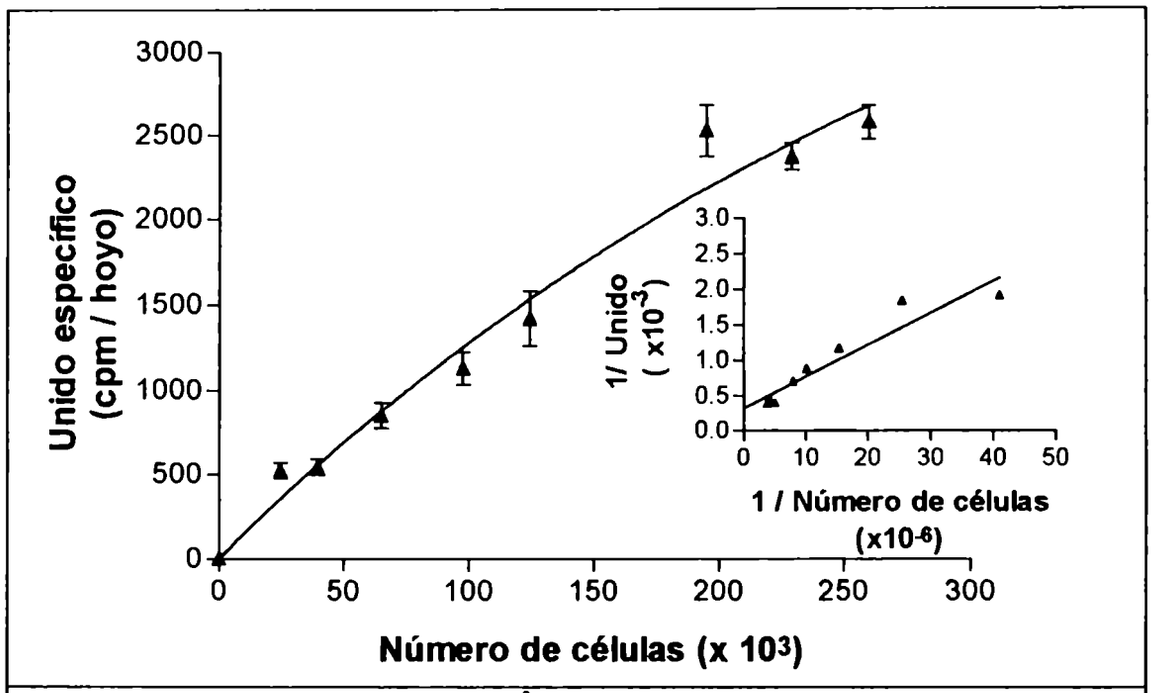


FIGURA 7.2. Unión específica de la ^{3}H-heparina a distinta cantidad de células M3. Cultivos de células M3 con distinto grado de crecimiento, se expusieron a ^{3}Hheparina (3 x 10^5 cpm/hoyo) durante 30 minutos a 4 °C. La unión inespecífica con 100 veces molar de heparina fría se restó de los datos experimentales.
Interior = Análisis de las inversas (1/unido vs. 1/número de células). La línea representa el análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos.
Y = 0,044321 X + 0,353862, r = 0,886.

Se realizaron curvas de saturación para ^{3}H-heparina en cultivos sufconfluentes de células M3 y MM3 (Figura 7.3.). El número de receptores por célula y la afinidad, se calculó empleando el análisis de Scatchard (Figura 7.3. interior). Las células MM3 poseen 2 veces mas receptores por célula que las M3 [(11 ± 1) x 10^5 vs (6,9 ± 0,6) x 10^5] con constantes de disociación similares (Kd= 2-4 x 10^{-9} M). Por lo tanto, la mayor cantidad de heparina unida a los cultivos de células MM3 que a los de M3, en la curva en función del tiempo se debe a un mayor número de receptores y no a un cambio en la afinidad.

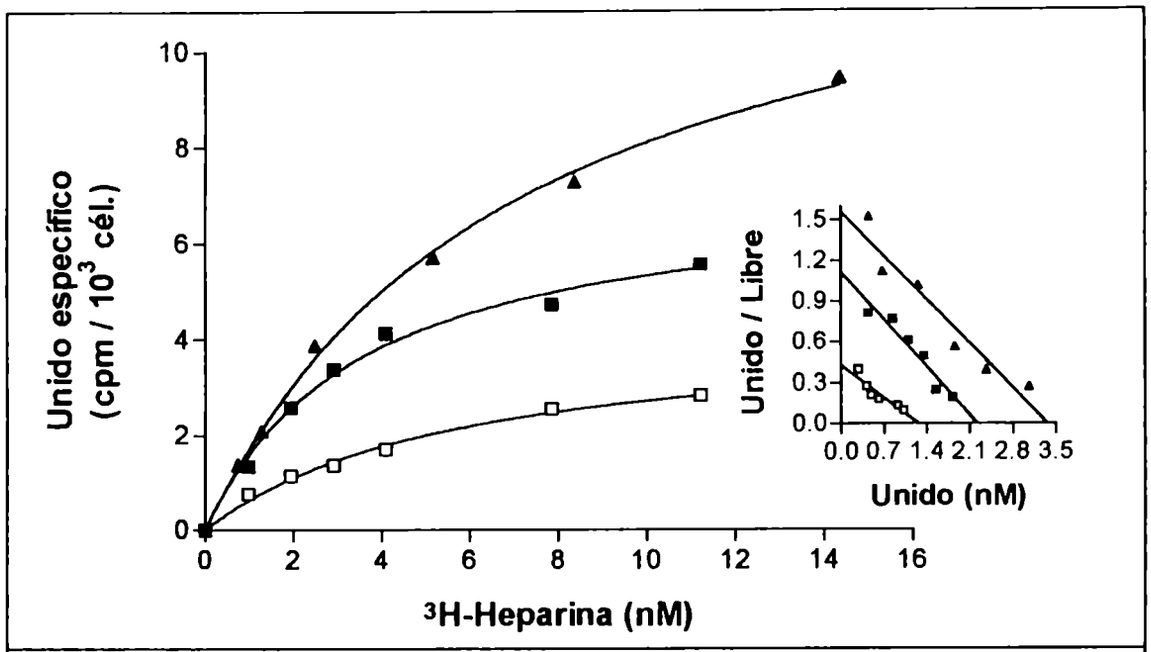


FIGURA 7.3. Unión específica de la ^{3}H-heparina a células MM3 (▲) o M3 crecidas durante 24 hs en ausencia (■) o presencia (□) de 2 % de SFB. Cultivos subconfluentes de células M3 se incubaron con concentraciones crecientes de ^{3}H-heparina durante 30 minutos a 4 °C.
Interior: Análisis de Scatchard de la unión de ^{3}H-heparina a células. Las líneas representan el análisis de la regresión lineal por cuadrados mínimos.
MM3 s/SFB Y= -0,46 X + 1,55, r=0,92; M3 s/SFB: Y= -0,34 X + 0,43, r=0,85; M3 c/SFB: Y= -0,50 X + 1.11, r=0,93

7.4.2. Número de receptores de ^{3}H-heparina y tiempo de duplicación celular.

En ausencia de SFB el tiempo de duplicación celular es de 90-100 hs para las células M3 y de 120-130 hs para las MM3. Las diferencias en la expresión del número de receptores para heparina podría relacionarse cone el tiempo de duplicación celular y no con la capacidad metastásica. Además, el efecto antiproliferativo de la heparina, es mayor en las células MM3 que en las M3.

Dado que la heparina ejerce un efecto antiproliferativo mayor cuando las células crecen en ausencia de SFB que cuando lo hacen en presencia de 2% de SFB, se determinó el número de receptores y la afinidad en células M3 que proliferaron las últimas 24 hs en ambas condiciones. Se observó que en ausencia de SFB el número de receptores es mayor [(6,9 ± 0,6) x 10^5 sitios/célula] que en presencia de 2 % de SFB [(3,5 ± 0,4) x 10^5 sitios/célula] mientras que la afinidad fue similar en ambos casos (Figura 7.3.) y se unió aún menos heparina cuando las células proliferaron en presencia de 5 % de SFB las últimas 24 hs (Figura 7.4.).

La disminución en el número de receptores determinados cuando las células proliferaron en presencia de SFB podría explicarse como un proceso de saturación de los receptores por GAGs séricos. Sin embargo, se unió la misma cantidad de ^{3}H-heparina a células M3 que proliferaron 24 hs en ausencia de SFB que aquellas que proliferaron en identicas condiciones pero fueron preicubadas durante 30 minutos en presencia de 2% de SFB antes de realizar el ensayo de unión (Figura 7.4.). Esto sugiere que la disminución de la unión de la heparina a las células que crecen en presencia de SFB, se debe a una disminución real del número de receptores y no a un bloqueo por factores séricos.

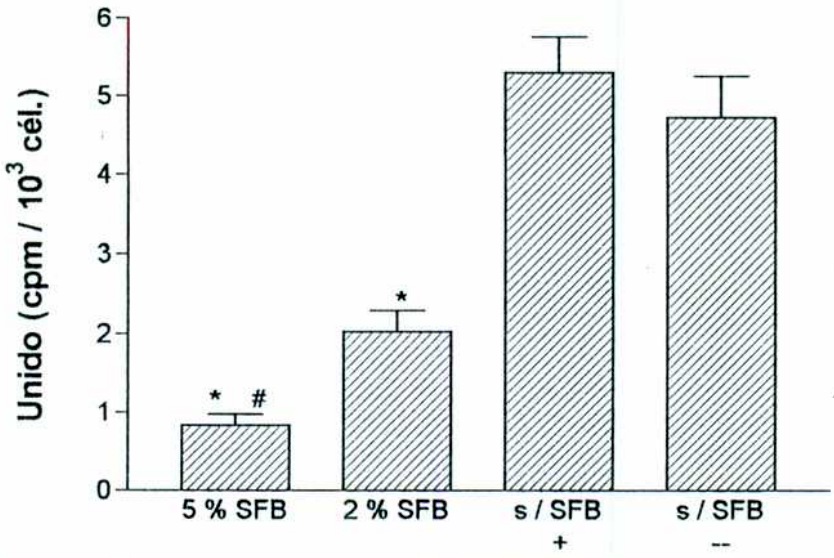


FIGURA 7.4. Unión específica de la heparina a células M3 que proliferaron las últimas 24 hs en medio con 5% (5% SFB) 2% (2% SFB) o sin SFB (s/SFB) preincubadas 30 minutos a 4 °C en medio con (+) o sin (-) SFB antes del ensayo de unión. Los cultivos fueron expuestos a 1 x 10^6 cpm/hoyo de ^{3}H-heparina durante 30 minutos a 4°C.*, $p<0,05$ vs s/SFB. #, $p<0,05$ vs 2% SFB.

7.4.3. Relación entre actividad antiproliferativa y el desplazamiento de la ^{3}H-heparina por la heparina y las heparinas modificadas.

Con el objeto de establecer si el efecto antiproliferativo de la heparina y las heparinas químicamente modificadas se relaciona con la capacidad de unirse a los receptores específicos, se realizaron ensayos de unión en presencia de concentraciones crecientes de los distintos GAGs (Figura 7.5)

El 50 % de desplazamiento con heparina se observó con una relación molar de heparina fría: heparina marcada de 2,2 lo que sugiere que las características de unión de la ^{3}H-heparina

son muy similares a la de la heparina comercial empleada (Figura 7.5.). La unión disminuyó mas del 90% con 100 veces de exceso molar de heparina fría, mientras que las heparinas modificadas que no tienen efecto antiproliferativo (O-des, N-des, O/N-des N-Ac) no compitieron por la unión de la ^{3}H-heparina a los receptores.

La heparina N-des N-Ac que inhibe parcialmente la proliferación celular, desplazó parcialmente la unión de la ^{3}H-heparina (60% con 100 veces de exceso molar). El 50 % de desplazamiento de la unión de la heparina marcada se observó con 17 veces de exceso molar de la heparina N-des N-Ac sugiriendo que es un agonista parcial con 8 veces menos afinidad que la heparina sin modificar.

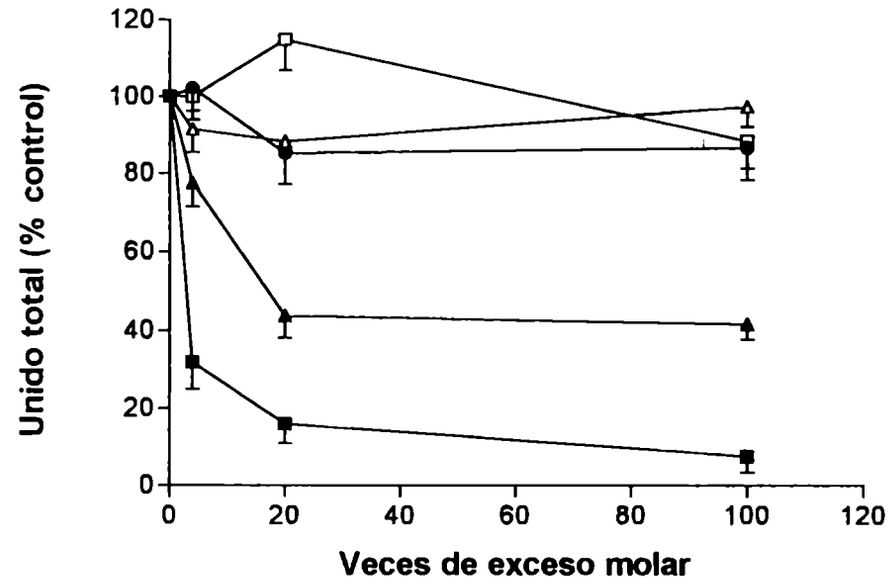


FIGURA 7.5. Inhibición de la unión de la ^{3}H-heparina a células M3 por la heparina y heparinas modificadas químicamente. Células M3 se incubaron con ^{3}H-heparina (2x 10^5 cpm/hoyo) en presencia de distintas concentraciones de heparina no marcada (■); O-des (●); N-des (Δ); N-des N-Ac (▲) y O/N-des N-Ac (□) durante 30 minutos a 4 °C. La heparina unida en ausencia de los glicosaminoglicanos se consideró 100 %. (media ± DS; n=3)

7.4.4. Internalización de la heparina y la heparina N-des N-Ac.

Se estudió la capacidad de internalización de la heparina y N-des N-Ac empleando los GAGs marcados con FITC. Previamente, se determinó si las heparinas fluorescentes poseían el mismo efecto antiproliferativo y si este era reversible, al igual que lo observado anteriormente con las heparinas sin marcar. La figura 7.6. muestra que ambas heparinas-FITC poseen la misma

acción inhibitoria que las heparinas correspondientes y su acción es reversible, sugiriendo que el efecto generado en todos los casos es citostático mas que citotóxico.

Se observó fluorescencia en la membrana plasmática y en pequeñas vesículas citoplasmáticas y/o perinucleares de las células M3 y MM3 cuando se trataron con heparina-FITC o N-des N-Ac FITC durante 30 minutos a 4°C en cultivos celulares que habían permanecido 24 hs en medio s/SFB, cuando estos cultivos se lavaron y se mantuvieron 6 hs en medio s SFB, a 37°C (Figura 7.7.).

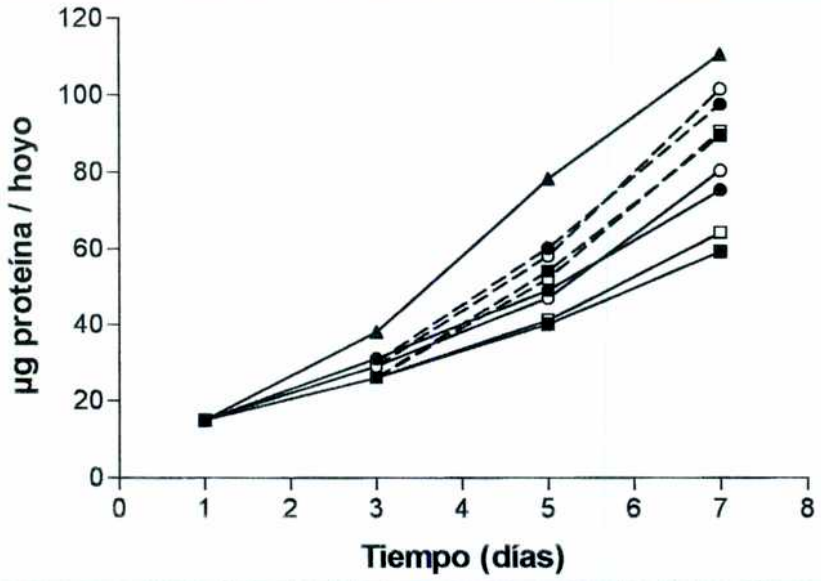
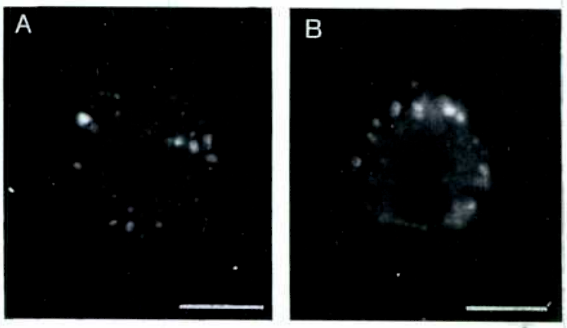


FIGURA 7.6. Efecto antiproliferativo y reversibilidad de la heparina FITC y la heparina N-des N-Ac-FITC. Células M3 fueron plaqueadas en medio con 10 % de SFB y 24 hs después en medio con 2% de SFB sin (▲) o con 200 µg/ml de heparina (■), heparina FITC (□), N-des N-Ac (●) o N-des N-Ac-FITC (○). Las lineas punteadas representan el crecimiento de cultivos donde el medio con GAGs se remplazó por medio con 2% de SFB sin GAGs. Los datos representan la media de 4 hoyos. El DS fue menor al 10 % de su correspondiente promedio.

FIGURA 7.7. Internalización de la heparina-FITC y N-desul N-Ac-FITC. Cultivos de células MM3 que crecieron las últimas 24 hs en ausencia de SFB se expusieron a heparina FITC (**A**) o a N-des N-Ac FITC (**B**) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron y permanecieron en medio sin SFB otras 6 hs adicionales. Luego se fijaron y se observaron en microscopía de fluorescencia. Barra=10µm.



7.5. DISCUSIÓN.

La heparina se une a las células M3 y MM3 de manera específica, saturable, dependiente del tiempo y ejerce un efecto inhibitorio sobre su crecimiento, sugiriendo una interacción de tipo ligando-receptor en la membrana plasmática.

Una muy baja proporción de la ^{3}H-heparina (1 %) puede unirse a la las células, lo que resulta inferior a la reportada por otros autores (Castellot et al 1985b; Biswas 1988; Leung et al 1989). Sin embargo los estudios de competencia mostraron que el 50 % de inhibición en la unión se obtiene con una relación heparina fría / heparina marcada de 2,2 , indicando que la heparina fría utilizada en estos ensayos era similar a la marcada, en cuanto a la afinidad por los receptores celulares.

La heparina es heterogénea y variable en su estructura molecular. Como consecuencia de la alta heterogeneidad, en un lote comercial, solo una pequeña parte de ella posee los grupos químicos adecuados que le confieren afinidad por la ATIII y una alta actividad anticoagulante. De manera análoga a lo que ocurre en la interacción heparina-ATIII, la unión heparina-receptor parecería ocurrir en una pequeña proporción de las moléculas presentes y requiere grupos químicos específicos, de acuerdo a lo que muestra el estudio de competencia con las heparinas modificadas.

La pregunta que intentamos responder fue: ¿Existe alguna relación entre la actividad antiproliferativa y la interacción de la heparina con sus receptores específicos ?

La heparina ejerció un efecto inhibitorio mayor cuando las células M3 proliferaron en medio sin SFB que en presencia de 2 % de SFB. En concordancia, las células que proliferaron en medio de cultivo sin SFB, poseen dos veces mas receptores para heparina (6,9 x 10^5 sitios/célula) que cuando crecieron en medio con 2 % de SFB (3,5 x 10^5 sitios/células). Más aún, las células MM3 son mas sensibles al efecto antiproliferativo y poseen más receptores (11x 10^5 sitios/célula). Sin embargo las diferencias en el número aparente de receptores podría atribuirse a otros motivos:

1) Varias glicoproteinas de la ME como la laminina, la fibronectina, la trombospondina, el colágeno de tipo I y otros colágenos poseen afinidad por la heparina (San Antonio et al 1993). La heparina podría hipotéticamente unirse a estas glicoproteinas. A pesar de que no

descartamos esta hipótesis desde un punto de vista bioquímico, existen varios hechos que al menos en parte, la plantean como poco plausible.

Existen diferentes constantes de afinidad entre la heparina y las variadas glicoproteinas de la ME (San Antonio et al 1993). Sin embargo, en nuestros ensayos de unión, el análisis de Scatcchard mostró siempre una única constante de afinidad, independientemente de las condiciones de cultivo empleadas.

Además, podemos descartar que se deba a una unión de la heparina con la fibronectina dado que no se ha detectado la expresión del ARN mensajero de fibronectina en las células MM3 y si, en las células M3 (Muro et al 1991), en las que el número de receptores para heparina es menor. Mas aún, mediante técnicas histoquímicas se observó la presencia de fibronectina en células M3 que proliferaron en medio con SFB pero no en aquellas que lo hicieron en ausencia de SFB (Ladeda et al. 1994).

Así, nuestros resultados nos permiten inferir que las diferencias en la unión de heparina se deben a un cambio en el número de receptores más que a una interacción con glicoproteinas de la ME.

2) La posibilidad de que algunos receptores para heparina se encuentren bloqueados por algún factor similar a la heparina proveniente del SFB se descartó mediante ensayos de preincubación de las células en presencia de SFB.

3) La tercer alternativa, que nos resulta la mas atrayente, es que los receptores se expongan en la membrana plasmática diferencialmente en las distintas etapas del ciclo celular. Es importante notar que las células M3 cuando crecen en medio con 2 % de SFB, tienen un tiempo de duplicación de 48-60 hs y el número de receptores es de 3,5 x 10^5 sitios/célula, mientras que en ausencia de SFB, el tiempo de duplicación es de 90-96 hs y el número de receptores es el doble (6.9 x 10^5 sitios/célula). Las células MM3 en ausencia de SFB se duplican en tiempos mas prolongados (120-130 hs) y el número de receptores fue aún mayor (11 x 10^5 sitios/célula). Esto parecería indicar que el número de receptores aumenta proporcionalmente con el tiempo que tarda en duplicarse la población celular.

Dado que el tiempo de duplicación celular varía con las condiciones del medio y teniendo en cuenta que las células no han sido sincronizadas, la proporción de células en cada una de las

fases del ciclo celular será variable. Sin embargo la proporción de células en G_0- G_1 aumentará con el tiempo de duplicación ya que la mayoría de los factores de crecimiento acortan esta etapa sin modificar la duración de las fases S y M.

Castellot y colaboradores (Castellot et al 1981, 1985b) observaron que SMCs arrestadas en su crecimiento, son mucho mas sensibles al efecto inhibitorio de la heparina que cuando se encuentran en crecimiento exponencial. En concordancia, las células arrestadas en su crecimiento unen 8 veces mas heparina que las segundas. La heparina inhibe el crecimiento de SMCs (Castellot et al 1985b) y células de cervix de útero de rata (Wrigth & Karnovsky 1987), bloqueando un punto intermedio entre la mitad y el final de la fase G_1 del ciclo celular (Reilly et al 1989). Así, las diferencias en el efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del tumor M3, en ausencia y presencia de SFB, puede ser consecuencia de la proporción de células sensibles a la heparina. Dado que el número de receptores se calcula a partir de toda la monocapa celular, y esta es heterogénea en cuanto a la fase del ciclo en que se encuentran las células, las diferencias en el valor de receptores obtenida en ambos casos podría explicarse si las células expresasen diferencialmente los receptores en las distintas etapas del ciclo celular. Así, el número de receptores para heparina podría ser mayor en la fase G_0-G_1. Si esta hipótesis fuese la correcta, las diferencias en el número de receptores observados entre las células M3 y MM3 debería atribuirse a diferencias en el tiempo de duplicación de las células y no a la potencialidad metastásica. Por el momento, los estudios que realizamos no permiten postular una relación entre la expresión de receptores para heparina y la capacidad metastásica.

El análisis de los resultados sobre el efecto antiproliferativo producido por la heparina, en presencia y ausencia de SFB y el número de receptores para heparina en ambos casos, no serían suficientes para concluir que exista una relación entre actividad antiproliferativa de la heparina y la unión de ésta a los receptores. Sin embargo, los estudios de competencia con las heparinas químicamente modificadas confirmarían esta correlación.

La heparina no modificada químicamente es la que mas efecto antiproliferativo posee y la que inhibe mas del 90 % de la unión de la ^{3}H- heparina al receptor. La heparina N-des N-Ac, que inhibe parcialmente la proliferación, inhibe el 60 % de la unión de la ^{3}H-heparina a las

células, mientras que las heparinas modificadas que no poseen efecto antiproliferativo no afectaron esta unión.

Estas observaciones, sugieren fuertemente que la inhibición del crecimiento puede requerir de una interacción ligando-receptor. Mas aún, la internalización de la heparina y la heparina N-des N-Ac con la consiguiente formación de vesículas citoplasmáticas permiten inferir la existencia de un proceso endocítico mediado por receptores. La presencia de vesículas citoplasmáticas conteniendo heparina fue confirmada recientemente en SMC empleando microscopia confocal (Bârzu et al 1996).

El número de receptores en las células M3 y MM3 se encuentra en el mismo rango que en las reportadas para células musculares lisas (1 x 10^5 sitios/célula) (Castellot et al 1985b) y células endoteliales (1 x 10^6 sitios/célula) (Glimelius et al 1978) y es menor que las encontradas en monocitos humanos (1,9 x 10^6 sitios/células) (Leung et al 1989) y otras células tumorales como el melanoma B16 (5 x 10^6 sitios/célula) (Biswas 1988) y dos rabdosarcomas de diferente capacidad metastásica (2-5 x 10^6 sitios/célula) (Redini et al 1989).

Además de las células M3 y MM3, otros tres tipos de células epiteliales, son sensibles a la acción antiproliferativa de la heparina, las ya mencionadas de cervix de rata (Wrigth et al 1985; Wrigth & Karnovsky 1987), los queratinocitos de piel de ratón y humanos (Ristow & Messmer 1988) y un carcinoma humano SW13 (Harper & Carter 1989).

La actividad antiproliferativa de la heparina podría asociarse con el efecto que ejerce sobre varios procesos moleculares en las célula. La heparina inhibe la expresión de los proto-oncogenes tempranos c-fos y c-myc en SMCs (Wrigth et al 1989; Pukac et al 1990), actuando selectivamente en el camino metabólico dependiente de la proteína quinasa C (Wrigth et al 1989; Castellot et al 1989, Pukac et al 1992) y de la proteína quinasa activada por señales mitogénicas (mitogenic activated protein kinase -MAPK) (Ottlinger et al 1993). También inhibe la inducción de la transcripción de otros genes asociados con la progresión del ciclo celular, como el gen c-myb, el gen 2F1 que expresa la proteína transportadora ATP/ADP en mitocondrias, el gen de la histona H3 (Reilly et al 1989) y la ornitina descarboxilasa (Damon et al 1992).

Todos estos procesos intracelulares podrían requerir como primer paso para la señalización, una interacción específica de la heparina con el receptor y/o su internalización.

8. HEPARINA Y ADHESIÓN CELULAR.

8.1. INTRODUCCIÓN.

Las células neoplásicas con capacidad metastatizante invaden el tejido normal para acceder al torrente circulatorio o linfático. Durante este procesos las células se adhieren a componentes de la ME, la degradan empleando enzimas proteolíticas y finalmente se movilizan dentro de las regiones de la matriz modificada (Liotta 1986).

Varios componentes de la ME tales como fibronectina, laminina y colágeno IV están involucrados en los procesos metastásicos, dado que promueven la adhesión y migración celular (McCarthy & Furcht 1984; McCarthy et. al 1986; Muro et. al 1991) o constituyen barreras fisicas (como el colágeno IV en la membrana basal) que requieren ser degradadas por las células tumorales mediante enzimas específicas.

Proteínas de la ME como la trombospondina (Lawler & Slayter 1981, Incardona et al 1995), la fibronectina (Yamada et al 1980), la laminina (Sakashita et al 1980) y ciertos tipos de colágeno (Keller et al 1986) poseen dominios de unión a la heparina. Por lo tanto, la heparina y moléculas análogas podrían regular la unión de esos sustratos con los receptores específicos de tipo integrinas de las células tumorales y modificar los procesos de adhesión y motilidad celular. En particular, se observó que la heparina inhibe la adhesión al colágeno y a fibronectina (San Antonio et al 1992, Antachopoulos et al 1995) y se sugirió que este proceso podría estar mediado por una inhibición competitiva de la unión entre el heparán sulfato de la membrana plasmática al dominio de unión a heparina del sustrato específico. También se sabe que proteoglicanos de la membrana participan en procesos adhesivos con componentes de la ME (Soncin et al 1994).

El heparán sulfato, además de encontrarse en la membrana plasmática, es otro componente importante de la ME y parecería jugar un rol importante en la interacción entre la célula y componentes de la matriz en el proceso metastásico (McCarthy et. al 1986; 1988; Antachopoulos et. al 1995). Además, los receptores para heparina podrían fisiológicamente interactuar con el heparán sulfato de la ME, modulando la adhesión de las células tumorales.

Por lo tanto, la heparina podría regular la adhesión celular ya sea a través de los receptores específicos o mediando la unión de otros componentes de la ME. Si tenemos en cuenta que los receptores involucrados en la adhesión celular (selectina, integrina y caderinas) están asociados a moléculas que participan en la transducción de señales y muchas de ellas median efectos antiproliferativos (Rosales et al 1995), estudios sobre modificación de la adhesión nos podrían dar mas información sobre el mecanismo de acción de la heparina en nuestro sistema tumoral..

8.2. OBJETIVO.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar el efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre la adhesión celular.

8.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.3.1. Células tumorales:

Para realizar los estudios, se utilizaron células de línea del tumor M3 (LM3) que se obtuvo en nuestro laboratorio a partir de un cultivo primario de células del adenocarcinoma mamario murino M3. La línea establecida ha sido caracterizada como adenocarcinoma al igual que las células M3 de la que provienen y crecen en cultivos como monocapas en medio MEM suplementado con 5% de SFB, 2 mM de glutamina y 80 μg/ml de gentamicina.

La tasa de duplicación de las células LM3 es levemente superior a las células M3 (18-22 hs vs 24-28 hs respectivamente, en medio con 10% de SFB) y al igual que las células M3 pueden crecer en ausencia de SFB.

8.3.2. Suspensión de células tumorales:

Para la realización de los experimentos se utilizaron células que crecieron las últimas 24 hs en ausencia de SFB (a menos que se especifique expresamente lo contrario), entre los repiques 55 y 70.

Se levantaron las monocapas celulares con tripsina-EDTA y se dejaron 2 hs en suspensión en medio con 10 % de SFB para neutralizar la tripsina y permitir la recuperación celular en particular sus receptores de membrana. Se lavaron 2 veces en medio sin SFB y se sembraron en placas de cultivo de 24 hoyos (1×10^5 células /500 μl de medio MEM sin SFB) sin (control) o con distintas concentraciones de heparina (0,1 a 500 μg/ml).

Antes de iniciar los ensayos de adhesión, se determinó la viabilidad de la suspensión celular empleando el test de exclusión con azul tripán, siendo en todos los casos superior al 95%.

8.3.3. Ensayos de adhesión y sustratos:

Los ensayos de adhesión se realizaron directamente sobre la placa de cultivo (plástico) o en hoyos recubiertos con albúmina o fibronectina.

El recubrimiento de los hoyos con fibronectina se realizó mediante la adición de 300 μl de PBS conteniendo 4 μg de fibronectina, durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron 2 veces con PBS y se agregó 300 μl de una solución de albúmina (1 mg/ml) en MEM

para bloquear las zonas que no contuvieran fibronectina y se secaron en el flujo laminar. Hoyos controles recibieron el mismo tratamiento pero sin la adición de fibronectina (Albúmina).

Una alícuota de la suspensión celular fue incubada durante 30 minutos en presencia del peptido RGDS (secuencia peptídica del dominio de la fibronectina que se une a la célula) (100μg/ml) antes de iniciar los ensayos de adhesión.

8.3.4. Determinación del número de células adheridas:

A distintos tiempos de haber sembrado las células se lavaron los hoyos suavemente con PBS frío, y se estableció el número de células adheridas mediante determinación del contenido de ADN empleando el reactivo de Hoescht 33258 (Labarca & Paigen 1980). La determinación del número total de células sembradas se realizó también por medición del contenido de ADN.

8.3.5. Agregación celular:

Alícuotas de una suspensión de células LM3 tratadas o no con heparina (200 μg/ml) se tomaron a distintos tiempos y se determinó el número de células formando agregados mediante observación microscópica, contando un mínimo de 100 células.

8.4. RESULTADOS.

8.4.1. Aumento de la adhesión en función del tiempo.

La adhesión celular se incrementa en función del tiempo. Entre el 90 y 100 % de las células LM3 se adhirieron a la placa de cultivo después de 90 minutos, pero la presencia de heparina en el medio favorece significativamente la adhesión celular (Figura 8.1.). A los 40-45 minutos se adhirieron el 50 % de las células controles y un 75 % de las que se encontraban en presencia de heparina (200 µg/ml). Dado que el efecto producido por la heparina no es el mismo en todos los puntos, sino que modifica la cinética de la adhesión, se eligieron tiempos entre 30 y 60 minutos para los ensayos siguientes.

Resultados similares se observaron cuando las células estuvieron en contacto con heparina durante 30 minutos a 37 °C y luego se lavaron para realizar los ensayos de adhesión (no se muestra el dato).

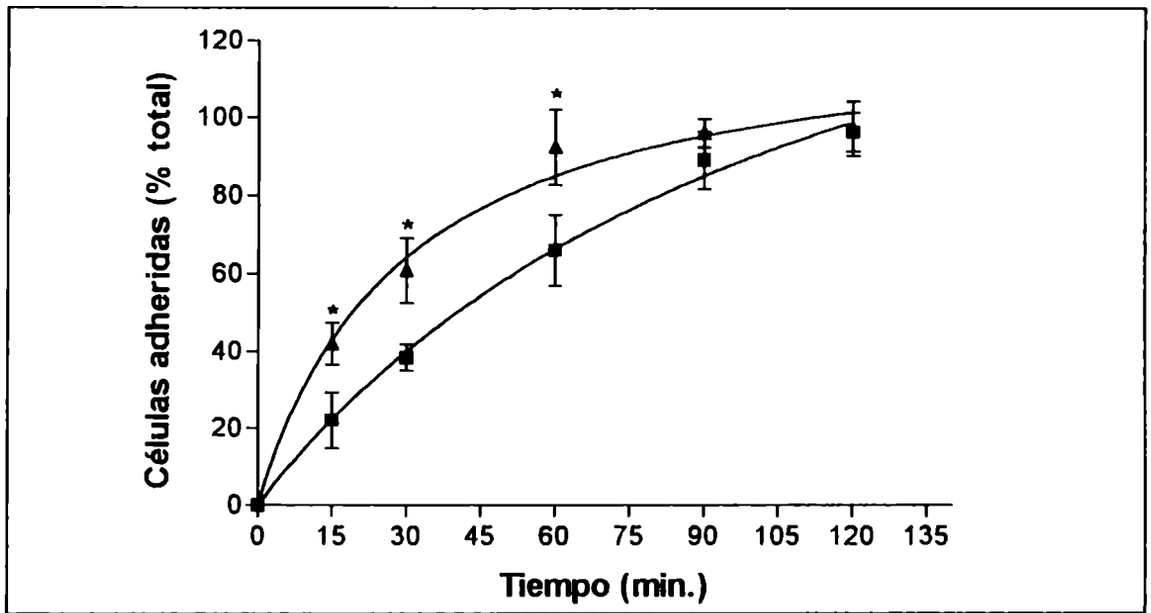


FIGURA 8.1. Efecto de la heparina sobre la adhesión celular en función del tiempo. $1x10^5$ células LM3 que crecieron las últimas 24 horas en ausencia de suero, se sembraron en ausencia (■) o presencia (▲) de 200 µg/ml de heparina a 37 °C. A distintos tiempos se lavó suavemente el fondo de los hoyos con PBS y se determinó el contenido de ADN. Los datos representan el contenido de ADN respecto del total sembrado (100%) (media ± DS ; n=3). *; $p<0,05$.

8.4.2. Aumento de la adhesión en función de la concentración de heparina.

La heparina aumentó la adhesión de las células a las placas de cultivo, de manera dosis dependiente, observándose un incremento en la adhesión celular entre un 30-40 % con concentraciones de 200 μg/ml (Figura 8.2.).

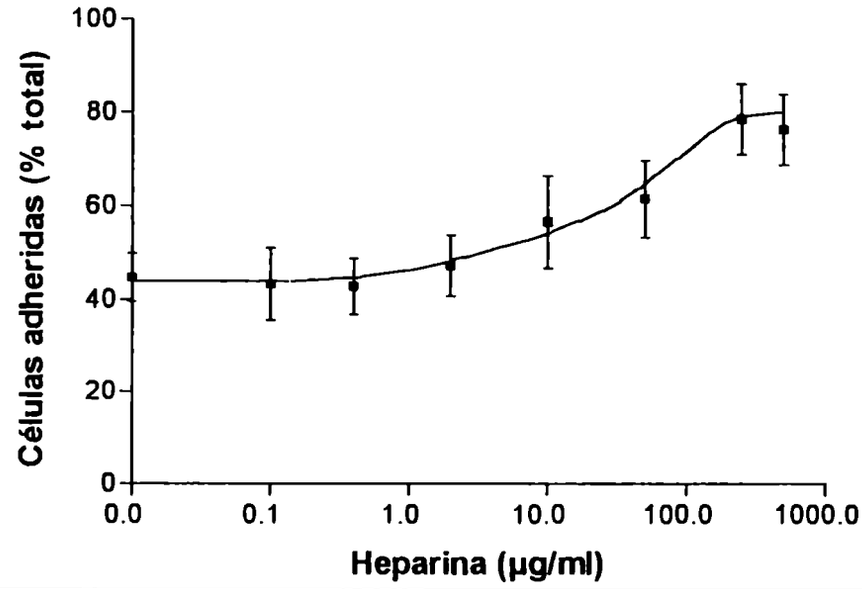


FIGURA 8.2. Aumento de la adhesión en función de la concentración. Se sembraron $1x10^5$ células LM3 que crecieron las últimas 24 horas en ausencia de suero, en presencia de distintas concentraciones de heparina durante 45 minutos a 37°C. Al cabo de ese tiempo se lavó la placa de cultivo suavemente con PBS y se determinó el contenido de ADN, el cual se expresa en porcentajes respecto del ADN del total de células sembradas (media ±DS; n=3).

8.4.3. Efecto de las heparinas modificadas sobre la adhesión celular.

Las heparinas modificadas químicamente tienen diferente comportamiento sobre la adhesión celular. Al igual que con el efecto antiproliferativo y con la capacidad de unirse a los receptores específicos, todas las heparinas O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) así como la N-des no son capaces de aumentar la adhesión, mientras que la heparina N-des N-Ac aumenta la adhesión en menor medida que la heparina (Figura 8.3.).

Para analizar la posibilidad de que el aumento producido por la heparina en la adhesión celular sea consecuencia de una interacción inespecífica entre la heparina unida a las células y las cargas positivas del plástico, se realizaron ensayos de adhesión en hoyos cubiertos con albúmina y con fibronectina, que posee sitios de unión a heparina. La fibronectina favoreció la adhesión celular, tal como fue demostrado previamente (Bal de Kier Joffé et al 1986) (52 % vs

65 %, en albúmina y fibronectina respectivamente) (Figura 8.3.). La fibronectina se une a las células por un dominio que contiene los aminoácidos RGDS. Concordantemente, la preincubación de las células durante 30 minutos con el péptido RGDS inhibió el estímulo generado por la fibronectina, pero no modificó el aumento producido por la heparina. Este resultado sugiere que el estímulo de la heparina y el de la fibronectina serían independientes.

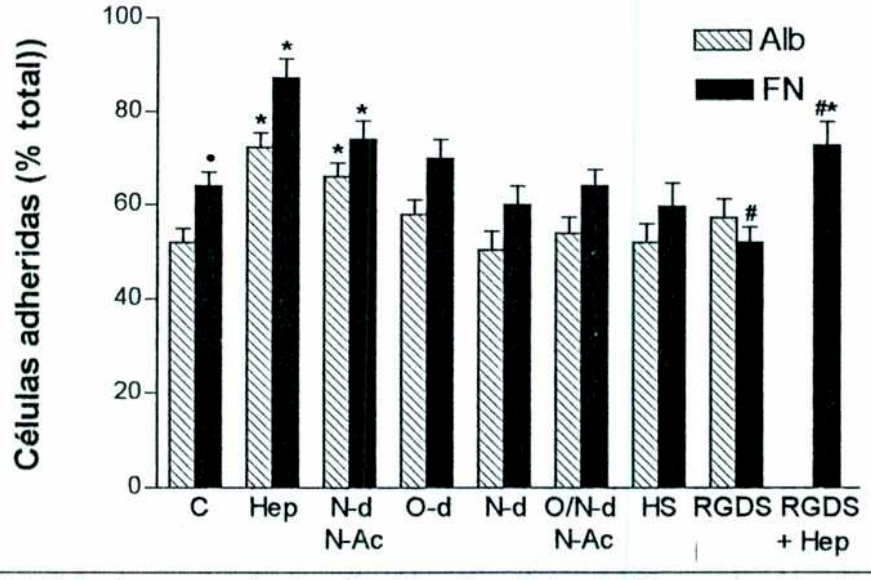


FIGURA 8.3. Aumento de la adhesión de células LM3 por acción de heparina y heparinas modificadas químicamente a distintos sustratos. Células LM3 ($1x10^5$ cél./hoyo) que crecieron las últimas 24 hs en ausencia de SFB, se sembraron y permanecieron durante 45 min minutos en presencia de heparina o las heparinas N-des N-Ac; O-des; N-des; O/N-des N-Ac y HS (250 µg/ml) en hoyos recubiertos con albúmina (Alb) o fibronectina (FN) (4 µg/hoyo). En hoyos adicionales se sembraron células preincubadas con el péptido RGDS (100 µg/ml) durante 30 min. Se determinó el contenido de ADN en cada hoyo expresando los resultados como porcentajes respecto del ADN del total de células sembradas (media ± DS; n=3). •$p<0,05$ vs albúmina; *$p<0,05$ vs control respectivo; # $p<0,05$ vs control sin RGDS.

La presencia de heparina en el medio de cultivo incrementó la adhesión celular independientemente del sustrato lo que sugiere que el efecto está mediado por un cambio en la célula y no por interacciones de tipo puente con los sustratos. Mas aún, todas las heparinas presentaron un efecto similar en albúmina o fibronectina. En este último caso, la presencia de heparina ejerció un efecto estimulador adicional sobre la adhesión que ejerce la fibronectina *per-se*.

Estos resultados muestran una estrecha correlación entre el aumento en la adhesión, el efecto antiproliferativo y la capacidad para unirse a receptores específicos.

8.4.4. Asociación entre adhesión y número de receptores.

Nosotros demostramos anteriormente que el número de receptores en la membrana plasmática varía con las concentraciones de SFB del medio y sugerimos que esto podría estar asociado con la etapa del ciclo celular de la célula. El número de receptores se incrementa con la quiescencia de las células. Por lo tanto, estudiamos el efecto de la heparina sobre la adhesión de células que crecieron durante las 24 hs anteriores al ensayo en presencia de distintas concentraciones de SFB.

Las curvas de la cinética de adhesión mostraron en todos los casos un efecto estimulador de la heparina. Sin embargo, la adhesión de las células es dependiente de las concentraciones de SFB en las que hayan crecido las últimas 24 hs, de manera tal que el tiempo para que se adhiera un 50% de las células es inversamente proporcional con el aumento de SFB. En otras palabras, en ausencia de SFB, un 50 % de las células se adhirieron a los 45-50 min (ver figura 8.1.) pero disminuye a 20-25 min en células crecidas en 10 % de SFB.

Para determinar el efecto de la heparina nosotros analizamos el porcentaje de estimulación cuando el 50 % de las células control se adhirieron. En la tabla 8.1. se pueden observar los resultados obtenidos.

TABLA 8.1: Efecto de la heparina (200 μg/ml) sobre la adhesión de células que proliferaron en distintas concentraciones de SFB las últimas 24 hs antes del ensayo.

últimas 24 hs en	Tiempo para la adhesión del 50 % de las células control[a] (min.)	Células tratadas adheridas (% total)[b]	Incremento de la adhesión (%)[c]
Sin SFB	48 min	73	23
2 % SFB	37 min	68	18
5 % SFB	26 min	61	11
10 % SFB	23 min	59	9

a El tiempo para la adhesión del 50% de las células se determinó mediante extrapolación de las curvas de cinética de adhesión.

b Se determinó el contenido de ADN de cuatro hoyos. Los resultados muestran la media de dichas determinaciones. DS fue menor al 4 % de las medias. Se muestra un ensayo representativo de dos realizados independientemente.

c. Se calculó el aumento de la adhesión respecto de las células sin tratar con heparina.

8.5. DISCUSIÓN.

En este capítulo observamos que la heparina aumenta la adhesión de las células LM3 de manera dosis dependiente. Además, el estudio con heparinas modificadas y el empleo de células que crecieron 24 hs en distintas concentraciones de SFB y que poseen distinta cantidad de receptores, muestra una correlación entre la capacidad de las heparinas para unirse a los receptores con el aumento de la adhesión. Este hecho, sumado a que la heparina no esta actuando de manera inespecífica con el sustrato dado que el efecto se mantiene cuando la adhesión ocurre en sustratos como plástico, albúmina y fibronectina, sugiere fuertemente que la unión de la heparina a los receptores produce un efecto dual: inhibir la proliferación y favorecer la adhesión.

Un punto importante para discutir es el efecto de la heparina en la adhesión a fibronectina. Varios trabajos muestran que la heparina inhibe la adhesión a fibronectina, al igual que lo que ocurre con el colágeno de tipo I (Antachopoulos et. al 1995, San Antonio et al 1992). Sin embargo en estos tipos celulares no se demostró la presencia de receptores para heparina y el efecto podría estar mediado por una competencia entre la heparina y el heparán sulfato de la membrana en la interacción con los dominios de unión a heparina. De los tres procesos involucrados en una firme adhesión celular (unión al sustrato -lo que aquí denominamos adhesión-, la formación de sitios específicos de adhesión focal en donde se detectan las primeras modificaciones a nivel de citoesqueleto y el spreading) el dominio de unión a heparina en la fibronectina parece intervenir esencialmente en la formación de los puntos de adhesión focal. Dos trabajos muestran la importancia de este dominio de manera concluyente. LeBaron y colaboradores (1988) empleando células CHO mutantes que carecen de heparán sulfato tienen disminuida la formación de puntos focales al adherirse a fibronectina pero no la adhesión al sustrato. Por otro lado la adhesión a fibronectina en presencia de anticuerpos contra el dominio de unión a heparina o el uso de fragmentos carentes del mismo solo disminuyeron el desarrollo de puntos de adhesión focal (Woods et al 1986). En ambos trabajos y en otros se demuestra que el dominio que interviene en la adhesión es el o los denominados de unión a célula que contienen los aminoácidos RGDS.

Es importante remarcar que las células en cultivo cuando crecen en monocapa, se redondean y despegan en el momento de la división celular y luego vuelven a adherirse. De esta manera, no resulta extraño una asociación entre aumento de adhesión y efecto antiproliferativo. Sin embargo, esto podría tener implicancias fisiológicas importantes que involucrarían al heparán sulfato.

Nosotros hemos visto, que tanto la heparina como el heparán sulfato, inhiben la proliferación celular fundamentalmente cuando estas están en ausencia de SFB. Más aun, en presencia de SFB, el efecto antiproliferativo del heparán sulfato, se pierde (ver capítulo 6). Resultados similares se observaron en SMC (Castellot et al 1981; 1984). Por otro lado, el número de receptores para heparina aumenta también cuando las células están en ausencia de SFB, posiblemente porque hay un mayor proporción de células en fase G0-G1.

Todos estos datos juntos, sugieren la posibilidad de que cuando las células se encuentran en la matriz extracelular en condiciones quiescentes o de baja proliferación, se expresan un mayor número de receptores que favorecen la adhesión al heparán sulfato. Cuando se produce un cambio en el microambiente como es el daño del endotelio o de la ME, en el caso de las SMC (Pukac et al 1991), las células comienzan a proliferar para regenerar el tejido, lo que podría trae aparejado (o ser consecuencia de) una disminución en la expresión de receptores para heparina/heparán sulfato y un descenso en la adhesión celular, que resulta fundamental para la migración y locomoción celular. En el caso de las SMC, este fenómeno tiene consecuencias patológicas importantes ya que la perdida del endotelio y de la membrana basal desencadena la proliferación de las SMC y la formación de ateromas. Este proceso parecería revertirse cuando se realizan tratamientos con heparina (Edelman & Karnovsky 1994).

El desarrollo embrionario, la reparación tisular y el desarrollo tumoral son todos procesos que requieren una elevada proliferación celular. Una pregunta importante para resolver es cómo estos procesos están regulados y coordinados espacio temporalmente.

Se sabe que la expresión espacio-temporal de factores de crecimiento y/o los receptores de dichos factores son importantes durante la regulación del crecimiento. También el microambiente circundante participa en la regulación del crecimiento mediante su unión a receptores celulares específicos. Por lo tanto, los factores de crecimiento y las moléculas de la

ME conjuntamente con sus respectivos receptores en la membrana plasmática, podría orquestar la modulación de los programas genéticos que afectarían el desarrollo tumoral y metastásico.

La unión de la heparina a los receptores desencadena señales citoplasmáticas mediadas por la proteinquinasa C que inhiben la expresión de varios genes asociados a la proliferación celular e inhiben el crecimiento. Es esperable que otras proteínas y genes involucrados en el rearreglo del citoesqueleto puedan ser activados o inactivados por la heparina de manera tal que el balance de los mismos favorezca la adhesión celular.

SECCIÓN IV

HEPARINA Y DESARROLLO TUMORAL

PARTE EXPERIMENTAL

La heparina podría tener un efecto modulador sobre el crecimiento tumoral y sobre varios de los eventos involucrados en el desarrollo de las metástasis.

En la presente sección se presentan los estudios sobre el efecto de la heparina en el crecimiento del tumor primario y en el desarrollo de metástasis experimentales (capítulo 9). A partir de los resultados obtenidos, analizamos tres posibles mecanismos en los que la heparina podría intervenir de manera indirecta para disminuir el número de metástasis:

1) Un aumento en la **fibrinólisis** podría contribuir a evitar la diseminación de metástasis. Los depósitos de fibrina pueden protejer a las células trumorales circulantes del trauma mecánico y la destrucción por parte de células del sistema inmune del huesped, facilitando también su arresto en la microcirculación. Por consiguiente, la actividad profibrinolítica de la heparina podría ser la causa de la actividad antimetastásica (capítulo 10).

2) En varios tipos de cancer se observó una disminución en los tiempos de coagulación sanguínea. Esto parece deberse a la producción de factores procoagulantes por parte de las células tumorales lo que genera una disminución de la fluidez sanguínea evitando el daño mecánico que surge de viajar por los capilares, un medio sumamente hostil para las células que no estan adaptadas. El efecto **anticoagulante** de la heparina podría contrarrestar los cambios en la hemostasis generados por el tumor (capítulo 11).

3) Durante la intravasación y la extravasación las células tumorales necesitan degradar el heparán sulfato de la ME. Varias enzimas participan en este proceso y se conocen genericamente como **heparinasas o heparanasas**. Se ha sugerido que la heparina podría inhibir la degradación del heparán sulfato de manera competitiva (capítulo 12).

9. HEPARINA EN EL DESARROLLO TUMORAL

9.1. INTRODUCCIÓN.

La heparina se emplea en pacientes en eventos asociados con la coagulación, la trombosis u otras patologías derivadas como distintos tipos de embolias (Verstraete 1990).

EL empleo de la heparina en eventos no asociados con la homeostasis comenzó a partir de investigaciones que mostraron que inhibe la proliferacion de SMC in vitro (Castellot et al 1984; 1985b). Los estudios para determinar su acción en la proliferación celular in vivo, se iniciaron en los últimos años en ensayos experimentales con animales de laboratorio. Los esfuerzos están destinados a inhibir el crecimiento de SMC para controlar la aterosclerosis y la restenosis (Pukac et al 1991; Edelman & Karnovsky 1994).

En nuestro modelo tumoral, nosotros observamos que los MCN que poseen mayor contenido de heparina que los MCP disminuyen la incidencia tumoral. Por otra parte, el estudio sobre el efecto de la heparina sobre el crecimiento de las células tumorales in vitro mostró que la heparina y N-des N-Ac inhiben la proliferación de las células M3 y MM3 por un mecanismo mediado por la unión a receptores. Sin embargo, no sabemos si estos glicosaminoglicanos mantienen el efecto antiproliferativo in vivo.

Por otro lado, varios trabajos muestran que la heparina ejerce un efecto antimetastásico, aunque no hay unanimidad de criterio en el mecanismo involucrado en este proceso. Mientras algunos investigadores se lo atribuyen a su efecto sobre el sistema homeostático (Kakkar et al 1995), otros sostienen que se debe a la inhibición de enzimas específicas como las heparanasas que se requieren en los procesos de extravasación (Nakajima et al 1988).

Cuando células tumorales potencialmente metastásiscas ingresan en el sistema circulatorio, interactuan con componentes del sistema homeostático. Una de éstas asociaciones genera la formación de microtrombos o agregados de células tumorales protegidas por una red de fibrina circundante a las células que facilita las metástasis (Constantini & Zacharski 1992).

Sería esperable que compuestos que activen la cascada fibrinolítica, que deriva en su paso último en la formación de plasmina a partir del plasminógeno (Pg), podrían tener efectos antimetastásiscos como consecuencia de la degradación de la fibrina circundante que protege a

las células tumorales. Esto podría deberse a un incremento en la exposición de las células tumorales al sistema inmune y a un mayor daño mecánico de las células circulantes. A pesar de que la activación del Pg a plasmina puede ser beneficioso para evitar las metástasis, podría tener efectos contraproducentes en la invasión del tumor primario. Varias proteínas de la ME como la fibronectina, la laminina y otras de tipo no colágeno son sustratos de la plasmina, y la proteólisis de éstas moléculas es un requisito necesario para que ocurra la migración y la invasión tumoral (Laiho & Keski-Oja 1989).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio y en otros avalan esta teoría. El activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) es uno de los dos activadores fisiológicos que convierten Pg en plasmina. Se ha observado un aumento en la expresión de esta enzima en diversas neoplasias y en líneas de células tumorales en cultivo (Blasi et al 1987, Alonso et al 1993). Además, la inoculación en ratones portadores del tumor M3 con un inhibidor selectivo del uPA, el compuesto B623 [4-susbstituido benzo (b) tiofene-2-carboxamidina] (Towle et al 1993), disminuyó la invasión local del tumor, pero incrementó las metástasis pulmonares (Alonso et al 1996b).

Un descenso en la formación de coágulos de fibrina, además de la degradación de los existentes por el sistema fibrinolítico, podría tener efectos benéficos en la prevención de la formación de metástasis. En este sentido, drogas con actividad anticoagulante como la irudina inhiben la formación de metástasis experimentales (Esumi et al 1991).

La heparina posee actividad anticoagulante y profibrinolítica. Ambas actividades plantean a la heparina como un candidato potencial en la inhibición de las metástasis.

9.2. OBJETIVOS.

Teniendo en cuenta el efecto que poseen las heparinas sobre las células M3 in vitro, nos propusimos como objetivos:

1. Estudiar las vías de inoculación y las dosis toleradas por los animales para poder:

1.1. Ensayar el efecto de la heparina y N-des N-Ac sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis espontáneas in vivo.

1.2. Estudiar el efecto de la heparina y las heparinas modificadas en la formación de metástasis experimentales.

2. Estudiar el efecto de la heparina combinada con un inhibidor específico del uPA (el compuesto B623) en la formación de metástasis.

9.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.3.1. Animales:

Se utilizaron ratones Balb/c de 10 a 12 semanas de vida cuyo peso osciló entre 25 y 27 gramos.

9.3.2. Ensayo de toxicidad de la heparina y N-des N-Ac in vivo:

Se realizaron inoculaciones intraperitoneales (i.p.) (0,3 ml) en una única dosis (dosis agudas) o inoculaciones diarias (dosis crónicas) con distinta concentraciones de heparina (50, 25, 12, 6, 0,5 y 0,1 mg/ratón/día) y N-des N-Ac (50, 25, 12, 6, 3 y 1,5 mg/ratón/día). Los animales fueron observados diariamente, analizando su comportamiento, calidad del pelaje y registrandose la sobrevida. Los animales muertos fueron autopsiados.

9.3.3. Suspensión de células tumorales:

La suspensión celular se obtuvo a partir de tres tumores M3 tal como se especificó en el punto 5.4.5. Las células permanecieron en medio MEM durante 2 hs para permitir su recuperación antes de ser inoculadas. La viabilidad celular fue superior al 80 %.

9.3.4. Estudio del efecto de la heparina y el N-des N-Ac sobre el crecimiento tumoral:

Para observar la acción de la heparina y N-des N-Ac, en el crecimiento tumoral y metastásico, se inocularon ratones Balb/c en la almohadilla plantar, con una suspensión de células tumorales de 2×10^5 (experimento 1) o 3×10^5 (experimento 2) en un volumen de 0,05 ml/ratón. Se eligió la técnica de crecimiento tumoral en la almohadilla plantar y no la de crecimiento subcutáneo en el dorso del ratón, realizada en el estudio con MC, por que la variación en el tamaño del tumor entre animales del mismo grupo posee menor desvío standard. Además, como el tumor crece en una zona más delimitada se disminuye la posibilidad de que se generen recidivas luego de la extirpación.

Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos que fueron inoculados i.p. con 0,3 ml de: 1) solución fisiológica (control) 2) heparina (0,5 mg/ratón/día) y 3) N-des N-Ac (6 mg/ratón/día).

9.3.5. Medición del crecimiento tumoral y determinación del tiempo de latencia:

El tamaño tumoral se evaluó como la diferencia de espesor entre la pata portadora del tumor y la pata contralateral normal, tomada con calibre.

Se consideró tiempo de latencia, el número de días transcurridos desde la inoculación de las células M3 hasta que el 50 % de los animales poseía un tamaño tumoral de 0,15 mm.

La velocidad de crecimiento tumoral en cada animal se calculó a partir de las curvas de tamaño tumoral en función del tiempo analizando la pendiente en la fase exponencial de dicha curva. Los datos se expresan como el promedio de dichas pendientes ± desvío standard.

9.3.6. Medición de las metástasis espontáneas en pulmón:

Cuando los tumores superaron un tamaño de 2 mm (Experimento 1) o 3 mm (Experimento 2) se los extirpó quirúrgicamente por amputación de la pata, cuidando de no tocar el tejido sano con restos del tejido tumoral para evitar residivas o reimplantes. La cirugía se realizó con los animales anestesiados mediante inoculación i.p. (0,25 ml/ ratón) de una solución conteniendo, 0,6 ml de Ketalar (50 mg/ml Parke-Davis), 0,1 ml de Rampun (Bayer) y 2,4 ml de solución fisiológica.

El tratamiento con las distintas drogas se finalizó el día de la operación.

Los animales se sacrificaron 25 días después de la extirpación del tumor y se examinaron las metástasis pulmonares bajo lupa binocular estereoscópica.

La incidencia metastásica se determinó como el número de animales que presentaban metástasis sobre el total de animales tratados.

9.3.7. Determinación del número de metástasis experimentales:

Se utilizó la línea M3 (LM3) y la línea F3II. Para la realización de los experimentos, las células se cosecharon, se lavaron dos veces en medio MEM y se resuspendieron en medio sin SFB durante dos hora a 37°C para permitir su recuperación. La viabilidad celular se determinó con el test de exclusión con azul tripán y fue siempre superior al 95%.

Se inocularon en la vena lateral de la cola de ratones Balb/C, 2 x 10^5 células tumorales (LM3 o F3II) en 0,3 ml de medio MEM. Los animales se observaron diariamente y se sacrificaron mediante dislocación cervical a las tres semanas de la inoculación. El recuento del número de nódulos metastásicos en pulmón se determinó bajo lupa (Puricelli et al 1994).

Para establecer el efecto de la heparina, y las heparinas modificadas sobre la colonización metastásica, se realizaron tres inoculaciones i.p. de 4 mg/kg/ratón en 0,1 ml de PBS, una antes (-90 minutos) y dos después (+90 y + 270 minutos) de la administración i.v. de las células

tumorales. El compuesto B623 se inyectó diariamente por vía i.p. (7,5 mg/Kg/ratón en 0,3 ml de glucosa) comenzando un día antes (-1 día) hasta 3 días después de la inoculación i.v. de las células tumorales (+3 días). Las células se inocularon el día 0, entre 3-5 horas después de la segunda inoculación i.p. del compuesto B623. Los animales controles recibieron únicamente vehículo.

En los estudios in vitro, el compuesto B623 fue disuelto en dimetilsulfóxido y luego diluido en MEM (0,5 % final de dimetilsulfóxido) y en los estudios in vivo fue previamente sonicado en una suspensión de glucosa 5%.

A los 21 días de inoculádas las células tumorales, se sacrificaron los animales y se realizó el recuento del número de metástasis experimentales en pulmón como se detalló recientemente.

9.3.8. Obtención de euglobulinas:

Se inocularon intraperitonealmente ratones Balb/C de entre 12-16 semanas de vida con el compuesto B623 (7,5 mg/ Kg / ratón). A las 3-5 horas post inoculación animales anestesiados con eter se sangraron por la arteria ocular. La sangre se obtuvo en presencia de citrato de sodio (0,38 % P/V final) y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 10 minutos para obtener el plasma.

Para obtener las euglobulinas se mezclaron 100 µl de plasma citratado con 900 µl de agua fría desionizada y se acidificó a pH 5,5 con ácido acético 1% (V/V) (40 µl). Se incubó durante 40 min a 4 °C y se centrifugó a 2500 r.p.m., 10 min. El precipitado (euglobulinas) se disolvió en 100 µl de PBS (Hauert et al 1989). Una vez obtenida la euglobulina, se empleó para realizar los estudios de caseinólisis radial y zimografías.

9.3.9. Caseinólisis radial:

La determinación de la actividad fibrinolítica circulante sistémica total se realizó empleando la técnica de caseinólisis radial en placas de caseína-agarosa ricas en Pg (Saksela 1981). Se preparó una solución conteniendo agarosa 1,25 % en agua desionizada a 46 °C, con buffer tris 100 mM; pH 8,5 conteniendo 20 mg/ml de leche en polvo descremada como fuente de caseína y 2 µg/ml de Pg. Se añadieron 30 ml de esta solución a una placas de 12 x 8 cm, se enfrió a 4°C durante 15 minutos y se realizaron pequeños orificios de 4 mm de diámetro. En cada orificio se sembraron 10 µl de las euglobulinas en PBS y se incubó en una atmósfera

húmeda a 37°C durante 20 hs. Al cabo de este tiempo, se determinó el diámetro de las zonas líticas. Las áreas se compararon contra una curva standard de uPA realizada entre 1 y 10 UI/ml. Placas de caseína-agarosa sin Pg se emplearon para determinar la presencia de actividad caseinolítica independiente del Pg (Alonso et al 1993).

9.3.10. Zimografías:

Las euglobulinas recién preparadas se corrieron en SDS-PAGE empleando un gel separador 10% y un concentrador 4% (Laemmli 1970). Las muestras de euglobulinas de ratones controles o tratados con el compuesto B623 se sembraron con buffer de siembra (Tris 100 mM; Ficoll 60 mg/ml; SDS 50 mg/ml y azul de bromofenol 0,5 mg/ml; pH 6,8). Para realizar los estudios zimográficos los geles se lavaron con agua destilada y finalmente con una solución acuosa de Tritón X-100 (2,5%) para remover el exceso de SDS. Finalmente, los geles se incubaron sobre geles de caseína-agarosa ricos en Pg (Granelli-Piperno & Reich 1978) durante 20 hs a 37 °C en una atmósfera húmeda. Para incrementar la visualización entre las zonas lisadas y no lisadas los geles de agarosa se secaron y se tiñeron con amido black. Para confirmar la presencia de uPA se hicieron geles de agarosa conteniendo 1 mM de amiloride, una droga diurética que inhibe el uPA, sin tener efecto sobre el tPA y la plasmina (Vasalli & Bellin 1987). La actividad independiente del Pg se determinó en geles de caseína-agarosa que carecían de la enzima mencionada.

9.3.11. Agregación de células tumorales en plasma y videomicroscopía:

Una suspensión de células tumorales F3II (5×10^5 células/ml de MEM) se incubó en presencia de plasma de ratón normal (dilusión final 1:40) y se incubaron en tubos de vidrio en presencia o ausencia de heparina (5 μg/ml) y/o B623 (1-5 μM). A distintos tiempos (10 a 60 min) se tomaron alícuotas de la suspensión celular y se contaron y analizaron empleando un videomicroscopio (Olympus) y un procesador de imágenes (Mitsubishi) asociado al videomicroscopio.

9.4. RESULTADOS.

9.4.1. Ensayos de toxicidad de la heparina y N-des N-Ac.

Con el objeto de obtener una primera aproximación de las dosis tolerables por los ratones, se ensayó el efecto de varias dosis de heparina y N-des N-Ac, inyectadas por vía i.p. en un volumen de 0,3 ml a ratones normales (Tabla 9.1.).

TABLA 9.1. Estudio de la sobrevida de ratones normales Balb/c por la inoculación intraperitoneal de distintas dosis de heparina y heparina N-des N-Ac.

DOSIS AGUDA.

	dosis (mg/ratón)		**animales muertos**	
droga	**Hep**	**N-des N-Ac**	**Hep**	**N-des N-Ac**
	50	50	2 / 2	2 / 2
	25	25	2 / 2	2 / 2
	12	12	1 / 2	0 / 2
	6		0 / 2	

DOSIS CRÓNICA.

	dosis (mg/ratón/día)		**días de inoculación**		**animales muertos**		**dosis total recibida (mg/ratón)**	
droga	**Hep**	**N-des N-Ac**	**Hep**	**N-des N-Ac**	**Hep**	**N-des N-Ac**	**Hep**	**N-des N-Ac**
	6	12	2	4	1/2	1/2	12	48
	0,5	6	20	20	0/3	0/4	10	120
	0,1	3	20	20	0/12	0/2	2	60
		1,5		20		0/5		30

De la tabla que antecede puede deducirse que las dosis de heparina superiores a 25 mg/ratón matan al 100 % de los animales a las 24 hs, mientras que dosis de 12 y 6 mg matan al 50 % de los animales a las 24 y 48 hs respectivamente. En estos últimos, la dosis máxima tolerada fue de 12 mg/ratón.

Con dosis crónicas diarias, de 0,5 y 0,1 mg , todos los animales continuaron vivos al cabo de 20 inoculaciones.

En el ensayo realizado con la heparina modificada N-des N-Ac, dosis de 50 y 25 mg matan al 100 % de los animales a las 24 hs de la inoculación, mientras que dosis de 12 mg/ratón matan al 50 %, a las 96 hs, alcanzando una dosis total de 48 mg.

Las dosis de 0,5 mg/ratón para la heparina y 6 mg/ratón para la heparina N-des N-Ac fueron toleradas por los ratones al menos durante 20 días ya que el ensayó se suspendió sin registrarse muertes.

La autopsia de los animales inoculados con dosis de heparina superiores a 0,5 mg/ratón, mostraban múltiples hemorragias internas, mientras que los animales inoculados con N-des N-Ac solo se observaron hemorragias en la zona testicular cuando las dosis fueron superiores a los 6 mg. Así, los resultados de toxicidad y las autopsias indican que los animales son mucho mas sensibles a la heparina que a la heparina N-des N-Ac, lo cual es razonable por las diferencias en la actividad anticoagulante.

Sobre la base de estos ensayos se eligieron como dosis de inoculación para los posteriores estudios in vivo, 6 mg para N-des N-Ac y 0,5 mg para la heparina sin modificar.

9.4.2. Estudios del efecto de la heparina y N-des N-Ac sobre el desarrollo tumoral y las metástasis espontáneas.

Se realizaron dos experimentos para determinar el efecto de la heparina y del compuesto N-des N-Ac sobre el crecimiento tumoral y las metástasis in vivo (tabla 9.2.).

Las diferencias entre los dos experimentos radicó en el número de células inoculadas (200.000 y 300.000 células/ratón en el experimento 1 y 2 respectivamente), que modifica el tiempo de latencia y la velocidad del crecimiento tumoral. Otra diferencia estriba en el tamaño tumoral cuando se realizó la extirpación quirúrgica del tumor (2 mm en el experimento 1 y 3 mm en el experimento 2).

TABLA 9.2. Ratones Balb/c fueron inoculados con células M3 en la almohadilla plantar. Posteriormente recibieron inoculaciones intraperitoneales diarias de heparina (0,5 mg/ratón/día) y N-des N-Ac (6 mg/ratón/día). Se midió el crecimiento tumoral diariamente y el recuento de las metástasis pulmonares se realizó bajo lupa, 25 días después de la extirpación quirúrgica de los tumores.

	n	Crecimiento tumoral (mm/día)	Tiempo de latencia (día)	incidencia metastásica mediana (rango)
Experimento 1				
Control	9	0,12 ± 0,01	21	6/9 1 (0-6)
N-des N-Ac	8	0,11 ± 0,02	21	5/8 2 (0-9)
Heparina	7	0,12 ± 0,03	16	7/8 3 (0-9)
Experimento 2				
Control	10	0,20 ± 0,02	11	8/10 1,5 (0-11)
N-des N-Ac	8	0,16 ± 0.03 *	11	7/8 2,0 (0-4)
Heparina	8	0,20 ± 0.04	8	6/8 2,0 (0-33)

*; $p<0,05$ vs control.

El tiempo de latencia tumoral de los animales que recibieron heparina diariamente fue menor que el de los animales tratados con N-des N-Ac y los controles en ambos experimentos.

Se observó una disminución en el crecimiento tumoral cuando los animales fueron tratados con N-des N-Ac siendo significativa en el experimento 2, mientras que la heparina no afectó el crecimiento tumoral en ninguno de los dos ensayos.

Ni la heparina ni el compuesto N-des N-Ac mostró tener efecto sobre el número o la incidencia de metástasis espontáneas en pulmón.

Dado que el número de metástasis espontáneas para el tumor M3, es relativamente bajo, se estudió el efecto de la heparina y las heparinas modificadas empleando el modelo de metástasis experimentales que a pesar de que contempla los últimos pasos del proceso metastásico, el número de nódulos es mayor y se pueden detectar efectos antimetastásicos.

9.4.3. Efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre la formación de metástasis experimentales.

Se investigó el efecto de la heparina y las heparinas modificadas durante los pasos de la metástasis que involucran la circulación de las células tumorales por el lecho vascular hasta la extravasación, lo que demora de 1-4 horas después del ingreso de las células a circulación (Esumi et al 1991).

Teniendo en cuenta que la heparina se elimina rápidamente del organismo, y sabiendo que las inoculaciones i.p. ocasionan un pico máximo de actividad anticoagulante a las 2 horas, que luego retorna a los valores normales entre las 4 y 6 horas post inoculación (ver después capítulo N° 10), diseñamos un protocolo experimental que consistió en una inoculación previa (-90 minutos) y dos posteriores (+90 y 120 minutos) a la administración de las células tumorales por vía i.v. De esta manear, nos aseguramos que las heparinas se encuentre en circulación por lo menos las 4 horas críticas post-administración de las células tumorales.

La heparina disminuyó el número de metástasis pulmonares de las células LM3, mientras que ninguna de las heparinas modificadas tuvieron efecto antimetastásico (Figura 9.1.).

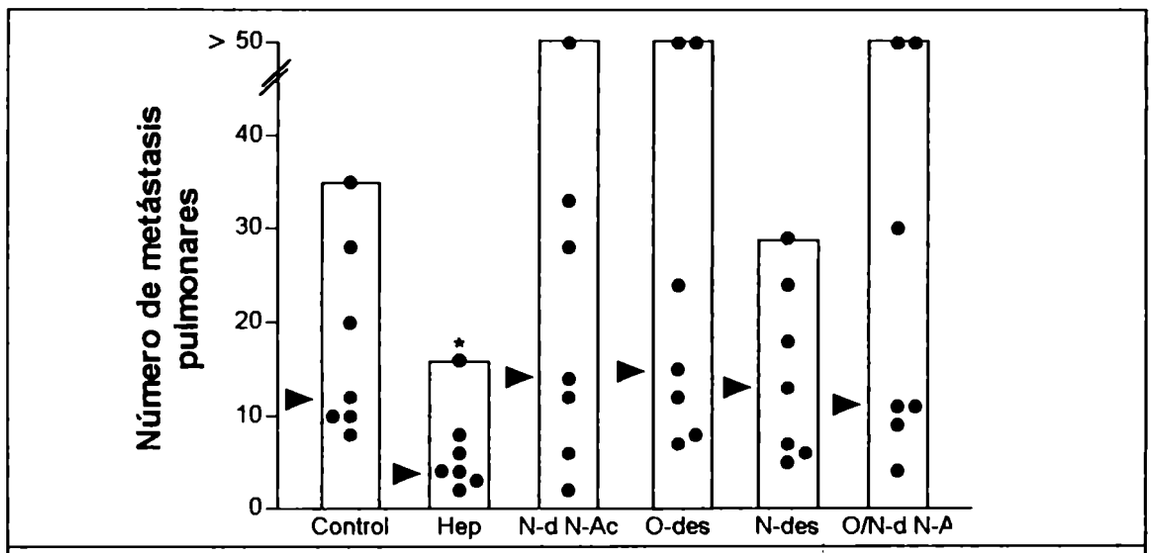


FIGURA 9.1. Efecto de la heparina y las heparinas modificadas sobre la formación de metástasis experimentales en pulmón. Se inocularon 2 x 10^5 células tumorales (LM3) por vía intravenosa a ratones controles o inoculados intraperitonealmente con las heparinas (0,1 mg/ratón), -90; + 90 y + 270 minutos de la administración de las células. Cada punto representa el número de nódulos metastásicos en pulmón de cada ratón después de 3 semanas de la inoculación de las células tumorales. Las flechas indican la mediana. *; $p<0,02$ vs control (Test Mann-Whitney)

9.4.4. Efecto del compuesto B623 en combinación con heparia sobre la formación de metástasis experimentales.

Para la realización de estos estudios, nosotros empleamos la línea celular F3II, ya que en este modelo se demostró que el compuesto B623 disminuye la invasión subcutánea local del tumor y aumenta el número de metástasis (Alonso et al 1996b).

La heparina inhibió la formación de metástasis experimentales con las células F3II, tal como se observó previamente para las células LM3 (Figura 9.2.).

El compuesto B623 que inhibe la fibrinólisis sistémica, no solamente aumentó las metástasis experimentales respecto del control, sino que revirtió el efecto antimetastásico de la heparina (Figura 9.2.).

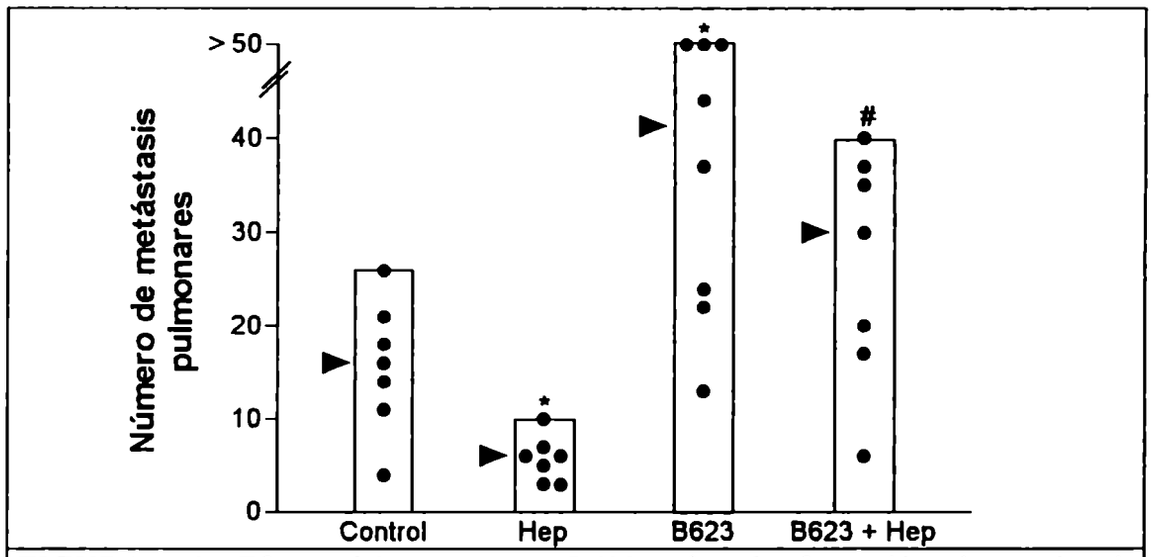


FIGURA 9.2. Efecto del compuesto B623 sobre la formación de metástasis experimentales en pulmón. Se inocularon 2 x 10^5 células tumorales F3II por vía intravenosa a ratones controles o inoculados intraperitonealmente con heparina o B623 como se describe en materiales y métodos. Cada punto representa el número de nódulos metastásicos por pulmón en cada ratón a las 3 semanas de la inoculación de las células tumorales. Las flechas indican la mediana. *; $p<0,02$ vs control; #; 0,01 vs tratado con heparina (Test Mann-Whitney)

9.4.5. Inhibición de la fibrinólisis por B623.

La actividad fibrinolítica circulante total se reduce considerablemente en ratones tratados con una única dosis de B623 (figura 9.3.A). El estudio de caseinólisis radial de las euglobulinas, no discrimina entre la fibrinólisis mediada por el activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), el uPA u otra vía. Con el objeto de corroborar que B623 inhibe la fibrinólisis

actuando selectivamente sobre el uPA, se realizaron estudios zimográficos de euglobulina de ratón normal en placa de caseína-agarosa rica en Pg con o sin B623. La figura 9.3.B. muestra que el compuesto B623 bloquea específicamente la banda lítica de 48 kDa, que corresponde al uPA (se discutirá con detalle el próximo capítulo).

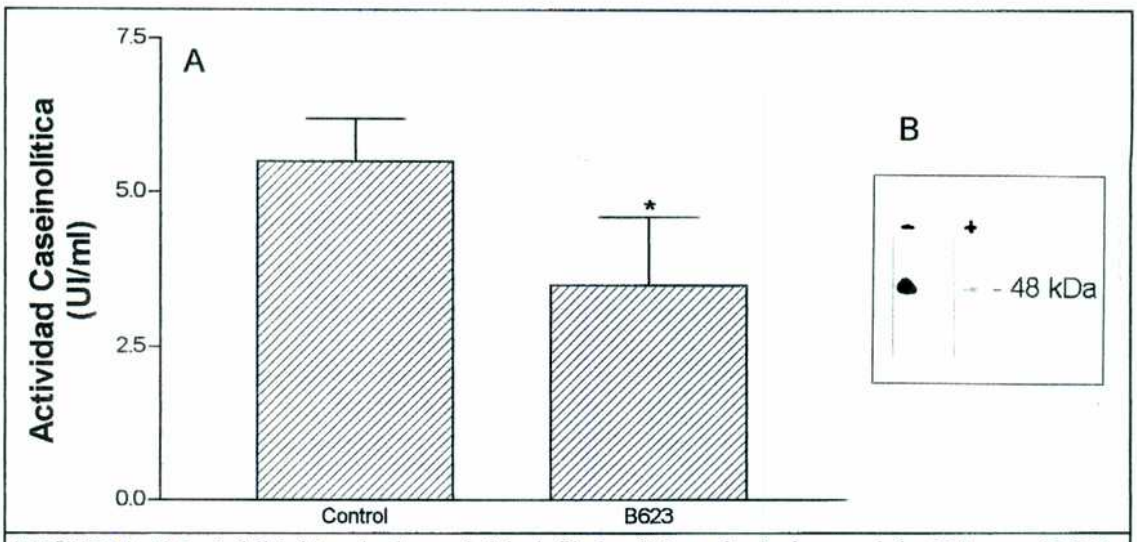


FIGURA 9.3. Inhibición de la actividad fibrinolítica sistémica y del uPA por B623. A) Actividad caseinolítica de fracciones de euglobulinas de plasma de ratones control o inoculados i.p. con B623 (7,5 mg/Kg/ratón) 5 horas post-inoculación. *; $p<0,05$ ANOVA. B) Zimografía de euglobulinas de plasma de ratón normal en placas de caseína-agarosa rica en Pg sin (-) o con (+) 10 μM de B623.

9.4.6. Agregación de las células tumorales en el plasma.

La células tumorales F3II se mantuvieron como suspensión monodispersa (80%) en el pasma normal después de 10 minutos de incubación. La adición de B623 indujo la formación de agregados celulares de manera dosis dependiente (figura 9.4. y 9.5.A y B) mientras que la heparina no tuvo efecto aún después de 60 minutos de incubación.

Las células tumorales de la suspensión control quedaron atrapadas en el coágulo de fibrina que se formó aproximadamente a los 60 minutos.

La heparina inhibió la formación del coágulo, contrariamente a lo que ocurrió con todas las dosis de B623 que facilitaron el entramado de la red de fibrina de manera tal que contenía a las células tumorales (figura 9.5.C). También se evidenció la formación de los depósitos de fibrina en las suspensiones de células tumorales cotratadas simultaneamente con heparina y B623.

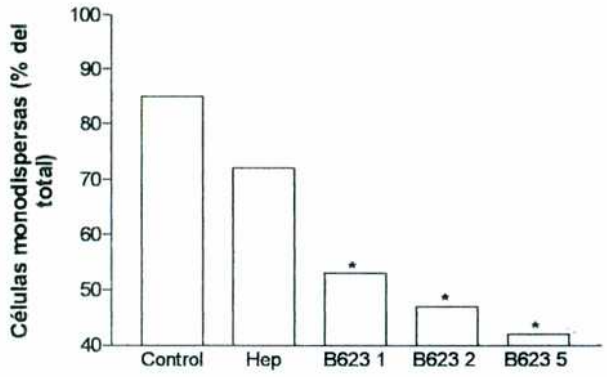


FIGURA 9.4. Agregación de las células tumorales F3II en el plasma normal conteniendo heparina o B623 (1, 2 o 5 μM) a los 10 minutos de incubación. Los valores son representativos de dos experimentos independientes. *; p<0,001.

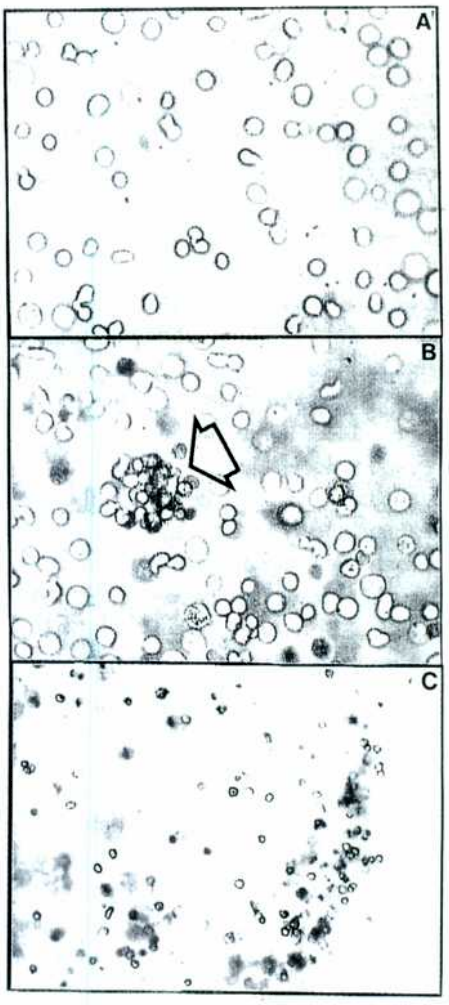


FIGURA 9.5. Agregación de las células tumorales y captura en la matriz de fibrina in vitro.

A) Suspensión de células F3II en presencia de plasma de ratón normal a los 10 minutos de incubación

B) Agregado celular (flecha) inducido por la adición de B623 (5 μM) a los 10 minutos.

C) Coágulo de fibrina y captura de las células tumorales en la matriz de fibrina a los 60 minutos. A y B 200 X; C 100 X.

9.5. DISCUSIÓN.

Dado que la heparina y la heparina N-des N-Ac inhiben el crecimiento de las células tumorales M3 in vitro, realizamos estudios con el objeto de conocer el efecto que ambos compuestos pudieran ejercer en el control del crecimiento tumoral y el desarrollo de las metástasis in vivo.

Los primeros experimentos se realizaron para determinar la toxicidad de ambas drogas in vivo mediante ensayos de toxicidad aguda. Observamos que ratones Balb/C normales sobreviven cuando se inoculan con dosis de 6 mg/ratón de heparina y 12 mg/ratón de N-des N-Ac. Loa ensayos de toxicidad crónica demostraron que una dosis de 12 mg de N-des N-Ac mata al 50 % de los animales luego de 4 inoculaciones diarias. Cuando se ensayó una dosis menor (6 mg) para N-desul N-Ac, observamos que todos los animales inoculados permanecían vivos al cabo de 20 inoculaciones, donde habían recibido una dosis acumulada de 120 mg/ratón. Aunque ensayamos dosis menores, decidimos comenzar nuestro trabajo con una dosis de 6 mg/día de N-des N-Ac y 0,5 mg/día para la heparina, porque conociendo la evolución del tumor M3 en pata, esperabamos realizar inoculaciones durante 20 días aproximadamente en los ratones portadores de tumor.

Los ratones tratados con heparina mueren como consecuencia de la actividad anticoagulante a juzgar por las multiples hemorragias internas masivas en los animales autopsiados. La mayor tolerancia a la heparina N-des N-Ac se asocia a la ausencia de actividad anticoagulante.

Se realizaron dos ensayos in vivo, sobre el crecimiento del adenocarcinoma mamario M3. Se observó que el tiempo de latencia tumoral de los animales que recibieron heparina fue menor que el de los animales tratados con N-des N-Ac y los controles.

No se observó diferencia ni en la incidencia metastásica ni en el número de nódulos por pulmón en ninguno de los grupos tratados con las drogas respecto del control.

La velocidad de crecimiento tumoral, fue levemente menor para el compuesto N-des N-Ac siendo significativa en el segundo experimento donde se inoculó un número mayor de células tumorales por lo que disminuyó el tiempo de latencia.

Varios interrogantes surgen de los ensayos:

a) ¿La disminución en el tiempo de latencia en los animales tratados con heparina, podría ser consecuencia del efecto angiogénico de la misma?

La heparina posee, aunque indirectamente, actividad angiogénica, lo que favorece el desarrollo tumoral. La heparina no es angiogénica por si sola, pero modula la acción de varios factores angiogénicos (J. Folkman et al 1989). Este fenómeno parece estar asociado a la capacidad de la heparina para unirse a los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) protegiéndolos de la desnaturalización y la hidrólisis enzimática (Rosengart et al 1988) y regulando la unión a sus receptores (Yayon et al 1991). El bFGF es un fuerte mitógeno de las células endoteliales y uno de los mas potentes inductores de la neovascularización (Folkman & Klagsbrun 1987). Se ha demostrado la presencia de bFGF en la membrana basal y en la ME (Gonzalez et al 1990) sugiriendo que ésta podría servir como un reservorio para el bFGF. La heparina puede liberar el bFGF de la ME (Bashkin et al 1989) y de esta manera ejercer su efecto angiogénico. Sin embargo, la heparina N-des N-Ac no libera al bFGF de la ME (Ishai-Michaeli et al 1992) y por lo tanto es probable que carezca de actividad angiogénica.

b) La observación de una leve disminución del crecimiento tumoral con la heparina N-des N-Ac y no con la heparina ¿puede ser consecuencia de que la dosis de la primera sea 12 veces superior?

c) ¿Se podría ejercer un efecto inhibitorio mayor aumentando la biodisponibilidad de las drogas en el organismo?

El tiempo de coagulación del plasma de animales inoculados con heparina mostró un pico máximo de actividad anticoagulante a las 2 horas post-inoculación y una eliminación completa del efecto a las 6 horas aproximadamente. Por otro lado, niguna de las heparinas modificadas mostró actividad anticoagulante (ver figura 10.4). Teniendo en cuenta la cinética de eliminación de la heparina en el animal, la inoculación i.p. de las heparinas en una única dosis diaria, estaría ejerciendo un pequeño pulso de actividad antiproliferativa sobre las células que se perdería rápidamente.

En humanos, la administración de grandes dosis de heparina, se logra mediante la inyección por vía intravenosa continua o intermitente. La actividad anticoagulante de la heparina desaparece de la sangre por aparente cinética de primer orden. La administración de

150 UI/Kg por vía intravenosa, a un paciente produce una concentración de heparina de 3 UI/ml en plasma, y la actividad anticoagulante desaparece con una vida media de 1,5 horas. Es por este motivo que la administración de la heparina en la terapia clásica se realiza por vía intravenosa mediante goteo continuo o la administración de una dosis inicial de 150 UI/Kg, seguida de dosis de 75 a 150 UI/Kg cada 4 a 6 horas. Además se realizán dosis intramusculares para conseguir efectos anticoagulantes agudos (McAvoy 1979).

Estas metodologías o protocolos de inoculación son de dificil implementación en ensayos largos donde se requiere observar efectos antiproliferativos y no anticoagulantes, debido a que en el caso de la heparina primaría el efecto anticoagulante y los animales moririan. Además el empleo de catéteres para infusiones durante periodos largos por goteo no son practicables en ratones.

Un estudio reciente en ratas, mostró que una heparina N-sustituida, retenia el efecto antiproliferativo sobre SMCs. En este ensayo la liberación sostenida se consiguió con un mecanismo que involucra la portación subcutánea de una bomba que permite la liberación controlada y sistemática del GAG (Pukac et al 1991, Edelman & Karnovsky 1994).

La baja biodisponibilidad de las heparinas, dificultan los estudios que permitan dilucidar su mecanismo de acción sobre el desarrollo tumoral in vivo. En el mismo sentido, el número bajo de metástasis espontaneas del tumor M3, no permite detectar inhibiciones que resulten claras y estadísticamente significativas. Sin embargo, se puedo estudiar la acción de la heparina sobre la diseminación metastásica empleando ensayos de metástasis experimental que involucran la inoculación de células tumorales por via endovenosa. Este procedimiento tiene la ventaja de que aumenta considerablemente el número de nódulos metastásicos respecto de los ensayos de metástasis espontáneas, lo que permitiría observar efectos inhibitorios. Además el tiempo requerido de la droga en circulación es menor, con lo que se puedo resolver parcialmente el inconveniente de la baja biodisponibilidad. Por estos motivos, nosotros iniciamos estudios para establecer el rol de la heparina sobre el desarrollo de las metástasis y sus posibles mecanismos de acción empleando ensayos de metástasis experimentales.

Al ingresar las células tumorales en el lecho vascular, estas interactúan con varios componentes del sistema homesostático. Estas interacciones derivan en la deposición de fibrina

circundante a las células, lo que genera la formación de microtrombos que facilitan el proceso metastásico (Constantini & Zacharsky 1992; Rickles & Eduards 1983). También debe interactuar con el endotelio vascular en el sitio donde originará las metástasis y posteriormente con la matriz extracelular del órgano blanco.

Nosostros observamos que la heparina inhibió la formación de metástasis mientras que todas las heparinas modificadas carecían de esta propiedad.

El efecto antimetastásico de la heparina, con el modelo y el protocolo empleado, podría explicarse de diversas maneras: La primera asociada con cambios de las heparinas sobre la coagulación o la fibrinólisis lo que afectaría a las células tumorales cuando se encuentran en circulación. La segunda se vinculan con efectos de las heparinas modulando la adhesión al endotelio vascular o la inhibición de heparanasas durante la extravasación.

A primera vista, los resultados en nuestro modelo tumoral, parecerían mostrar una asociación entre la actividad anticoagulante y antimetastásica de la heparina, dado que todas las heparinas modificadas no tuvieron efecto antimetastásico. Sin embargo, la disminución de metástasis por la heparina, se revirtió por un inhibidor selectivo del uPA. ¿Podría entonces, el mecanismo estar mediado por la actividad fibrinolítica? El compuesto B623 inhibió la fibrinólisis sistémica actuando a través de un descenso en la actividad del uPA, lo que ocaciona un aumento en la deposición de fibrina intravascular y particularmente pericelular. Los estudios in vitro demuestran que el efecto deriva en la agregación de las células tumorales pudiendo ser esta la causa del incremento en el número de metástasis.

La heparina no indujo la formación de agregados celulares y evitó la formación de la red de fibrina in vitro. En este caso, el efecto puede estar mediado por la actividad anticoagulante principalmente, pero también por las propiedades profibrinolíticas. En este sentido, un entramado de fibrina más amorfo se observó con el tratamiento conjunto de heparina y B623. La acción de la heparina y particularmente la de las heparinas modificadas en la fibrinólisis mediada por uPA no se conocen, por lo que nosotros realizamos estudios para esclarecer sus propiedades y el mecanismo de acción que se describirán en el próximo capítulo.

Se describió una relación directa entre el incremento de la coagulación y la capacidad metastásica de varios tipos de cáncer, atribuyéndose este fenómeno a la producción de factores

procoagulantes por parte de las células tumorales (Curatolo et al 1979; Pearlstein et al 1981; Esumi et al 1987; Zacharski et al 1993). Nosotros estudiamos la producción de factores procoagulantes por parte de las células M3 y F3II y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 11. El incremento de la coagulación facilita el arresto de las células metastásicas en el órgano blanco. De esta manera la actividad antimetastásica de la heparina se asociaría con su actividad anticoagulante, contrarrestando la actividad procoagulante generada por la presencia del tumor (Al-Mondhiry 1984, Carty et al 1992). En nuestro estudio, la fluidez sanguínea sería mayor a la normal en los ratones tratados con heparina y esto dificultaría la formación de metástasis.

A pesar de que las células tumorales podrían activar el mecanismo de la coagulación, un descenso efectivo de los depósitos de fibrina circundantes a las células no resulta tan evidente. Varios tumores tienen incrementada la expresión del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Esta enzima tiene un papel central en la destrucción de la ME durante la invasión tumoral. Sin embargo, en nuestro modelo tumoral, un aumento en la producción de uPA peritumoral se vio acompañada de un descenso de la actividad de uPA circulante (Alonso et al 1993). Más aún, el tratamiento de los ratones con el inhibidor selectivo del uPA (B623) disminuyó la invasión subcutánea local del tumor, pero incrementó las metástasis (Alonso et al 1996). Por lo tanto, un descenso en la actividad fibrinolítica, podría contribuir al estado hipercoagulable y a la malignidad (Kwaan 1992). La pregunta que se necesita responder es ¿Cuál es el rol que desempeña la heparina en la fibrinólisis mediada por uPA?.

10. FIBRINOLISIS MEDIADA POR EL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO TIPO UROQUINASA

10.1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior observamos que la actividad antimetastásica de la heparina se revirtió por un inhibidor específico del uPA. Esto nos indujo a pensar que el efecto antimetastásico podría estar asociado con la actividad fibrinolítica de la heparina.

Un aumento en la fibrinólisis podría contribuir en evitar la diseminación de metástasis (Rocha et al 1989; Alonso et al 1993). Los depósitos de fibrina pueden proteger a las células tumorales circulantes del trauma mecánico y la destrucción por parte de células del sistema inmune del huésped, facilitando también su arresto en la microcirculación (Esumi et al 1991). Por consiguiente, la actividad profibrinolítica de la heparina podría ser la causa de la actividad antimetastásica.

Los activadores de plasminógeno (Pg) son serino proteasas que convierten Pg en plasmina. Se han descripto dos activadores de Pg, el de tipo tisular (tPA) involucrado principalmente en procesos asociados a la trombosis, y el de tipo uroquinasa (uPA) asociados fundamentalmente a eventos de remodelación tisular, invasión y metástasis (Laiho & Keski-Oja, 1989). El uPA participa en la degradación de fibrina asociada al tumor, así como también en la lísis de componentes de la ME y la membrana basal (Bal de Kier Joffé et al 1991; Bauri et al 1992). El mecanismo es indirecto y esta asociado a la vía pro-uPA-uPA/ Pg-plasmina. Esta última enzima es la encargada de degradar al fibirnógeno, al colágeno tipo IV y a la laminina (Liotta et al 1981).

Estudios in vitro han demostrado que la actividad profibrinolítica de la heparina se asocia a un aumento en la tasa de activación del Pg (Wun et al 1982). Tanto el tPA, como el uPA convierten mas eficientemente el Pg en plasmina cuando la reacción ocurre en presencia de heparina. Mas aún, la heparina se une al Pg, al tPA y al uPA (Pâques et al 1986; Andrade-Gordon & Strickland 1986; Stein et al 1989). Estos hechos, han permitido especular acerca de que la heparina favorece la generación de plasmina actuando como templado para unir tPA y

Pg, de manera análoga a la que ocurre entre la trombina y la ATIII (Andrade-Gordon & Strickland 1986; 1990). Además, la actividad cofactora en la unión tPA-Pg, al igual que para tr-ATIII, es dependiente del tamaño (número de unidades sacarídicas) de la heparina (Edelberg et al 1991). La mayor parte de las investigaciones se han centrado en la vía tPA / Pg, pero poco se conoce de la vía uPA / Pg. La actividad profibrinolítica de la heparina no puede ser explicada únicamente en términos de asociaciones moleculares entre activadores de Pg y Pg favorecidas por la heparina, con el consiguiente aumento en la tasa de activación. En esta línea de pensamiento hay dos hechos que resultan sumamente importantes. Las células endoteliales poseen un gran potencial profibrinolítico como consecuencia de la presencia de uPA en receptores específicos de la membrana plasmática (Todd 1977; Blasi 1988) y la heparina tiene la capacidad de liberar esta enzima (Markwardt & Klöcking 1977; Vairel et al 1983; Stephens et al 1991)

Las fracciones de euglobulinas obtenidas de plasmas de ratas tratadas con heparina tenían incrementada la actividad fibrinolítica, al igual que con heparinas modificadas mediante oxidación con periodico a pesar de que perdían la actividad anticoagulante (Porta et al 1989). Se observó que heparinas de alto peso molecular poseen actividad fibrinolítica, mientras que heparinas de bajo peso molecular no (Vinazzer et al 1982). La falta de asociación entre actividad anticoagulante y profibrinolítica en la heparina podría explicarse si los sitios de unión con ambas enzimas (ATIII o uPA) y/o por ambos "sustratos" (Tr o Pg) fueran diferentes. Por otro lado, también podría justificarse si heparinas distintas, tuviesen diferentes capacidades para liberar uPA del endotelio vascular.

Los mecanismo fisiológico que opera en la actividad fibrinolítica de la heparina mediada por uPA no se conocen, así como tampoco las consecuencias que podría acarrear en el desarrollo tumoral. En este sentido se podría hipotetizar que un aumento de la fibrinólisis mediada por uPA en el lecho vascular contribuiría en el daño de las células tumorales en circulación disminuyendo las metástasis. Sin embargo, un aumento de la actividad del uPA a nivel tisular contribuiría en los procesos migratorios e invasivos de las células tumorales.

10.2. OBJETIVOS.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar la actividad fibrinolítica de la heparina y las heparinas modificadas mediada por uPA, intentando esclarecer los mecanismos fisiológicos que operan en este proceso.

10.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

10.3.1. Ensayos de unión del Pg y el uPA a las heparinas:

Se determinó la afinidad relativa de las heparinas por el Pg y el uPA empleando el método de Belfort y colaboradores (Belfort et al 1992) que se basa en estudios de competencia por la unión a heparina-Sepharosa CL-6B. Se hidrataron 10 mg de hep-Seph en tubos eppendorf con 200 µl de PBS. Después de 24 hs, se eliminan 150 µl del sobrenadante y se añadieron 20 µl conteniendo distintas concentraciones de heparina o las heparinas modificadas (hasta 1000 µg) y 10 µl de Pg (5 µg) o uPA (2500 UI/ml, aproximadamente 5 µg). La suspensión se incubó a 4°C durante 2 hs con agitación suave. Se centrifugó a 5000 r.p.m. y el precipitado se lavó dos veces con PBS, se añadió buffer de siembra (Tris 100 mM; Ficoll 60 mg/ml; SDS 50 mg/ml y azul de bromofenol 0,5 mg/ml; pH 6,8), se calentó a baño María dos minutos y el sobrenadante obtenido luego de centrifugar a 1000 r.p.m. 10 min se corrió en SDS-PAGE empleando técnicas standard (Laemmli 1970). Los geles se tiñeron con Coomasie Blue y las bandas de Pg o uPA se cuantificaron densitometricamente.

10.3.2. Caseinólisis radial:

La determinación del efecto de las heparinas sobre la actividad del uPA se realizó en placas de caseína-agarosa ricas en Pg (Saksela 1981) como se describió en el punto 9.3.9. pero en lugar de determinar la fibrinólisis sistémica empleando euglobulinas se determinó el efecto de las heparinas sobre la actividad del uPA. Para ello se prepararon placas de petri de 35 mm conteniendo 2 ml de caseína, agarosa y Pg en el buffer y a la concentración descripta, con o sin el agregado de las distintas heparinas (0 a 100 µg/ml). Se enfrió a 4°C durante 15 minutos y se realizaron pequeños orificios de 4 mm de diámetro en los geles donde posteriormente se añadieron 10 µl de uPA (0,612 o 1,25 UI/ml). Finalizada la incubación en una atmósfera húmeda a 37 °C durante 20 hs se determinó el diámetro de las zonas líticas comparándose las áreas contra una curva standard de uPA realizada entre 0,1 y 10 UI/ml, preparadas en placas control sin heparinas.

10.3.3. Animales y tratamientos in vivo:

Se inocularon por vía i.p. ratones Balb/C de entre 12-16 semanas de vida con heparán sulfato, heparina y las heparinas modificadas (0,5 mg/0,3 ml PBS/ratón). A distintos tiempos

post inoculación (de 0 a 6 hs) los animales anestesiados se sangraron por la arteria ocular obteniéndose la sangre en presencia de citrato de sodio (0,38 % P/V final). Se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 10 minutos para obtener el plasma.que se guardó a -70 °C.

10.3.4. Valoración del efecto anticoagulante de la heparina y las heparinas modificadas químicamente:

El tiempo de coagulación se determinó midiendo la formación del coágulo por acción de la tromboplastina (tiempo parcial de tromboplastina) (PTT) empleando tromboplastina tisular (MeDiTech inc., CA, USA) para la activación de la trombina siguiendo procedimientos standard. Se añadió 200 µl del reactivo a 100 µl de plasma citratado obtenido de los ratones controles o inoculados con las distintas heparinas, y se determinó manualmente con cronómetro el tiempo que transcurre para formarse el coágulo. La reacción se realizó a 37 °C. Las diferencias entre mediciones duplicadas fue siempre inferior al 10% de la media.

10.3.5. Obtención de euglobulinas:

Se realizaron con el mismo procedimiento descripto en el punto 9.3.8. Una vez obtenidas las euglobulinas, se emplearon para realizar los estudios de zimografía y de western blot.

10.3.6. Zimografías:

Se realizaron estudios zimográficos de las euglobulinas obtenidas de ratones inoculados con las distintas heparinas y a diferentes tiempos, tal como se expresa en el punto 9.3.10.

10.3.7. Western blotting:

Las proteínas de las euglobulinas se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de acuerdo con el método de Kyhese-Andersen (1984), empleando el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Richmond, CA). El uPA se detectó con anticuerpos de conejo anti-uPA murino, empleando como segundo anticuerpo uno cabra anti-conejo conjugado con biotina, el que se reveló con extravidina fosfato como fue descripto (Alonso et al 1993). Las bandas se cuantificaron densitométricamente.

10.3.8. Análisis densitométrico:

Los geles de poliacrilamida, las zimografías y los western blot se leyeron empleando un densitómetro Bio-Rad (modelo GS-670) y se cuantificaron empleando el programa Analizador de Imagen versión 1.1 de Bio-Rad.

10.4. RESULTADOS.

10.4.1. Unión de las heparinas a Pg y uPA.

La capacidad de la heparina y las heparinas modificadas para unirse al uPA y al Pg se realizó mediante estudios de competencia de las mismas para impedir la interacción con heparina-Sepharosa. Las cantidad de proteína unida se estudio comparativamente luego de una corrida electroforética en SDS -PAGE y el posterior análisis densitométrico de las bandas.

La afinidad de la heparina soluble por el Pg fue menor que el de la heparina unida a la Sepharosa. Esto se deduce a partir de la cantidad de heparina existente en 10 mg de hep-Seph. (8 µg) y de la cantidad de heparina necesaria para conseguir un 50% de desplazamiento (500 µg aproximadamente) lo que equivale a 60 veces de exceso molar. Todas las heparinas N-desulfatadas (N-des; N-des N-Ac y O/N-des N-Ac) así como el heparán sulfato no se unieron al Pg. Sin embargo la heparina parcialmente O-des puede unirse parcialmente al Pg aunque con menor afinidad (50 % de inhibición se obtuvo con 110 veces de exceso molar) (Figura 10.1. A).

La heparina también se unió al uPA, requiriendo valores similares de exceso molar para obtener un 50% de inhibición (60 veces). Este resultado concuerda con valores de Kd publicadas para la unión de la heparina al Pg y al uPA (2.11 y 2.9 µM respectivamente) (Andrade-Gordon & Strickland 1986).

La unión del uPA a la hep-Seph fue inhibida principalmente por la heparina, pero también aunque en menor medida por O-des, N-des y heparán sulfato. Las otras dos heparinas estudiadas (N-des N-Ac y O/N-des N-Ac) al igual que lo observado con el Pg, no se unieron al uPA (Figura 10.1. B).

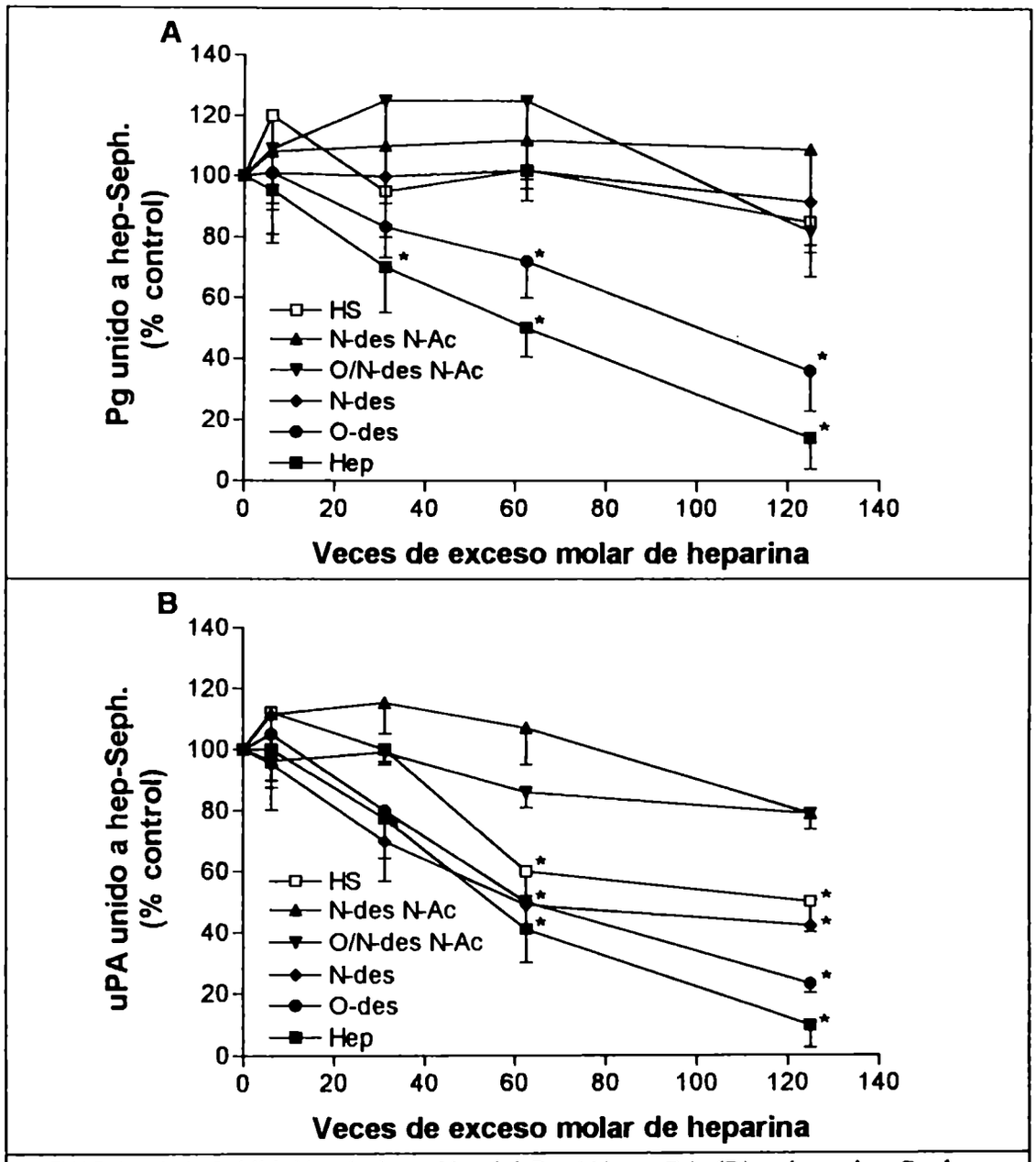


FIGURA 10.1. Inhibición de la unión del Pg (A) y uPA (B) a heparina-Sepharosa por el agregado de concentraciones crecientes de heparina o heparinas modificadas. La proteína remanente unida se corrió en SDS-PAGE y se analizó densitométricamente. Los valores de cada punto representan la media normalizada respecto de tres valores obtenidos sin heparina (100%) (media ± DS ; n=3)*;$p<0,05$.

10.4.2. Actividad caseinolítica inducida por uPA en presencia de heparinas.

El efecto de la heparina en la actividad caseinolítica del uPA se midió en placas de caseína-agarosa ricas en Pg, conteniendo concentraciones crecientes de heparina. La actividad del uPA se incremento de manera dosis-dependiente. Con actividades iniciales de uPA de 1,25 UI/ml se observaron curvas de tipo campana con un máximo cuando la concentración de heparina era de 50 µg/ml. Esta curva es típica de la formación de complejos ternarios en la que uno de los componentes (heparina) actúa como templado. Como era esperable la concentración de heparina para observar el pico máximo en la curva disminuyó al bajar la concentración de uPA (25 µg/ml de heparina para 0,625 UI/ml de uPA) (Figura 10.2.).

Para determinar si el aumento de la actividad caseinolítica era consecuencia de un incremento en la activación del Pg por uPA y no un efecto directo sobre la actividad de la plasmina, se realizaron ensayos con plasmina preformada (0,5 y 1 UI/ml). La presencia de heparina no modificó la actividad caseinolítica de la plasmina, confirmando estudios previos realizados sobre la actividad amidolítica (Andrade-Gordon & Strikland 1986).

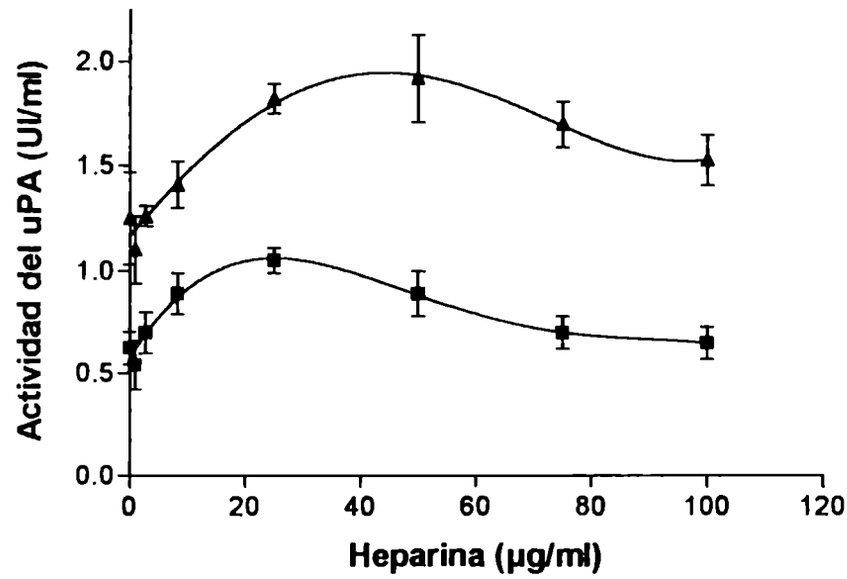


FIGURA 10.2. Efecto de la heparina sobre la actividad caseinolítica inducida por el uPA en placas de caseina-agarosa ricas en Pg. Cada punto representa la media de tres determinaciones independientes (media ± DS; n=3).

Se estudió también la capacidad de las heparinas modificadas para activar el Pg en presencia de uPA con el objeto de ver si existe una correlación con la capacidad de unión de

las mismas a ambas enzimas. Ninguna de las heparinas modificadas ni el heparán sulfato mostró actividad cofactora (Figura 10.3.).

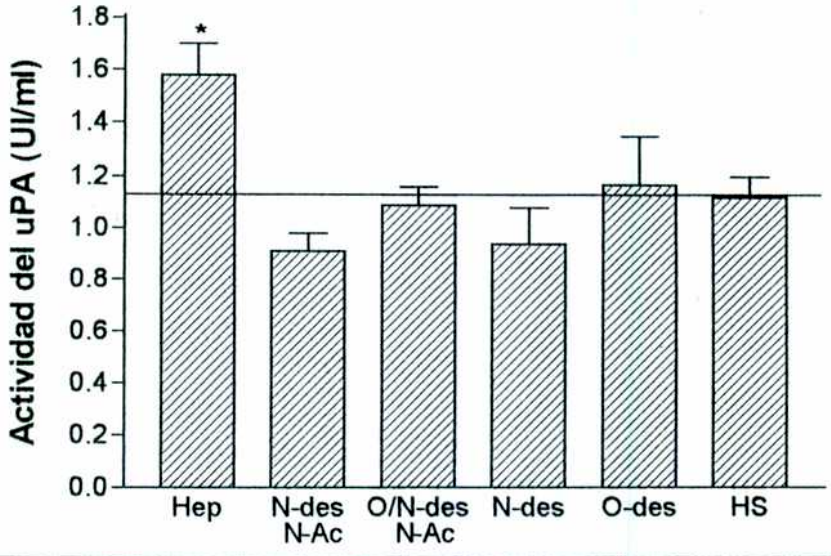


FIGURA 10.3. Efecto de las heparinas modificadas en la actividad caseinolítica del uPA. Una UI/ml de uPA se sembró en placas de caseína-agarosa ricas en Pg conteniendo cada una de las heparinas modificadas o heparán sulfato (25 µg/ml). *;$p<0,05$.

10.4.3. Valoración del efecto anticoagulante de la heparina y las heparinas modificadas.

La figura 10.4. muestra el efecto de la heparina y todas las heparinas modificadas sobre el tiempo de coagulación de los plasmas de ratones en función del tiempo post-inoculación.

Se observa que ninguna heparina modificada en cualquiera de los grupos sulfato, posee efecto anticoagulante, incluso con dosis 12 veces superiores.

A los 30-60 minutos post-inoculación de la heparina, puede detectarse un aumento significativo en el tiempo de coagulación. Este incremento es progresivo, alcanzando un pico máximo a las 2 horas post-inoculación. El retorno a los valores basales de actividad anticoagulante se observa a las 6 horas.

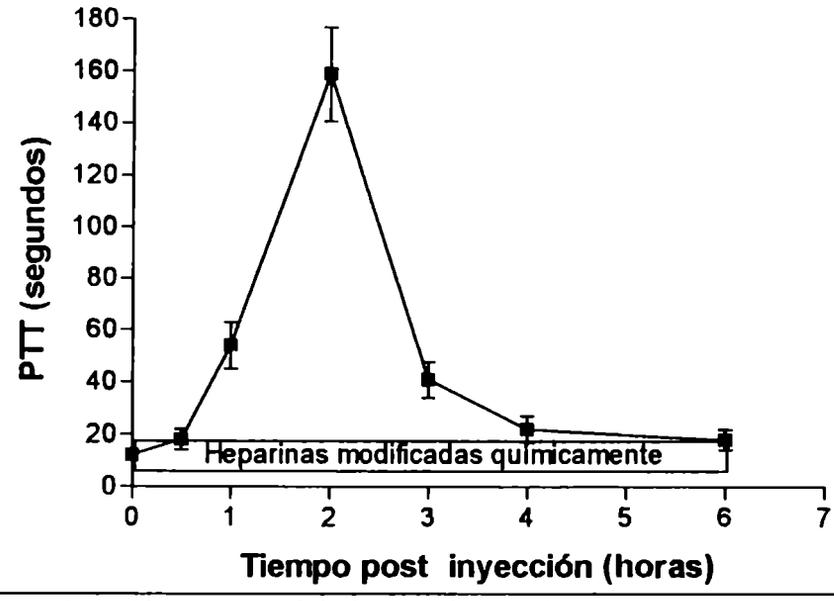


FIGURA 10.4. Tiempo parcial de tromboplastina (PTT) de plasma de ratones obtenido a distintos tiempos después de recibir inoculaciones i.p. conteniendo heparina (■) o todas las heparinas modificadas (0,5 mg/0,3 ml/ ratón) o N-des N-Ac (6 mg/0,3 ml) (interior del rectángulo).

10.4.4. Fibrinólisis mediada por uPA ex vivo.

Los estudios zimográficos de las euglobulinas obtenidas de ratones normales revela la presencia de dos bandas con poca actividad de 134 y 160 kDa y dos zona de gran degradación caseinolítica de 47 y 88 kDa (Figura 10.5.A). No hubo degradación en la banda correspondiente a 47 kDa cuando los ensayos se realizaron en placas conteniendo amiloride (1 mM), un fuerte inhibidor del uPA. Este resultado, conjuntamente con el western (ver mas adelante) confirmó que la banda de 47 kDa corresponde al uPA.

En los estudios zimográficos realizados en placas de caseína-agarosa carentes de Pg solo se observó la banda de 88 kDa y no se inhibió por tratamiento con anticuerpos anti - tPA o anti - uPa (Alonso et al 1993). Estos resultados, sumados a el peso molecular (88 kDa) muestran que esta banda corespondería a la actividad de la calicreína.

Las euglobulinas de los ratones tratados con heparina mostraron un aumento en la actividad tanto del uPA como de la calicreína, con un máximo a las dos horas postinoculación. Los estudios densitométricos revelaron incrementos entre 4-5 veces de degradación para la calicreína y 2-3 veces para el uPA (Figura 10.5. B y C).

La banda zimográfica de 47 kDa corresponde a uPA murino ya que coincidió con los estudios de western blot. El análisis densitométrico del western reveló el mismo patrón que el

observado para la zimografía (Figura 10.5.B). Estos resultados muestran que el aumento observado en las zimografías de los ratones tratados con heparina se debe a un incremento del contenido de uPA circulante más que a un incremento de la actividad enzimática asociado a una actividad cofactora de la heparina.

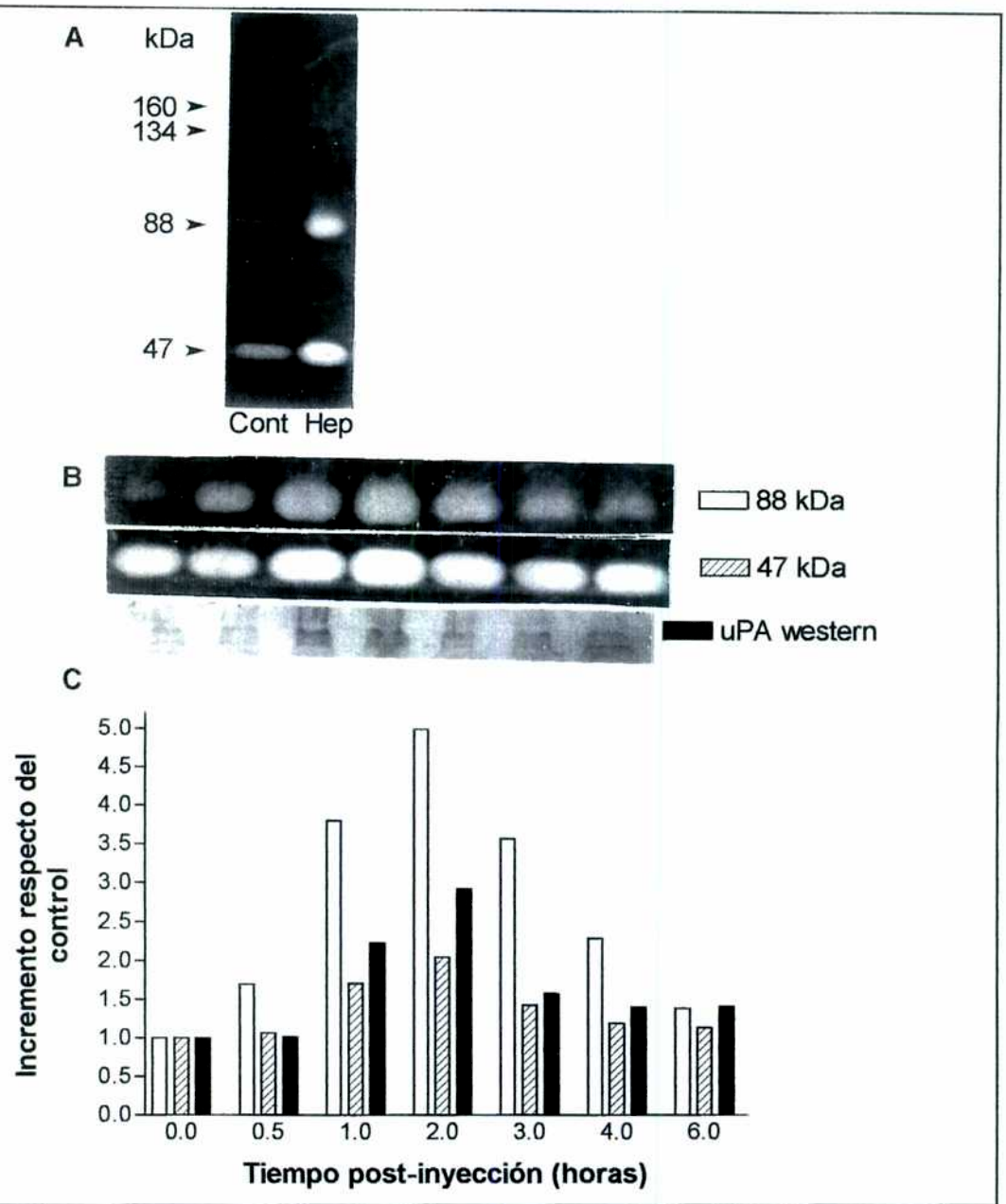


FIGURA 10.5. (A) Zimografías de euglobulinas obtenidas de plasma de ratones normales inoculados i.p. con heparina (0,5 mg/ratón). (B) Bandas caseinolíticas de 47 y 88 kDa de zimografías y western blot anti-uPA (47 kDa) de euglobulinas obtenidas de plasmas de ratones a diferentes tiempos post-inoculación con heparina. Análisis densitométricos de los resultados mostrados en B.

Sumamente interesante fue el hecho de que la adición de heparina (5 μg/ml) a plasma de ratón normal tanto antes y como después de la obtención de euglobulinas mostró que las

bandas zimográficas de uPA y calicreína estaban aumentadas respecto del plasma de ratón normal sin adición exógena de heparina, aunque no se observaron diferencias entre ellas. Este resultado muestra que la heparina no aumenta la precipitación del uPA al obtener las euglobulinas pero existiría un mecanismo de activación enzimático in vitro. Más aún, en estudios realizados en placas de caseína-agarosa, sin Pg solo se observó la banda de calicreína la cual también se incrementó por la adición de heparina exógena. Este resultado concuerda con datos previos que muestran un mecanismo de activación in vitro de la calicreína por la heparina vía el factor XII (Vinazzer et al 1982) lo que indica que el incremento detectado en las bandas en estas condiciones experimentales, esta mediado por esta vía y que el aumento en la banda de uPA podría deberse a la activación de este por calicreína. Esto se confirmó mediante estudios de western blot anti-uPA, en los cuales el agregado de heparina no incrementó el contenido de uPA, indicando que este mecanismo solamente opera in vivo.

Con el objeto de establecer la acción de las heparinas modificadas en la fibrinólisis mediada por uPA, se realizaron zimografías con las euglobulinas de animales inoculados con las distintas heparinas. Aquellas que retenían parcialmente la afinidad por el uPA, (O-des; N-des y heparán sulfato) mostraron un incremento en la lísis mientras que aquellas que carecen de afinidad por uPA (N-des N-Ac y O/N-des N-Ac) no tuvieron efecto (Figura 10.6.). Las heparinas modificadas tuvieron muy poco efecto sobre la actividad de la calicreína.

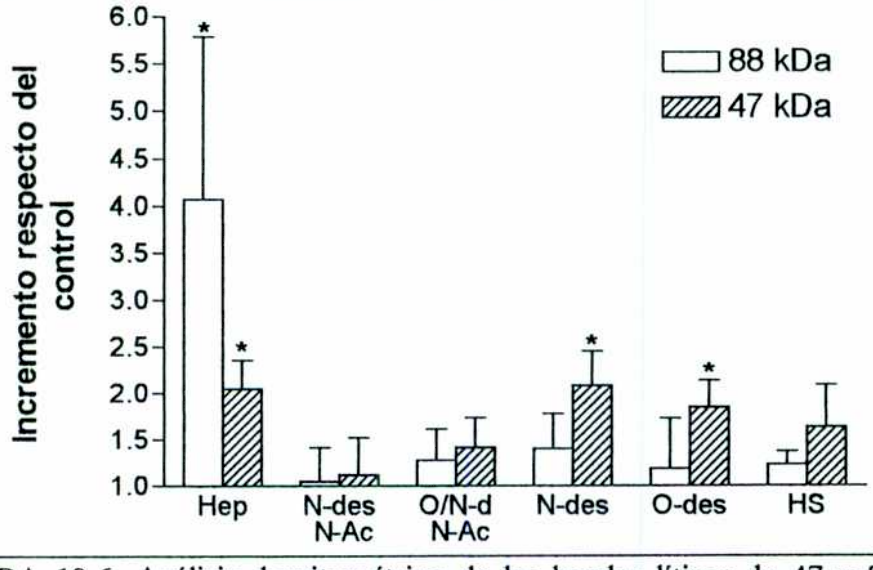


FIGURA 10.6. Análisis densitométrico de las bandas líticas de 47 y 88 kDa de zimografías de euglobulinas obtenidas de ratones inoculados con las distintas heparinas modificadas (0,5 mg/ratón) a las 2 hs post inoculación (media ± DS; n=3) * ;p<0,05.

10.5. DISCUSIÓN.

La activación del Pg mediada por uPA juega un papel muy importante en reacciones proteolíticas que involucran eventos pericelulares como la migración, la ovulación, la embriogénesis, la remodelación tisular y la invasión (Danø et al 1985). La conversión de Pg a plasmina en la vasculatura se atribuye fundamentalmente al tPA (Amiral et al 1990). Sin embargo, trabajos realizados en humanos y en murinos sugieren que el uPA podría contribuir de manera importante en los eventos fibrinolíticos aunque su mecanismo de acción se adjudica a la vía factor XII / precalicreína / pro-uPA / Pg (Hauert et al 1989; Alonso et al 1993).

Las fracciones de euglobulinas mostraron dos bandas débiles de 134 y 160 kDa que posiblemente correspondan a activadores de plasminógeno acoplados a los inhibidores (PAI I y PAI II -inhibidor del activador de Pg de tipo I y de tipo II respectivamente). La banda lítica de 47 kDa se inhibió con amiloride y coincidió en PM con el western anti-uPA, indicando que se trata de dicho activador. La otra banda de 88 kDa corresponde a la calicreína a juzgar por su PM, porque la actividad caseinolítica fue independiente del Pg, no se inhibió por anti-tPA o anti-uPA y la actividad aumentó cuando la heparina se inoculó en los ratones o se la agregó exógenamente al plasma (Vinazzer et al 1982; Alonso et al 1993).

Varios mecanismos podrían explicar la actividad fibrinolítica de la heparina mediada por uPA in vivo:

1) La **actividad cofactora**, aumentando la interacción entre el Pg y el uPA , tal como ocurre in vitro (nuestros resultados; Pâques et al 1986; Andrade-Gordon & Strikland 1986). Tanto la heparina como O-des se unieron al Pg y al uPA, aunque solamente la heparina mostró las curvas de tipo campana en la activación del Pg a plasmina. Estas curvas son típicas de la formación de complejos ternarios y han sido descriptas previamente para la interacción ATII-tr (Casu 1985; Evans et al 1992; Chang 1989) y tPA-Pg (Andrade-Gordon & Srickland 1986; 1990) en presencia de heparina, así como también en las clásicas curvas de precipitación por interacciones antígeno-anticuerpo. Teniendo en cuenta que las modificaciones químicas realizadas en las heparinas son parciales y azarosas, es posible que dentro de la heparina O-des se conserven los grupos para interactuar con el Pg y el uPA pero que no estén lo suficientemente cerca o espacialmente orientados para formar el complejo y facilitar la

activación. De todas maneras, la activación cofactora de la heparina no parece ser un mecanismo importante en la fibrinólisis mediada por uPA in vivo teniendo en cuenta que heparinas como O-des, N-des y el HS aumentaron la actividad casinolítica circulante del uPA aún cuando carecen de actividad cofactora in vitro y tienen disminuida o ausente la capacidad para unirse al Pg y al uPA.

2) Otro mecanismo puede ser por un incremento de la fibrinólisis mediada por la **activación del factor XII / calicreína** / uPA (Vinazzer et al 1982; Kluft et al 1979; Moskowitz et al 1970). Los ensayos zimográficos de euglobulinas obtenidas de ratones inoculados con heparina muestran una correlación entre los incrementos de la actividad de la calicreína y del uPA. Mas aún, la adición exógena de heparina al plasma y a las euglobulinas aumentó la banda de 88 kDa.

El efecto de las heparinas modificadas sobre la activación del factor XII no se conoce y requerirían técnicas mas directas que las zimografías para la interpretación de los resultados. Sin embargo los ratones inoculados con O-des; N-des y HS poseen un aumento en la banda de uPA respecto de los controles a pesar de que la banda de 88 kDa no mostraba mayores diferencias.

3) Finalmente, el incremento en la actividad fibrinolítica podría deberse a un **aumento en los niveles plasmáticos de uPA**, como se observó en el western blot. Este incremento podría ser consecuencia de un aumento en la biosíntesis de uPA, un aumento de su vida media o la liberación del uPA asociado a los receptores de las células endoteliales.

El aumento de la biosíntesis de uPA no parece ser la mejor explicación teniendo en cuenta que dos horas (el tiempo en el que se observa la mayor estimulación) resulta muy corto para que ocurra la síntesis y la exportación del uPA. La heparina se une a receptores específicos de las células (ver capítulo 7) y modula varias vías intracelulares que podrían regular la expresión del uPA (Puckac et al 1990). Sin embargo, se observó que la heparina no tiene efecto sobre la transcripción del uPA aunque inhibió la del tPA (Au et al 1992).

El efecto de la heparina sobre la vida media del uPA no se conoce. Varios trabajos han mostrado que la heparina protege al FGFb de la inactivación proteolítica e incrementa su vida media (Belfort et al 1992; Damon et al 1989; Rosengart et al 1988) por lo que no podemos

descartar un mecanismo similar sobre el uPA, más aún teniendo en cuenta que todas las heparinas que se unieron al uPA son las que poseen actividad fibrinolítica.

Se sabe que la heparina libera uPA de la membrana de las células endoteliales (Markwardt & Klöcking 1977; Vairel et al 1983; Stephen et al 1991; Blasi 1988; Todd 1977). Los resultados obtenidos muestran una buena asociación entre el aumento de los niveles de uPA con el incremento en la actividad y la capacidad de las heparinas para unirse al uPA. Además, coincide la cinética de actividad del uPA (y niveles séricos de uPA) post inoculación con el aumento de la actividad anticoagulante en ratones inoculados con heparina. Estos datos sugieren fuertemente que este último mecanismo es el que parecería tener mayor importancia in vivo.

En resumen, la actividad fibrinolítica mediada por uPA se incrementa en ratones inoculados con heparina como consecuencia de un aumento en los niveles séricos de uPA, más que por la actividad cofactora. Heparinas modificadas como O-des y N-des, además del HS que no poseen actividad cofactora en la fibrinólisis y que carecen de actividad anticoagulante, retuvieron sus propiedades para aumentar la fibrinólisis mediada por uPA.

Un aumento del uPA a nivel peritumoral tendría un efecto contraproducente, ya que favorecería los procesos invasivos locales. Aunque no hemos investigado si este fenómeno observado como un aumento de uPA en circulación ocurre también en los tejidos peritumorales de ratones portadores es poco factible que ocurra dada la rápida caída a niveles basales que se observa (< de 6 hs).

Como se mencionó anteriormente, el aumento de uPA a nivel plasmático podría contribuir en el impedimento de la diseminación metastásica evitando la formación de trombos y facilitando el daño mecánico de las células en circulación. Nuestros resultados muestran que la heparina O-des y N-des aunque tienen actividad fibrinolítica mediada por uPA no modificaron el número de metástasis experimentales en pulmón (capítulo 9). Por lo tanto la inhibición de las metástasis por la heparina no parece estar relacionada con su actividad fibrinolítica.

11. COAGULACIÓN

11.1. INTRODUCCIÓN.

Durante la patogénesis de la metástasis, los eventos trombóticos resultan sumamente importantes (Rickles & Edwards 1983). La portación de un tumor afecta perjudicialmente el sistema de coagulación modificando la homeostasis y favoreciendo el desarrollo del tumor primario y la formación de metástasis (Al-Mondhiry 1984; Carty et al 1992). Los mecanismos por los cuales los tumores activan el sistema homeostático son complejos. Varios tumores, o líneas celulares derivadas de tumor (principalmente tumores sólidos) poseen actividad procoagulante y sus características están compiladas en los registros de la Sociedad Internacional de Trombosis y Homeostasis (Edwards et al 1990).

Se describió una relación directa entre el incremento de la coagulación y la capacidad metastásica de varios tipos de cáncer, atribuyéndose este fenómeno a la producción de factores procoagulantes por parte de las células tumorales (Curatolo et al 1979; Pearlstein et al 1981; Esumi et al 1987; Zacharski et al 1993). Por lo tanto, el incremento de la coagulabilidad podría facilitar el arresto de las células tumorales en el órgano blanco. La heparina podría favorecer la destrucción mecánica de las células tumorales durante su viaje por el torrente sanguíneo, a causa de su actividad anticoagulante, lo que ocasionaría el descenso en el número de metástasis.

Anteriormente demostramos que solamente la heparina inhiben las metástasis experimentales (capítulo 9) y que las heparinas modificadas empleadas en nuestras investigaciones carecen de actividad anticoagulante aunque algunas retienen la capacidad fibrinolítica (capítulo 10). Sin embargo, desconocemos los niveles de coagulabilidad de los ratones portadores de tumor y de las células de los tumores empleados en esta tesis

11.2. OBJETIVOS.

Los objetivos del presente capítulo fueron:

1. Determinar alteraciones en el tiempo de coagulación de los ratones portadores del tumor M3.

2. Determinar la presencia de actividad procoagulante por parte de la línea celular derivada del adenocarcinoma mamario M3 (LM3) y de la línea F311.

3. Determinar la capacidad de la heparina y las heparinas modificadas para inhibir la actividad procoagulante generada por las células tumorales.

11.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

11.3.1. Animales:

Se utilizaron ratones machos Balb/c de 12 a 16 semanas de edad.

11.3.2. Células y cultivos celulares:

Se emplearon las líneas celulares LM3 y F3II descriptas previamente. Las células se despegaron de los frascos de cultivo con tripsina, se lavaron dos veces en medio MEM y se resuspendieron en medio MEM sin SFB durante una hora a 37°C para permitir su recuperación. La viabilidad celular se determinó con el test de exclusión con azul tripán y fue siempre superior al 95%.

11.3.3. Crecimiento tumoral:

Se realizó según se describió en el punto 5.3.9.

11.3.4. Obtención del plasma citratado:

Se sangraron a los animales anestesiados obteniéndose la sangre de la arteria ocular en presencia de citrato de sodio (0,38 % P/V final) tal como se describió en el punto 9.3.4. Se guardaron alícuotas de plasma (200 µl) a -70 °C para la posterior determinación del tiempo de recalcificación.

11.3.5. Ensayos de coagulación:

Se determinó el tiempo de recalcificación del plasma de ratones de distinto tiempo de portación del tumor añadiendo 200 µl de plasma de ratón a 200 µl de $CaCl_2$ 25 mM. La actividad procoagulante de las células tumorales se determinó de la siguiente manera: a 200 µl de plasma de ratón normal a 37°C, se le añadieron diferentes concentraciones de células tumorales contenidas en 100 µl de PBS y la reacción se inició añadiendo 100 µl de $CaCl_2$ 50 mM. En ambos casos se midió el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo. (Esumi et al 1991).

El efecto inhibitorio de la heparina sobre la actividad procoagulante de las células tumorales, se determinó mediante el agregado de 10 µl de heparina en concentraciones de 0,01 a 10 µg/ml, antes de iniciar la reacción con $CaCl_2$.

Como control positivo se empleó tromboplastina tisular (MediTech, USA).

11.4. RESULTADOS.

11.4.1. Crecimiento del tumor y actividad procoagulante in vivo.

En varios casos se describió una disminución del tiempo de coagulación en pacientes portadores de tumor. Nosotros quisimos determinar si el tiempo de recalcificación de ratones portadores de tumor se modifica a lo largo del tiempo como consecuencia de un aumento en el tamaño del tumor.

La figuras 11.1. muestra que el tiempo de coagulación disminuye en los ratones portadores del tumor M3.

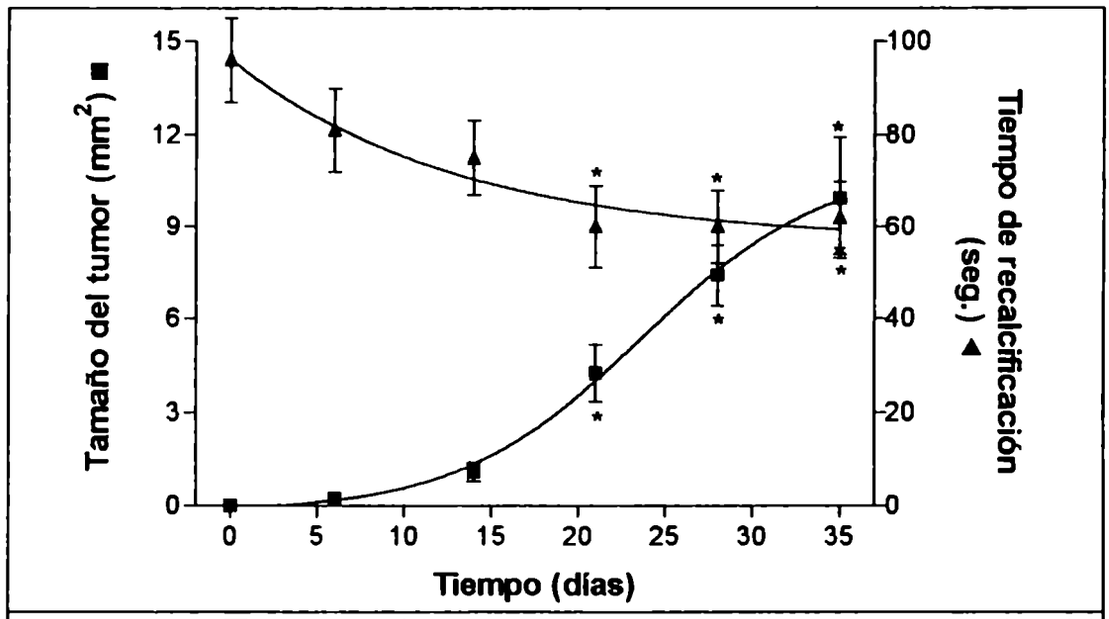


FIGURA 11.1. ■ Aumento del tamaño del tumor M3 subcutáneo en función del tiempo de portación tumoral. Se midió el diámentro menor y el diámetro mayor del tumor, expresando los resultados como el producto de ambas mediciones (media ± DS; n=2). ▲ Tiempo de recalcificación del plasma de los ratones portadores de tumor a lo largo del tiempo de portación (media ± DS; n=2) *;$p<0,05$.

Los ratones portadores de tumor M3 tienen disminuido el tiempo de recalcificación.

El descencso del tiempo de coagulación y el tamaño tumoral no están completamente correlacionados ya que a partir del día 14 el tiempo de recalcificación no disminuyó a pesar de que el tumor aumentó de tamaño conciderablemente.

11.4.2. Actividad procoagulante de las células tumorales.

Las células tumorales LM3 y las F3II disminuyeron el tiempo de recalcificación de manera dosis-dependiente. La actividad procoagulante de las células LM3 es mayor que la de las F3II (Figura 11.2.).

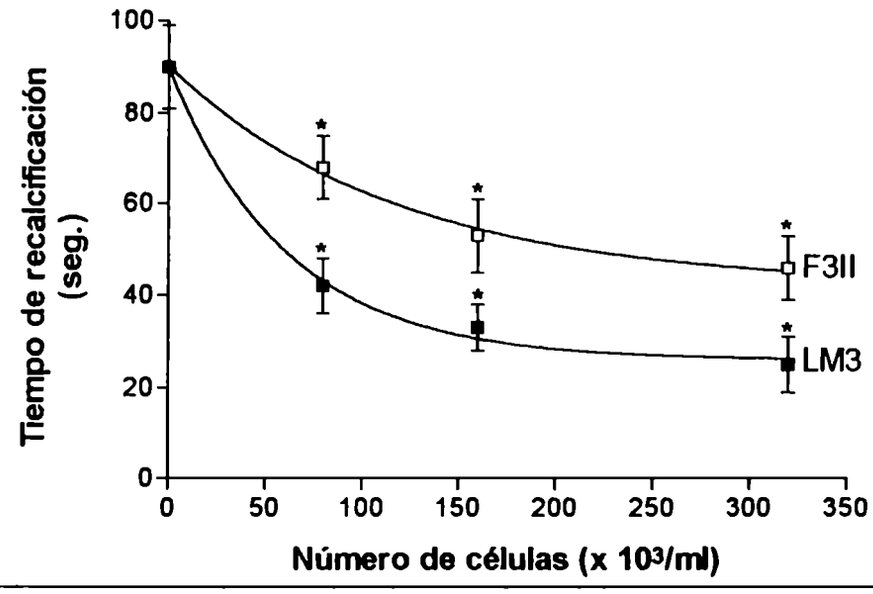


FIGURA 11.2. Actividad procoagulante de las células tumorales LM3 y F3II. Se midió el tiempo de recalcificación del plasma de ratón normal, inducido por diferentes concentraciones de células LM3 y F3II. (media ± DS; n=4) *;p<0,01 respecto del control sin células.

La heparina inhibió la formación del coágulo inducido por las células tumorales, de manera dosis-dependiente, mientras que todas las heparinas modificadas (N-des, O-des, O/N-des N-Ac y N-des N-Ac) que no poseen actividad anticogulante, no modificaron el tiempo de recalcificación en ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 11.3).

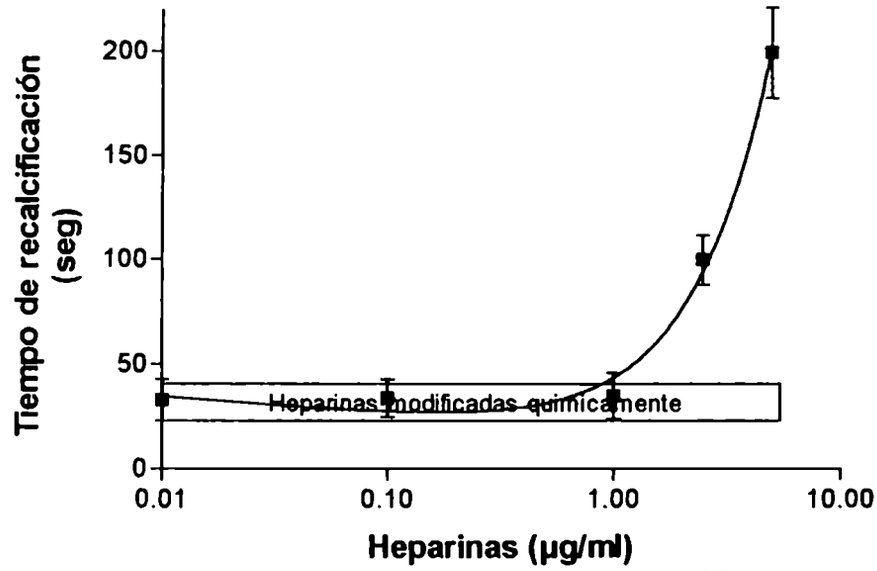


FIGURA 11.3. Efecto de la heparina (■), y las heparinas modificadas químicamente en la coagulación del plasma inducido por las células LM3 (3,3 x 10^5 cél./ml). La heparina aumentó el tiempo de recalcificación de manera dosis-dependiente. (media ± DS; n=4) *;p<0,01.

11.5. DISCUSIÓN.

En la diseminación hematógena, las células tumorales deben sobrevivir durante el tiempo de transporte vascular para poder anclarse en el órgano blanco, adherirse al endotelio vascular, invadir y originar las metástasis. Al igual que lo que ocurre con los depositos de fibrina, el plasma con mayor capacidad coagulante protege a las células tumorales y facilita su arresto en la microvasculatura para dar origen a las metástasis (Esumi et al 1991; Constantini & Zacharsky 1992).

Nosotros observamos que los ratones portadores de tumor poseen una disminución en el tiempo de coagulación respecto de los ratones normales. Los resultados in vitro demuestran que la actividad procoagulante sistémica es causada al menos en parte por las propias células tumorales.

Los dos factores procoagulantes secretados por las células tumorales más importantes que se han descripto, son el factor tisular (TF) y el factor procoagulante del cáncer (CP) (Rickles et al 1988; 1992). El factor tisular es una glicoproteína integral de membrana que participa en la vía extrínseca de la coagulación actuando como cofactor en la activación del factor X mediada por el factor VIIa. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se detectó la presencia del factor tisular en varios tumores sólidos (Callander et al 1992) y en vesículas que se liberan de las células tumorales que crecen en cultivo (Bastida et al 1984). El factor procoagulante del cáncer, directamente activa al factor X, de manera independiente a la del factor VII. Se lo identificó en tumores sólidos de animales y humanos, aunque no se conoce el papel fisiológico que desempeña (Alessio et al 1990). Las células tumorales LM3 y F3II inducen la coagulación in vitro y en forma sistémica en los animales portadores de tumor. Aunque en nuestro modelo no hemos caracterizado el/los factores responsables de la actividad procoagulante, ésta facilitaría la diseminación metastásica. Solamente la heparina, que es la única que retienen la actividad anticoagulante, revrtió el efecto procoagulante generado por las células tumorales. Estos resultados indican que el efecto antimetastásico se asocia a las propiedades anticoagulantes de la heparina.

Como mencionamos anteriormente, la formación de metástasis es un proceso de múltiples pasos y aunque hemos demostrado que la heparina puede inhibir la metástasis por un

mecanismo asociado a la coagulación no podemos descartar que actue también a otros niveles como por ejemplo el efecto sobre las enzimas de tipo heparanasas, que son secretadas por varios tipos celulares, y participan en los procesos migratorios e invasivos durante la intravasación y la extravasación.

12.HEPARINASAS.

12.1 INTRODUCCIÓN.

Un evento crucial para la generación de metástasis es el pasaje de las células tumorales a través de las paredes vasculares, tanto en la intravasación como en la extravasación. Durante estos procesos, las células tumorales deben atravesar el endotelio vascular y la lámina basal empleando entre otros mecanismos, la liberación de enzimas capaces de degradar la ME (Nicolson, 1989; Liotta et al 1991).

Como se mencionó anteriormente, varios estudios han correlacionado la capacidad metastásica de diversas líneas tumorales con la producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de la ME como la colagenasa, los activadores de plasminógeno, la catepsina B y las heparinasas (Liotta et al 1982; Pauli et al 1983; Vlodavky et al 1983; Parish et al 1987).

Las heparinasas fueron descriptas y caracterizadas principalmente en la bacteria Gram negativa *Flavobacterium heparinum*, y poseen la capacidad de modificar y degradar la heparina para utilizarla como fuente de carbono.

Existen diferencias en la terminología empleada para las distintas heparinasas.

La heparinasa I, también llamada heparina liasa I o simplemente heparinasa (EC 4.2.2.7.), tiene un peso molecular de 43 kDa e hidrolisa las uniones disacarídicas entre las hexosaminas y el ácido urónico. El heparán sulfato no es un buen sustrato para esta enzima aparentemente como consecuencia de su selectividad por ácidos idurónicos, los que son minoritarios respecto de los glucurónicos. Además, el cambio de los grupos N-sulfato de la hexosamina por grupos acetilo, genera moléculas de heparina resistentes a la degradación por heparinasa Y (Nader et al 1990).

La heparinasa II o heparin liasa II (sin número) posee un peso molecular de 88 kDa y degrada la unión hexosamina-ácidos urónico, sin discriminar entre idurónico o glucurónico.

La heparinasa III o heparin liasa III o heparitinasa I, de 70 kDa, degrada la unión entre la hexosamina y los ácidos glucurónicos (Nader et al 1990).

Aunque se han purificado y caracterizado diversas heparinasas, no fué hasta 1993 que se clonó en *F.heparinum*, el primer gen correspondiente a la heparinasa I (Sasisekharan et al 1993).

A pesar del conocimiento de las enzimas degradadoras de heparina en los procariotas, poco es lo que se sabe sobre estas enzimas en células de mamíferos.

Se detectó actividad heparinasa en células circulantes (neutrófilos, MC, macrófagos y los linfocitos T activados) que extravasan en zonas de inflamación y que para su normal funcionamiento penetran la membrana basal y la ME (Matzner et al 1985; Bashkin et al 1990; Nakajima et al 1988). También se observó que las plaquetas y varias células tumorales poseen actividad heparinasa (Vlodavky et al 1992).

En la mayoría de las investigaciones se estudió la presencia de actividad heparinasa en extractos celulares, pero se desconocen las características bioquímicas y los mecanismos que regulan la expresión. Mas aún, la única heparinasa purificada de células eucariotas se obtuvo del melanoma B16, la cual es una endo-β-D-glucuronidasa con un peso molecular mayor (96 kDa) al de las heparinasas bacterianas (Jin et al 1990).

Algunos estudios realizados para determinar la especificidad de sustrato de la/las heparinasa de células tumorales B16, mastocitomas, células hepáticas y heparitinasas de plaquetas, sugiere que podría tratarse de distintas enzimas (Irimura et al 1986; Ber-Ner et al 1987; Oosta et al 1982).

A pesar de que en varias líneas tumorales, se demostró una correlación directa entre la capacidad metastásica y la producción de heparinasas por las células tumorales (Vlodavsky et al 1982; 1983; Nakajima et al 1988) y que las heparinasas degradan el heparán sulfato de la ME y la membrana basal facilitando la penetración de las células tumorales en el endotelio vascular durante la intra y extravasación, no se conocen las características bioquímicas de la/las enzimas.

La similitud estructural entre la heparina y el heparán sulfato, ha permitido especular de que la primera actuaría como un inhibidor competitivo en la degradación del heparán sulfato por las heparinasas producidas por las células tumorales. En este sentido se observó una

asociación entre la actividad antimetastásica de varios GAG y la sensibilidad a ser degradados por heparinasas (Coombe et al 1987; Parish et al 1987).

Los estudios para detectar la presencia de actividad heparinasa en las células se realizaron fundamentalmente mediante exposición de medios condicionados o extractos celulares a una ME marcada con ^{35}S y realizando un posterior análisis del tamaño de las moléculas de GAG producidos mediante cromatografía. Esta metodología, aunque es muy sensible, resulta muy costosa y poco práctica para el análisis de un gran número de muestras.

Otra técnica empleada para determinar la presencia de actividad heparinasa se basa en la observación de cambios en la migración electroforética del heparán sulfato después de haberlo expuesto a los diversos extractos enzimáticos. El heparán sulfato se detecta mediante tinción de los geles con azul de toluidina o azul de metileno (Nakajima et al 1983; De Vauge et al 1994). Esta metodología, más práctica para analizar numerosas muestras, es poco sensible. La utilización del fluorocromo Rubipy que se une a los grupos negativos de la heparina y que resultó sumamente útil para la identificación citoquímica de los MC, podría ser útil además para la identificación de GAG de distinto PM en corridas electroforéticas, y sus propiedades fluorescentes aumentarían la sensibilidad.

12.2 OBJETIVOS.

Los objetivos de las investigaciones realizadas fueron:

1. Poner a punto una técnica suficientemente sensible y económica para poder detectar actividad heparinasa.

2. Estudiar la presencia de actividad heparinasa en las células del modelo experimental empleado.

3. Determinar la susceptibilidad de las distintas heparinas modificadas a ser degradadas por la heparinasa producidas por las células tumorales.

12.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

12.3.1. Obtención de heparinas de alto peso molecular por tamiz molecular:

La obtención de heparinas de alto peso molecular se realizó empleando la separación en tamiz molecular de las distintas heparinas con una columna de Sephadex G-75 (1 cm de diametro x 30 cm de alto; Volumen de flujo: 20 ml/h). El volumen muerto (Vo) y el volumen total (Vt) se determinó empleando azul dextrano y rojo fenol respectivamente. La columna se equilibró en agua y se sembraron 10 mg de las distintas heparinas en 400 µl de agua en cada uno de los fraccionamientos. Se recogieron fracciones de 300 µl, las que fueron liofilizadas y resuspendidas en 50 µl de PBS.

12.3.2. Determinación de la concentración de heparina:

El contenido de heparina en cada fracción se determinó empleando la técnica de Biter y Muir (1962) para la determinación de ácidos urónicos con carbazol.

12.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Se realizaron minigeles de poliacrilamida (Laemmli 1970) en ausencia de SDS.

a) Selección de fracciones conteniendo heparinas de alto peso molecular. Se sembraron alicuotas de cada una de las fracciones (10 µl) con 3 µl de buffer de siembra (4x) en cada calle del gel de poliacrilamida empleando un gel concentrador 10% y separador 20%. El buffer de corrida fue Tris-Glicina pH 8,5 y el voltaje empleado fue de 120 V. La presencia de las heparinas se reveló empleando Rubipy (50 µg/ml) y se observó la fluorescencia en un transiluminador U.V. Las fracciones que contenían heparinas de alto peso molecular (menor movilidad electroforética), se juntaron y se emplearon para los ensayos siguientes.

b) Determinación del tiempo de tinción y sensibilidad: Para determinar el tiempo óptimo de tinción se corrieron muestras conteniendo 12 µg de heparina y se las tiñó durante distintos tiempos con una solución de Rubipy (50 µg/ml). La sensibilidad del método se determinó disminuyendo la concentración de heparina hasta determinar la menor concentración capaz de emitir fluorescencia observable en el transiluminador.

c) Determinación de las características de unión heparina-Rubipy: Las características de la unión y el número de moléculas de Rubipy unidas a la heparina se realizó variando la concentración de la solución colorante y analizando los resultados mediante el análisis de

Scatchard. La cantidad de Rubipy unido a la banda del gel conteniendo heparina (unido total) y a una sección del gel de igual tamaño pero carente de heparina (unido inespecífico) se calculó semicuantitativamente mediante estudios densitométricos de las fotos de los geles tomadas en el transiluminador. Las determinaciones cuantitativas se realizaron mediante elución del colorante del gel durante 48 hs en agua y la posterior determinación fluorométrica de contenido de Rubipy en la solución.

En todos los casos los geles se lavaron con agua 2 veces durante 5 min antes de la tinción con Rubipy para eliminar el exceso de sales y 2 veces durante 10 min cada una después de la tinción para disminuir la unión inespecífica al gel.

12.3.4. Estudios densitométricos:

Las fotografías de los geles se barrieron con un analizador de imagen Bio-Rad (modelo GS-670) y se cuantificó empleando el programa Analizador de Imágen versión 1.1 de Bio-Rad.

12.3.5. Determinación fluorométrica del contenido de Rubipy:

Las secciones del gel fluorescentes por tinción de 12 μg de heparina, con distintas concentraciones de Rubipy (1 x 0,5 cm), y un fragmento similar en tamaño pero del frente del gel, se incubaron en tubos conteniendo 2 ml de agua en agitación continua durante 48 hs. Posteriormente se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes (solución con Rubipy) se leyeron en un espectrofluorómetro (λext: 465 nm; λemi: 585 nm), determinándose la concentración de rubipy en la solución, mediante comparación contra una curva standard de Rubipy de 0,1 hasta 10 μg/ml.

12.3.6. Degradación con heparanasa I, II y III:

Las distintas heparinas modificadas (2 μg/ 5 μl), se incubaron en presencia de las 3 heparinasas bacterianas (heparinas I, II y III (Sigma)) (0,25 UI / 10 μl PBS) durante 24 horas a 37 °C. Finalizada la incubación, se añadieron 3 μl de buffer de siembra (4X) y se sembraron en un gel de poliacrilamida 20 % sin SDS. La corrida electroforética y la tinción del gel se realizó de la manera descripta precedentemente.

12.3.7. Degradación de la heparina y heparinas modificadas por células tumorales:

Se incubó heparina (2 μg/ 5 μl) durante 24 hs con una suspensión de células tumorales LM3 (entre los repiques 60 y 80) (15 μl; 5 x 10^6 células/ml). El mismo procedimiento se

desarrolló con una suspensión de células que fueron sonicadas o calentadas durante 10 minutos a baño María, antes de la incubación con las heparinas. Luego se realizó la carrida electroforética en geles de poliacrilamida para determinar la degradación de las heparinas.

12.4. RESULTADOS.

12.4.1. Obtención de heparinas de alto peso molecular:

La figura 12.1.A. muestra el perfil de elución de la heparina comercial luego de realizar la cromatografía en Sephadex G-75.

La heterogeneidad de la heparina, no solamente en cuanto a su estructura sino también en peso molecular, permitió la obtención de fracciones de heparinas desde el Vo y hasta el Vt.

Se corrieron en geles de poliacrilamida alícuotas de las fracciones concentradas mediante liofilización y resuspendidas en PBS y se tiñeron con Rubipy (50 µg/ml) con el objetivo de determinar sus caracteristícas de movilidad electroforética. El objetivo era juntar aquellas fracciones que pudieran ser posteriormente utilizadas para determinar la presencia de actividad heparinasa, por degradación de la fracción, o un aumento en la migración en el gel (Figura 12.1.B).

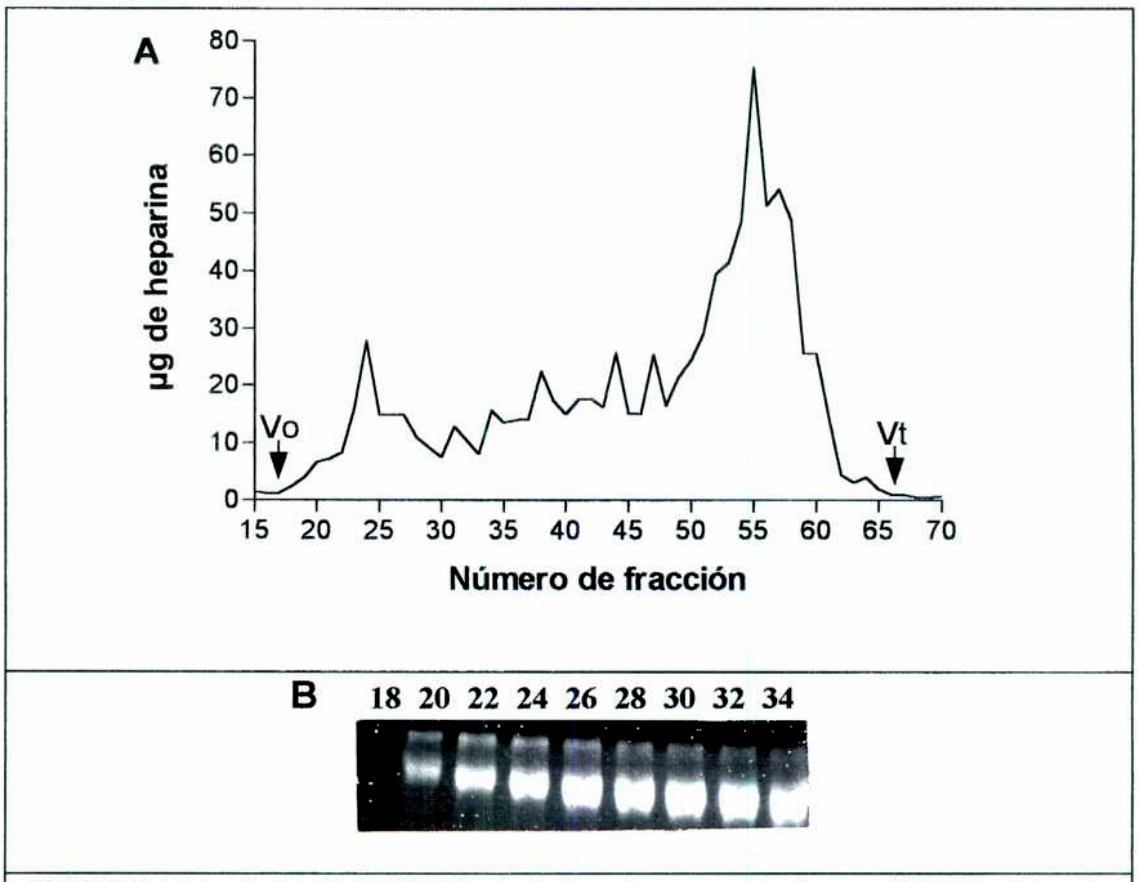


FIGURA 12.1. A) Perfil de elución de la heparina en una columna (30 cm x 1 cm de diámetro) conteniendo Sephadex G75. El volumen muerto (Vo) y el volumen total (Vt) se determinaron con azul dextrano y rojo fenol respectivamente. B) Movilidad en geles de poliacrilamida de la heparina obtenida de distintas fracciones. La detección de la heparina se realizó mediante tinción del gel con Rubipy (50 µg/ml).

12.4.2. Características de la unión heparina-Rubipy.

Doce µg de heparina de alto peso molecular se saturaron con Rubipy (50 µg/ml) a los 15-30 minutos de tinción (Figura 12.2.). Los lavados con agua destilada post-tinción (2 lavados de 10 minutos cada uno) disminuyeron la fluorescencia inespecífica; Lavados muy prolongados (45 min o más) ocasionaron una disminución de la intensidad de la fluorescencia en la región del gel conteniendo heparina. por lo tanto, para los ensayos posteriores se empleó la secuencia: 2 lavados pre-tinción en agua de 5 min cada uno; Rubipy 30 min y 2 lavados en agua de 10 minutos cada uno post-tinción.

El límite de detección de la técnica tiniendo con Rubipy (50 µg/ml) fue de 1 µg.

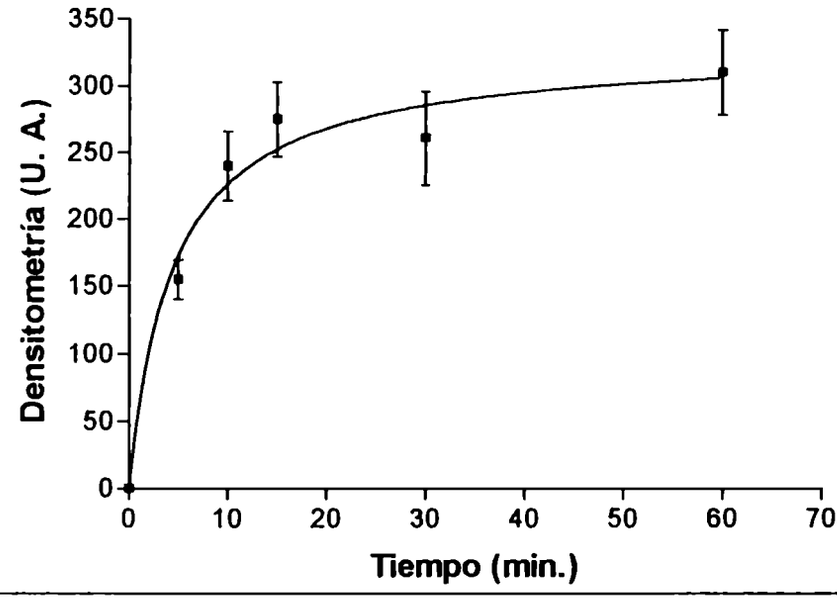


FIGURA 12.2. Unión del Rubipy a la heparina en función del tiempo. PAGE de heparina (12 µg/calle) teñido con Rubipy (50 µg/ml) durante distintos tiempos. Los geles se lavaron con agua destilada 2 veces durante10 min y se expusieron a luz UV. La intensidad de fluorescencia de la banda conteniendo heparina se determinó densitométricamente (media ± DS; n=2). U.A., Unidades arbitrarias.

La figura 12.3. muestra las curvas de saturación al teñir los geles con concentraciones crecientes de Rubipy. Mediante estudios densitométricos se calculó la unión total y la inespecífica del Rubipy a la heparina y por diferencia, se determinó lo unido especificamente. Sin embargo, esta técnica no permite analizar la afinidad y el número de moléculas de Rubipy unidas a la heparina dado que el contenido de Rubipy empleado para teñir el gel (Rubipy en solución total o libre) no puede ser transformado a unidades arbitrarias de densitometría y la

cantidad unida al gel no puede determinarse en términos de concentración o moléculas de Rubipy.

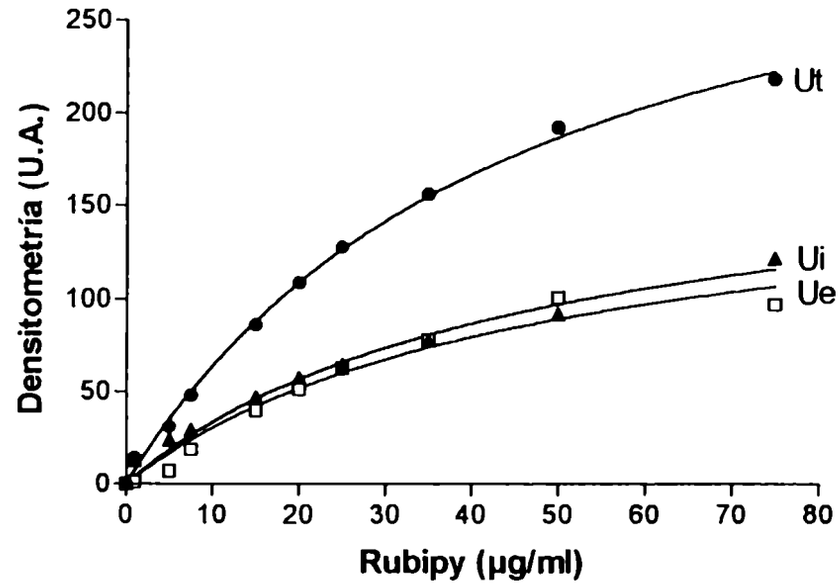


FIGURA 12.3. Unión del Rubipy a la heparina. Geles de poliacrilamida en los que se corrió heparina (12 µg/calle) se incubaron con concentraciones crecientes de Rubipy durante 30 min. Los geles se lavaron con H_2O y se irradiaron con luz U.V., determinándose densitométricamente el Rubipy total unido (Ut) en la zona del gel conteniendo la heparina y lo unido inespecíficamente (Ui) en una zona alejada. Lo unido específicamente (Ue) se calculó por diferencia (Ut - Ui).

La elución del fluoróforo del gel, permitió calcular espectrofluorométricamente la concentración de Rubipy, al compararlo contra una curva standard. La gráfica de saturación obtenida por este método, es muy similar a la observada por densitometría y permitió determinar la afinidad y el número de moléculas de Rubipy unidas a la heparina empleando el análisis de Scatchard (Figura 12.4.).

Se determinó la presencia de 2 sitios de unión del Rubipy en la heparina. Una de menor afinidad (Kd= 3,5 x 10^{-10} M) y otro de mayor afinidad (Kd= 3,8 x 10^{-11} M).

Dada la gran heterogeneidad de la molécula de heparina, el cálculo del número de moles de Rubipy unidos a cada mol de heparina, se ve dificultado ya que se requiere conocer el peso molecular preciso del glicosaminoglicano. Este varía de acuerdo al número de unidades disacarídicas (UD) [ácido urónico-glucosamina (ΔUA-Glc)] y de los sustituyentes que estos posean.

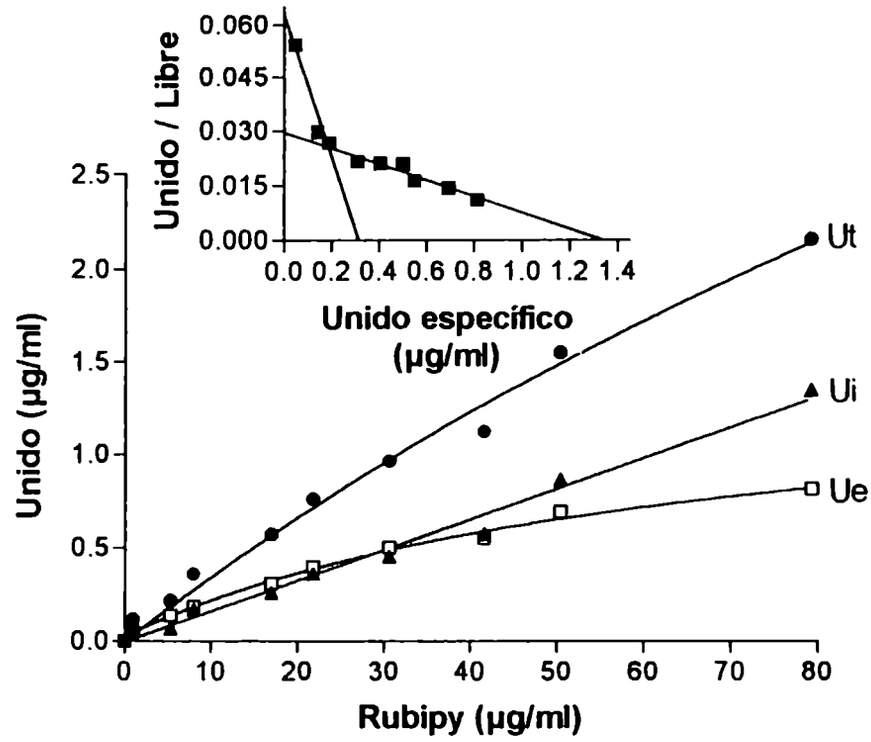


FIGURA 12.4. Unión del Rubipy a la heparina. Geles de poliacrilamida en los que se corrió heparina (12 µg/calle) se incubaron con concentraciones crecientes de Rubipy durante 30 min. Los geles se lavaron con H_2O y se irradiaron con luz U.V. Se cortaron las bandas del gel conteniendo la heparina (Ut) y bandas del mismo tamaño sin heparina (Ui) y se eluyó el Rubipy con H_2O (2 ml) durante 48 hs en la oscuridad. La concentración de Rubipy eluída, así como el empleado para teñir, se determinó espectrofluorométricamente contra una curva standard de Rubipy (0,1 a 10 µg/ml).
Lo unido específicamente (Ue) se calculó por diferencia (Ut-Ui).
Interior: Análisis de Scatchard de la unión del Rubipy a la heparina. Las lineas representan el análisis de la regresión lineal por cuadrados mínimos.
Menor afinidad: Y= -0,0223 X + 0,0297; r=0,95.
Mayor afinidad: Y= -0,2014 X + 0,0626; r=0,90.

Unidades disacarídicas con distintas sustituciones que pueden detectarse en la heparina:

UD	PM
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcNAc-6S	605,4
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcNAc-6S	503,3
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcNAc	503,3
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcNAc	401,3
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcN-6S	541,4
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcN-6S	439,3
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcN	439,3
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcN	337,3
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcNS-6S	665,4
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcNS-6S	563,3
α-ΔUA-2S-[1→ 4]-GlcNS	563,3
α-ΔUA-[1→ 4]-GlcNS	461,3

La siembra de heparina en cada calle del gel (12μg) correspondería a 2,39 x 10^{-8} moles de UD, si se realizan los cálculos a partir del PM promedio de las UD mas frecuentes (PM=501,99).

El número de moles de Rubipy unidos a los sitios de menor afinidad fue de 3,19 x 10^{-9} moles, mientras que en los sitios de alta afinidad fue de 9,71 x 10^{-10} moles.

Estos resultados muestran que hay aproximadamente 3 sitios de baja afinidad por cada sitio de alta afinidad. Además, habría un mol de Rubipy por cada 5-6 UD.

12.4.3. Sensibilidad de las heparinas modificadas a ser degradadas por las heparinasas bacterianas I, II y III.

Las fracciones de alto peso molecular de la heparina y las heparinas modificadas obtenidas por separación en tamiz molecular fueron incubadas en presencia de las 3 heparinasas bacterianas conocidas, determinándose la degradación mediante cambios en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida teñidos con Rubipy.

La sensibilidad a la digestión de cada una de las heparinas modificadas se observa en la figura 12.5.

Mientras que la heparinasa I degrada a la heparina y levemente a N-des N-Ac, la misma no tiene efecto sobre las heparinas O-des, N-des, O/N-des N-Ac, así como tampoco sobre el HS.

La heparinasa II parece ser efectiva sobre el HS y en menor medida sobre N-des N-Ac, pero no degrada las otras heparinas modificadas.

Finalmente, la heparinasa III es muy efectiva para la degradación de HS tal como se ha descripto, ya que posee especificidad de sustrato por ácidos glucurónicos y no por ácidos idurónicos.

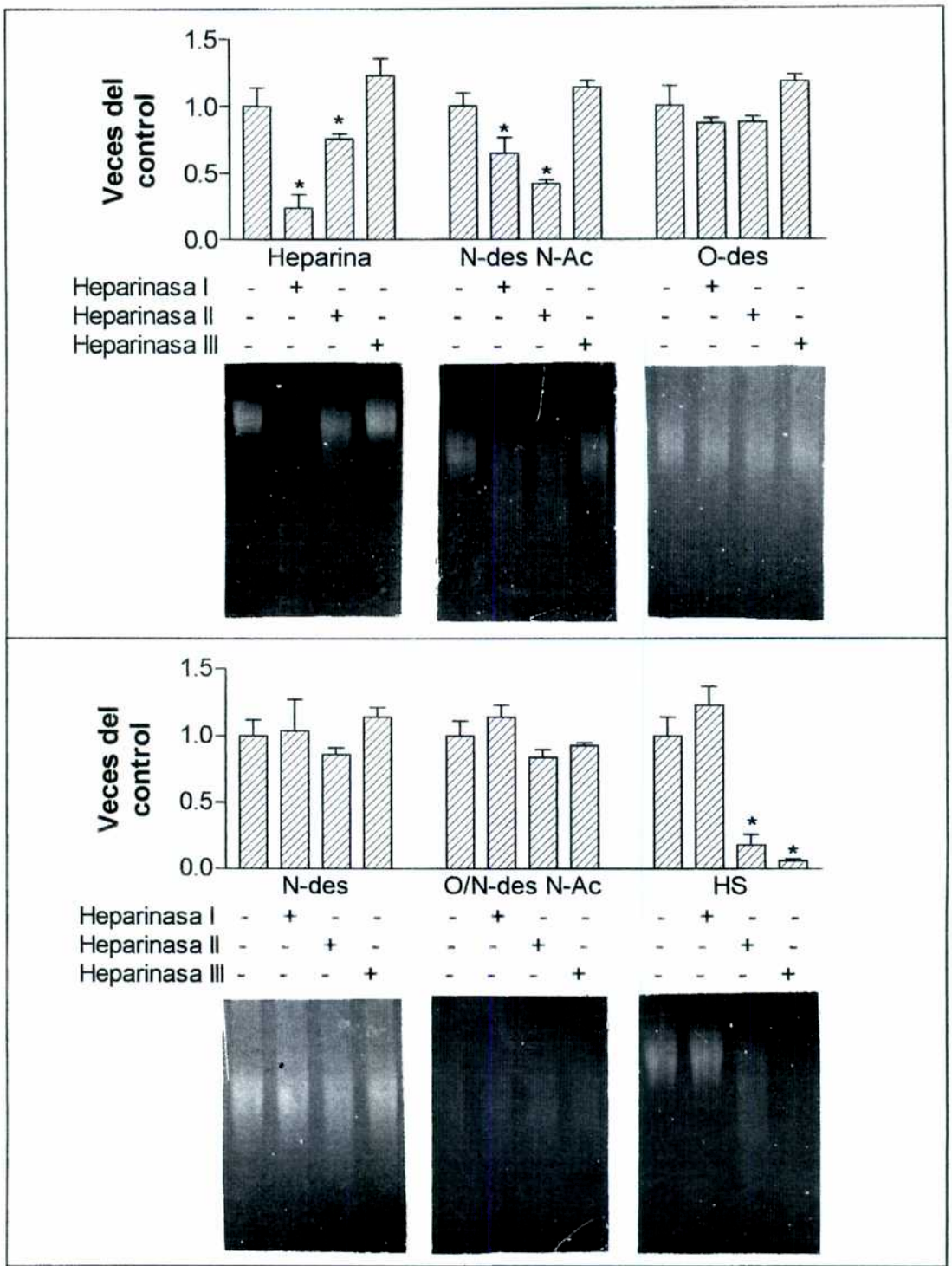


FIGURA 12.5. Efecto de la heparinasa I, II y III sobre la heparina y las heparinas modificadas. Fracciones de alto peso molecular de las distintas heparinas fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de las heparinasas bacterianas (0,25 UI 15 µl) durante 24 hs. Al finalizar la incubación las muestras se corrieron electroforéticamente en gel de poliacrilamida y se tiñeron con Rubipy. La gráfica muestra el gel de un experimento y el análisis densitométrico de dos ensayos independientes expresados como veces del control (media ± ES; n=2) *; $p<0,05$.

12.4.4. Degradación de la heparina y las heparinas modificadas por células tumorales.

La incubación de las heparinas en presencia de una suspensión de células LM3 produjo un fuerte decaimiento en la intensidad de fluorescencia de la banda de heparina.

Teniendo en cuenta que tanto la heparina, como la N-des N-Ac se unen a receptores específicos y se internalizan en las células (Bârzu et al 1996, ver capítulo 7), realizamos en paralélo el mismo ensayo pero en lugar de hacerlo con células enteras, se hizo con extractos celulares obtenidos mediante sonicación. Se observaron similares patrones de intensidad de banda, lo que descarta la posibidad de que se este reflejando un proceso de internalización. Finalmente, la inactivación enzimática por calor, revirtió el descenso en la intensidad de la banda (Figura 12.6.). Solamente se observa una disminución en la intensidad de tinción en la banda correspondiente a heparina y a N-des N-ac cuando se incubaron con células enteras o sonicadas, mientras que todas las otras heparinas modificadas, no fueron degradadas.

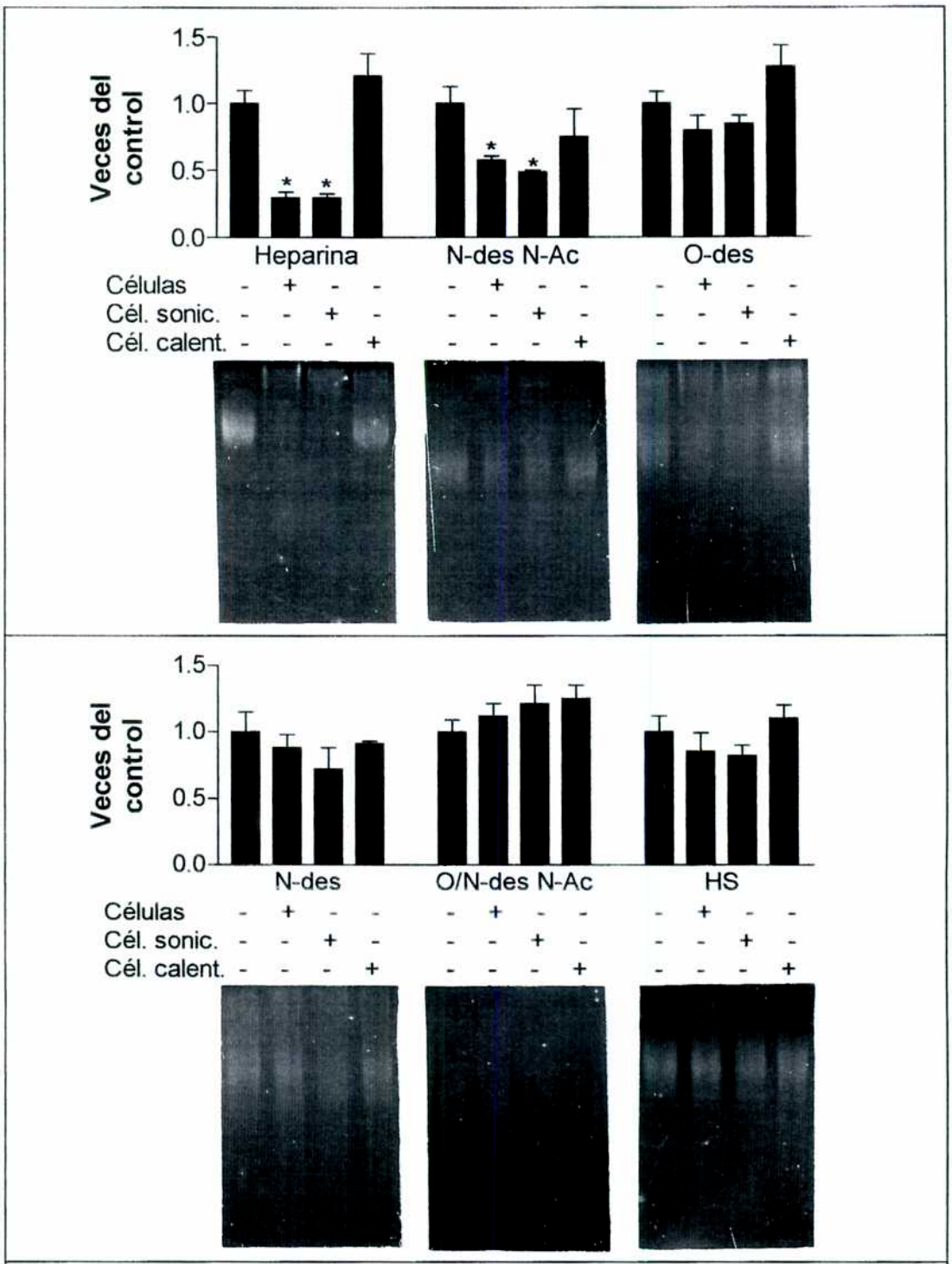


FIGURA 12.6. Actividad heparinasa de las células tumorales. Fracciones de heparinas de alto peso molecular (2µg/5µ;) se incubaron durante 24 hs a 37°C en presencia (+) o ausencia (-) de 15 µl de una suspensión celular intacta (5 x 10^6 cél./ml)(Células), previamente sonicada (Cél. sonic) o calentada 10 min a baño María (Cél. calent.). Finalizada la incubación se añadieron 7 µl de buffer de siembra 4X y se corrieron electroforéticamente en gel de poliacrilamida 20 % sin SDS. La presencia de las heparinas se detectó con Rubipy. La gráfica muestra el gel de un experimento y el análisis densitométrico de dos ensayos independientes expresados como veces del control (Media ± ES; n=2) * ; $p<0,05$.

12.5 DISCUSIÓN.

Hemos descripto una técnica sensible, sencilla y económica para detectar actividad heparanasa, empleando el fluorocromo Rubipy para revelar la presencia de heparina.

El Rubipy es un compuesto quelato estable formado por la unión de un átomo de rutenio con tres moléculas de bipiridina, mediante uniones α, α' diimina. Este compuesto posee una carga positiva neta y se puede unir por interacciones iónicas con los grupos sulfatos de los glicosaminoglicanos (Ver capítulo 4). Esto se refleja en parte por la alta afinidad entre la heprina y el Rubipy (Kd= $3,5 \times 10^{-10}$ y $3,8 \times 10^{-11}$ M para el sitio de menor y mayor afinidad respectivamente). El análisis de Scatchard revela la presencia de 2 sitios distintos, los que podrían deberse a interacciones con los grupos O y N-sulfatos. Como los grupos N-sulfato son menos ácidos que los O-sulfatos posiblemente se este reflejando las diferencias en estas interacciones con el Rubipy con los dos Kd. Este dato estaría de acuerdo con resultados previos en los que observamos que la interacción del Rubipy con las heparinas parcialmente O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) es menor que con las N-desulfatadas (N-des y N-des N-Ac) (Ver figura 4.8) . Sin embargo, cada UD de heparina posee 2-3 grupos sulfato a pesar de que una molécula de Rubipy se une cada 5-6 UD. Por lo tanto, no todos los grupos sulfatos están uniendo Rubipy. Esto podría deberse a un impedimento estérico por la forma que adopta la moécula de heparina y la accesibilidad que presenten los grupos sulfato, así como también con el tamaño de la molécula de Rubipy y a la orientación que adoptan lo anillos de las bipiridinas respecto del rutenio, en donde se encuentra la carga positiva.

La degradación de las heparinas modificadas por acción de las heparinasas coincide con los datos bibiográficos que muestran que la heparanasa I degrada la unión hexosamina-ácido urónico sin discriminar entre los epímeros, y que la N-acetilación disminuye la suseptibilidad a ser degradada por esta enzima (Nader et al 1990; Sasisekharan et al 1993). La heparina N-des N-Ac empleada en estas investigaciones está parcialmente modificada, por lo que pudo ser degradada por la heparinasa I en menor medida que la heparina.

La heparanasa II degrada de forma mas efectiva las hexosaminas N-acetiladas por lo que pudo degradar mas efectivamente al heparán sulfato y a la heparina N-des N-Ac que son los que poseen una mayor proporción de este compuesto.

Finalmente, la heparinasa III cliva la unión hexosamina-ácido glucurónico. Una diferencia entre la heparina y el heparán sulfato, es que la primera posee mayoritariamente ácidos idurónicos, mientras que el segundo ácidos glucurónicos (Casu 1985). Concordantemente, la heparinasa III degradó heparán sulfato con exclusividad.

La degradación de las heparinas modificadas por las células tumorales muestra un comportamiento similar al de la heparinasa I. Surge así, una pregunta que requiere de una respuesta. ¿Porqué la o las enzimas producidas por las células tumorales no degradan al heparán sulfato, que en teoría es su sustrato fisiológico? Una posibilidad es que la heparina sea un sustrato químicamente más susceptible de hidrolizar a pesar de no ser el fisiológico. Si este fuera el caso, para detectar la degradación del heparán sulfato se requerirían más unidades enzimáticas (más células).

Otra posible explicación es que el sustrato fisiológico de esta/estas enzimas sea el heparán sulfato manteniendo su estructura de proteoglicano, que es la forma en que se encuentra en ME. Si este fuera el caso, los estudios que emplean la marcación de ME en cultivo para ver dergradación de ésta molécula estarían reflejando el funcionamiento de ésta enzima sobre su sustrato biológico. El heparán sulfato empleado por nosotros está constituido por fragmentos de la porción glicosídica de la molécula, que además sufre modificaciones en el proceso de purificación. Sin embargo, el procedimiento empleado por nosotros nos permite realizar un estudio comparativo en la suscpetibildad de las heparinas modificadas químicamente que provienen de la misma "heparina madre".

Los resultados obtenidos muestran que solo la heparina y la N-des N-Ac son sustratos de las heparanisas producidas por las células tumorales.

Varios trabajos muestran una asociación entre la producción de heparinasas y la formación de metástasis (Vlodavky et al 1982; 1983; Nakajima 1983; 1988). Más aún, glicosaminoglicanos capaces de inhibir la degradación del heparán sulfato de la matriz extracelular, también disminuyeron el número de metástasis (Coombe et al 1987; Parish et al 1987) y mientras realizábamos nuestras investigaciones, Bitan y colaboradores (1995) mostraron que la heparina N-des N-Ac, al igual que la heparina, retenía la actividad

antimetastásica sobre células del melanoma B16, siendo esta heparina susceptible a la degradación por heparinasas (nuestros resultados, Bar-Ner et al 1987).

En nuestros estudios la heparina y N-des N-Ac fueron susceptibles a la degradación por heparinasas de las células tumorales a pesar de que solamente la heparina retiene la actividad antimetastásica, por lo que nuestros resultados nos indican una ausencia de correlación en estas dos propiedades biológicas. Los motivos que podrían explicar estas diferencias se discutirán en el próximo capítulo.

13. DISCUSIÓN GENERAL

Los MC son células conocidas fundamentalmente por el papel que desempeñan en los procesos inmunes y particularmente en las reacciones alérgicas. Sin embargo también están involucrados en los procesos asociados al desarrollo tumoral.

Empleando el fluorocromo Rubipy, nosotros hemos podido identificar a los MC en preparados biológicos de manera sencilla y rápida. La secuencia tintorial hematoxilina de Mayer-Rubipy permite determinar la distribución organográfica de los MC y analizar simultáneamente las características histológicas del tejido lo que puede ser de gran utilidad para estudios histopatológicos.

En estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio (Lauría de Cidre & Sacerdote de Lustig 1990; Lauría de Cidre 1994) se observó que el número de MC peritumorales se incrementa a lo largo del tiempo de portación del tumor y que estas células se encuentran parcialmente desgranuladas. Las investigaciones presentadas en esta tesis, particularmente el análisis de imagen de MCN y MCP, muestran que MC distantes como son los de cavidad peritoneal también están activados y parcialmente desgranulados en ratones portadores de tumor. Estas observaciones, conjuntamente con el hecho de que los medios condicionados de células tumorales inducen la activación de los MC sugiere que la respuesta observada en MC de cavidad peritoneal sería consecuencia de la liberación de factores solubles de las células tumorales y no solamente una respuesta inmunológica del huésped por la portación tumoral.

Una característica importante que diferenció a los MCN del los MCP fue el mayor contenido de GAG sulfatados (más del doble) y la capacidad de disminuir el crecimiento de las células M3 in vitro y la incidencia tumoral in vivo. Esto nos llevó a pensar que podría ser la heparina la responsable del efecto antiproliferativo.

La heparina inhibió la proliferación de las células M3 y MM3 in vitro y el estudio con heparinas de diferente actividad anticoagulante mostró que la inhibición de la proliferación y la actividad anticoagulante son dos efectos biológicos que podrían ser desencadenados por diferentes secuencias dentro de la molécula de la heparina. Se demuestra así, la primera evidencia, de varias que discutiremos más adelante, de las propiedades pleiotrópicas de la heparina.

El hecho de que las células MM3 sean sensibles a la inhibición por heparina y no por MCN sugiere que la acción de los MC no esta mediada exclusivamente por este GAG y que otro/s

mediadores químicos de los MC deben estar participando en la inhibición de la proliferación celular.

El empleo de heparinas modificadas químicamente que carezcan de actividad anticoagulante resultaba sumamente interesantes para poder realizar posteriores estudios in vivo con el objeto de determinar la acción sobre el desarrollo tumoral.

El análisis de estas heparinas sobre la proliferación de células tumorales in vitro mostró que solamente una de ellas, la heparina parcialmente N-desulfatada N-acetilada retenía la actividad antiproliferativa mientras que todas las heparinas O-desulfatadas (O-des y O/N-des N-Ac) así como la heparina N-desulfatada cuya carga positiva no fue neutralizada con acetilos (N-des) carecían no solamente de actividad anticoagulante, sino también de la actividad antiproliferativa. Estos resultados muestran que los grupos O-sulfatos son esenciales para ambas propiedades biológicas. Los grupos N-sulfatos también son importantes, sin embargo en la actividad antiproliferativa parecen no ser requeridos indefectiblemente ya que la actividad antiproliferativa se recupera mediante N-acetilación de la heparina N-desulfatada.

Demostramos la presencia de receptores específicos de alta afinidad para heparina en las células M3 y MM3. Sumamente interesante resultó la correlación existente entre la capacidad de las heparinas modificadas para unirse a los receptores y el efecto antiproliferativo, lo que sugiere que el mecanismo para inhibir la proliferación está mediado por la unión heparina-receptor.

El complejo ligando-receptor es posteriormente endocitado por las células tumorales, al igual que lo observado en SMC (Bârzu et al 1996).

Un proceso adicional que parece estar mediado por la unión heparina receptor es al aumento en la adhesión celular. Tanto la heparina como N-des N-Ac incrementaron la adhesión de las células tumorales siendo el aumento directamente proporcional al número de receptores que se expresan en las células. Este hecho podría ser sumamente importante en procesos fisiológicos en los que la interacción heparina-célula generaría señales intracelulares con al menos dos consecuencias biológicas: inhibir la proliferación e incrementar la adhesión.

Varias glicoproteínas de la ME como el colágeno, la laminina y la fibronectina favorecen la adhesión. Particularmente para la fibronectina, tal como se demostró previamente, observamos que el incremento en la adhesión está mediado por el dominio conteniendo los aminoácidos RGD. Interesantemente, el aumento de adhesión producido por la heparina resulto ser independiente de la interacción con la fibronectina.

Varias proteínas de la ME cumplen funciones similares a las que nosotros postulamos para la heparina sobre las células tumorales M3, a través de receptores de tipo integrinas de la membrana plasmática y resultan sumamente importantes en los procesos de coexistencia de las células en los tejidos normales (Rosales et al 1995). Mediante diversos mecanismos la ME puede regular los procesos de adhesión, migración y proliferación.

Nosotros postulamos que la heparina inhibe la proliferación y aumenta la adhesión en un mecanismo mediado por la unión a receptores. Existen ejemplos por la negativa que refuerzan esta hipótesis. Los efectos de los oncogenes sobre el control de la división celular están íntimamente relacionados con efectos en la adhesión celular. El protooncogen *c-src*, homólogo al oncogen del virus del sarcoma de Rous *(v-src)*, es una tirosina quinasa que contiene un ácido graso que la mantiene unida a la membrana plasmática del lado intracelular y se encuentra distribuida en los sitios de contacto focal donde la célula esta fuertemente unida al soporte de la matriz en la que participan los filamentos de actina. La activación de src, ocasiona una fosforilación en la cola citoplasmática del receptor de la fibronectina produciendo la disrupción de los filamentos de actina (del lado intracelular) y una disminución en la afinidad por la fibronectina (del lado extracelular). La consecuencia final de este proceso es la perdida de los puntos de contacto focal, un redondeamiento de la célula y la perdida de la adhesión (Jove & Hanafusa 1987). Otro ejemplo de factores proliferativos y disminución de la adhesión se observa con el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF). Al estimular fibroblastos quiescentes con PDGF se produce la perdida de los contactos focales y una menor adhesión. Este mecanismo también parecería estar mediado por c-src, sin embargo lo que parece ser un mecanismo normal de los factores de crecimiento que actúan por periodos cortos produciendo una relajación de la adhesión, el efecto de los oncogenes puede ser permanente, alejando a la célula del estado Go y manteniéndolas en un estado proliferativo (Sullivan & Quigley 1986).

Hemos dado algunos ejemplos en los que se ha demostrado que la inhibición de la proliferación se puede asociar con un aumento de la adhesión y como contrapartida ejemplos en los que se asocia una alta capacidad proliferativa con una adhesión disminuida. Sin embargo existe una paradoja dado que en vertebrados las células normales deben adherirse con el sustrato (adhesión célula matriz) para salir de Go y proliferar. Por otra parte muchas células transformadas con oncogenes se hacen "independientes del soporte" para poder proliferar (Folkman & Moscona 1978).

En nuestro modelo, la heparina parecería mimetizar los efectos observados para el heparán sulfato sobre SMC con las consiguientes implicancias fisiológicas sobre la formación de ateromas o en la restenosis, en los que el desnudamiento del endotelio vascular y la pérdida del heparán sulfato de la membrana basal gatillan la proliferación de las SMC del tejido periférico con el consiguiente estrechamiento del lecho vascular. El tratamiento con heparinas y algunas heparinas modificadas inhibe esta proliferación (Edelman & Karnovsky 1994). En este ejemplo, el heparán sulfato de la membrana basal favorece la adhesión de las SMC y la perdida del mismo ocasiona la proliferación celular para regenerar el tejido dañado a pesar de las consecuencias patológicas que desencadena.

Estas observaciones sugieren que la asociación receptor-proliferación-adhesión podría no ser una respuesta típica de las células tumorales sino que sería de gran importancia en las células normales. Estas asociaciones tienen más sentido aún si se confirma una expresión diferencial en el número de receptores para heparina cuando las células están quiescentes o en un estado proliferativo de mayor retardo.

Nuestros estudios han demostrado también que la heparina N-des N-Ac administrada a atas dosis ejerció un leve efecto antitumoral. La ausencia de actividad anticoagulante facilita el uso in vivo de este compuesto, y es probable que el efecto antiproliferativo de la heparina no pueda detectarse por un impedimento en la aplicación d la dosis necesaria. A pesar de que N-des N-Ac retuvo el efecto antiproliferativo in vivo, este no alcanzó los valores deseados para que pueda ser considerada una droga con actividad antitumoral. La causa mas importante para ello es la rápida velocidad de eliminación del organismo que tienen los GAG. Los recientes avances en el empleo de polímeros de liberación lenta, parches subcutáneos y otros derivados podrían mejorar considerablemente la actividad antitumoral observada por nosotros.

Estudios mostrados en esta tesis indican que la heparina inhibe la formación de metástasis experimentales en pulmón, mientras que las heparinas modificadas tanto en los grupos O como en los N-sulfato pierden esta propiedad. Por otro lado, el compuesto B623, un inhibidor específico del uPA (Towle et al 1993) que disminuye la invasión local y aumenta la formación de metástasis (Alonso et al 1996b), revirtió el efecto antimetastásico de la heparina.

Teniendo en cuenta que el modelo de metástasis experimentales mimetiza solamente los eventos finales involucrados en el desarrollo de las metástasis, nosotros investigamos tres hipótesis en los que la heparina podría intervenir y aquí discutiremos una cuarta alternativa no estudiada.

La interpretación de los resultados obtenidos en la actividad antimetastásica requiere conocer las propiedades biológicas de la heparina y las heparinas modificadas.

La tabla 13.1. resume de manera comparativa las diferentes respuestas biológicas observadas entre todas las heparinas modificadas.

TABLA 13.1. Diferencias en la actividad biológica de la heparina y cuatro heparinas modificadas químicamente.

	Unión a receptores	Act. antiprolife rativa	Aumento de la adhesión	Act. antimeta stásica	Aumento de la fibrinólisis por uPA[8]	Suscept. a heparana sas	Act. Anticoagul ante
Heparina	++	++	++	+	+	++	++
N-des N-Ac	+	+	+	-	-	+	-
O-des	-	-	-	-	+	-	-
N-des	-	-	-	-	+	-	-
O/N-des N-Ac	-	-	-	-	-	-	-

La posibilidad de que el efecto antimetastásico sea consecuencia del efecto antiproliferativo parece poco plausible teniendo en cuenta el corto período en que la heparina permanece en circulación. Más aún, la heparina N-des N-Ac que retiene el efecto antiproliferativo, no posee actividad anticoagulante.

En la última etapa de la diseminación metastásica las células se unen al endotelio vascular e inician el proceso de extravasación (Vlodavsky et al 1982). Una inhibición en la adhesión de las células tumorales al endotelio trae aparejado un descenso en el número de metástasis (Gómez et al 1995). Por otro lado, se describió que la heparina inhibe la unión de células a varias glicoproteínas de la matriz extracelular (San Antonio et al 1992; 1993). Este fenómeno se observó también en la unión de células tumorales a fibronectina (Makabe et al 1990; Antachopoulos et al 1995). Sin embargo, la presencia de receptores para heparina en las células empleadas en los trabajos mencionados, no ha sido demostrada.

Nosotros observamos una fuerte correlación entre la unión de las heparinas a sus receptores específicos y un aumento en la adhesión. Más aún, el incremento en la adhesión por la heparina parece mediarse a través de sus receptores ya que genera un aumento adicional al producido por la fibronectina solamente, cuando están presentes ambos sustratos. Por consiguiente, la hipótesis de que el efecto antimetastásico se debe a la modulación de la adhesión podría descartarse no solamente porque la heparina favorece la adhesión, sino por el

hecho de que la heparina N-des N-Ac pierde el efecto antimetastásico pero retiene parcialmente las propiedades estimulatorias sobre la adhesión.

La segunda hipótesis que intentamos analizar se vincula con la actividad Heparinasa producida por las células tumorales. varios trabajos muestran una asociación entre la producción de heparanasas y la formación de metástasis (Vlodavky et al 1982; 1983; Nakajima 1983; 1988). Más aún, GAG capaces de inhibir la degradación del heparán sulfato de la matriz extracelular, también disminuyeron el número de metástasis (Coombe et al 1987; Parish et al 1987). Sin embargo, en estos trabajos no se analizan otros posibles mecanismos de acción de los GAG.

Mientras realizábamos las investigaciones, Bitan y colaboradores (1995) mostraron que la heparina N-des N-Ac, al igual que la heparina, retenía la actividad antimetastásica sobre células del melanoma B16. Esta heparina, es susceptible a la degradación por heparinasas (capitulo 12; Bar-Ner et al 1987).

¿A que se deben las diferencias observadas en el comportamiento de N-des N-Ac entre el trabajo mencionado y nuestras investigaciones? En primer lugar, estos estudios se realizaron en células del melanoma B16, las cuales poseen una actividad Heparinasa mucho mayor que las células LM3, a juzgar por el tiempo necesario para detectar actividad Heparinasa en esas células (Nakajima et al 1983; 1988). En segundo lugar, la vía y el tiempo de inoculación de la heparina fueron diferentes (mas prolongados).

Teniendo en cuenta estos datos, nosotros creemos que sus resultados no están en contradicción con los nuestros, y posiblemente estén reflejando el efecto pleiotrópico de la heparina.

La actividad de las heparanasas son importantes en la intravasación y en la extravasación, a pesar de que en el modelo de metástasis experimental solo se tiene en cuenta el segundo evento. En nuestro protocolo, nosotros elegimos la secuencia de inoculación de heparina -90, +90 y +270 minutos respecto del ingreso de las células tumorales en circulación, debido al corto tiempo de biodisponibilidad que posee (figura 8.4.; Edelman & Karnovsky 1994). Si la extravasación y la degradación de la ME, se inicia, o requiere tiempos mayores de 5-6 horas, las heparinas no estarían disponibles en el organismo en el momento en que las heparanasas entren en juego. De acuerdo al protocolo de inoculaciones establecido, el efecto antimetastásico no fue consecuencia de la inhibición de la actividad Heparinasa dado que N-des N-Ac no inhibió metástasis y es susceptible a la heparinasa producida por las células LM3. Sin

embargo, teniendo en cuenta lo recientemente discutido, nosotros no descartamos que la inhibición de heparinasas sea un mecanismo involucrado en la actividad antimetastásica. La posibilidad de que esto suceda, amerita la necesidad de realizar estudios adicionales, dado que el empleo de la heparina N-des N-Ac facilitaría la utilización clínica dado que no posee actividad anticoagulante. Sin embargo, se necesitaría aumentar la biodisponibilidad de la droga en el organismo, y como ya mencionamos anteriormente quizás se podría reflejar una mayor actividad antitumoral.

Las últimas dos hipótesis que nos plantemos están de alguna manera relacionadas entre ellas, e implican la participación de la coagulación y de la fibrinólisis, en el desarrollo de metástasis y en la actividad antimetastásica de la heparina.

La existencia de una relación entre malignidad y trombosis vascular resulta ser un hecho bastante aceptado. La deposición de fibrina peritumoral podría proteger a las células de la destrucción por parte de células del sistema inmune y disminuir el daño mecánico, lo que aumentaría la posibilidad de sobrevida de la célula y por consiguiente de generar metástasis. El origen preciso de la deposición peritumoral de fibrina no se conoce claramente, pero podría provenir de un aumento en la actividad procoagulante de las células, así como también, por una disminución en la fibrinólisis sistémica.

Nosotros observamos que en nuestro modelo, los ratones portadores de tumor tienen incrementada (o más activada) la cascada de la coagulación. Este hecho, podría relacionarse con la producción de factores procagulantes por parte de las células tumorales. Por otro lado, un descenso en la fibrinólisis sistémica también pudo detectarse (Alonso et al 1993).

La heparina posee actividad anticoagulante y profibrinolítica lo que ocasionarían una menor sobrevida de las células y un descenso en las metástasis.

Al realizar un primer análisis sobre el comportamiento de las heparinas en el desarrollo de las metástasis, rápidamente surge una asociación con sus actividades anticoagulantes. La heparina es la única en inhibir las metástasis, y es la única con capacidad anticoagulante. Sin embargo, nuevas pregunta surgieron al analizar el efecto del compuesto B623. ¿Porqué un inhibidor específico del uPA revierte la actividad anticoagulante de la heparina? ¿Es consecuencia de dos eventos independientes en el cuál uno inhibe, otro aumenta y juntos alcanzan un equilibrio"? Finalmente, la pregunta que nos llevó a realizar estudios sobre la heparina y el uPA fue ¿podría el efecto antimetastásico de la heparina deberse a su capacidad fibrinolítica (principalmente mediada por uPA) y el compuesto B623 revierte este mecanismo?

Lamentablemente, el mecanismo fibrinolítico de la heparina, en particular el mediado por uPA, no se conocía claramente. Menos aún, el posible efecto de las heparinas modificadas químicamente.

Los resultados obtenidos, muestran claramente que la inhibición del número de metástasis no es consecuencia de la actividad fibrinolítica mediada por uPA Tanto la heparina como la heparina O-des y N-des retienen esta propiedad y no inhibieron las metástasis experimentales.

Analizando todos estos hechos conjuntamente, se refuerza la hipótesis, que en estas condiciones experimentales el mecanismo que resultaría el mas importante en la inhibición de las metástasis estaría vinculado a la actividad anticoagulante.

A pesar de que la heparina parece tener éxito como antimetastásico en varios modelos experimentales de cáncer, estos parecerían estar alejados de las situaciones clínicas, dado que en humanos el diagnóstico precede al tratamiento, mientras que en los modelos animales el tratamiento se inicia antes de la inoculación de las células tumorales (Constantini & Zacharski 1992). Sin embargo, en un estudio reciente se observó una disminución en la mortalidad por el tratamiento pre-quirúrgico con heparina de pacientes con cáncer avanzado (Kakkar et al 1995). El tratamiento profiláctico con heparina, se inició 2 horas antes de la operación y continuó durante el periodo postoperatorio durante 7 días como mínimo. Dado que el tumor es extirpado quirúrgicamente, cientos de células viables pueden ser liberadas a circulación durante el procedimiento. Por lo tanto, la terapia adyuvante con heparina podría resultar sumamente beneficioso al disminuir el éxito en la implantación y el crecimiento del tumor secundario. Así, ya se iniciaron estudios clínicos para la aplicación de la heparina en eventos no asociados a las conocidas actividades antitrombóticas y anticoagulantes.

La diversidad de efectos biológicos de la heparina, algunos de ellos estudiados en las investigaciones de esta tesis, contribuyen a un mejor entendimiento de sus mecanismos de acción, aunque mucho camino queda por recorrer para esclarecer la asociación estructura-función de la heparina que lleva 50 largos años de uso clínico y de moléculas análogas que comparativamente recién han nacido.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abildgaard U.** (1968) Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc gel electrophoresis. *Scan. J. Clin. Lab. Invest., 21:89-94*
2. **Abraham J.L. and DeNee P.B.** (1973). Scanning-electron-microscope histochemistry using backscattered electrons and metal atoms. *Lancet 1: 1125-1130*
3. **Alessio M.G., Falanga A., Consonni R., Bassan R., Minetti B., Donnati M.B. and Barbui T.** (1990) Cancer procoagulant in acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. haematol., 45: 78-81.*
4. **Al-Mondhiry H.** (1984) Tumor interaction with hemostasis: the rationale for use of platelet inhibitors and anticoagulants in the treatment of cancer. *Am. J. Hematol., 16:193-202.*
5. **Alonso D.F., Farías E.F. and Bal de Kier Joffé E.** (1993) Impairment of fibrinolysis during the growth of two murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Lett., 70:181-187.*
6. **Alonso D.F., Farías E.F. and Bal de Kier Joffé E.** (1994) Urokinase-type plasminogen activator activity released by clonal tumor cells populations isolated during the growth of a murine mammary adenocarcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res., 13:211-216.*
7. **Alonso D.F., Farías E.F., Urtreger A., Ladeda V., Vidal M. del C. and Bal de Kier Joffé E.** (1996a) Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol., 62: 288-297.*
8. **Alonso D.F., Farías E.F., Ladeda V., Davel L., Puricelli L. and Bal de Kier Joffé E.** (1996b) Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res. Treat., 40: 209-223.*
9. **Amiral J., Plassart V., Contant G. and Guyader A.M.** (1990) Different method for the determination of tissue plasminogen activator (tPA) and of its inhibitor (PAI). *J. Clin. Lab. Inst. Reag., 13:599-610.*
10. **Andersson L.-O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A. and Sims G.E.C.** (1976) Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb. Res., 9: 575-583.*
11. **Andrade-Gordon P. and Strickland S.** (1986) Interaction of heparin with plasminogen activators and plasminogen: Effects on the activation of plasminogen. *Biochemistry 25:4033-4040.*
12. **Andrade-Gordon P. and Strickland S.** (1990) Fractionation of heparin by chromatography on a tissue plasminogen activator-Sepharose column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1865-1869.*
13. **Antachopoulos Ch. T., Iliopoulos D.C., Gagos S., Agapitos M.V., Karayannacos P.E., Roboli S.K. and Skalkeas G.D.** (1995) In vitro effects of heparin on SW40 tumor cell-matrix interaction. *Anticancer Res., 15: 1411-1416.*
14. **Au Y.P.T., Kenagy R.D. and Clowes A.W.** (1992) Heparin selectively inhibits the transcription of tissue-type plasminogen activator in primate arterial smooth muscle cells during mitogenesis. *J. Biol. Chem., 267: 3438-3444.*
15. **Azizkhan R.G., Azizkhan J.C., Zetter B.R. and Folkman J.** (1980) Mast cells heparin stimulates migration of capilary endothelial cell in vitro. *J. Exp. Med., 152: 931-944.*
16. **Baba M.R., Pauwels R., Balzarini J., Arnout J. and Desmyter J.** (1988) Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of HIV in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 6132-6136.*

17. **Bal de Kier Joffé E., Puricelli L., Vidal M del C. and Sacerdote de Lustig E.** (1983) Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J. Exp. Clin. Cancer Res., 2: 151-160.*
18. **Bal de Kier Joffé E., Puricelli L. and Sacerdote de Lustig E.** (1986) Modified adhesion behaviour after in vitro passage of two related murine mammary adenocarcinomas with different metastasizing ability. *Invas. Metast., 6: 302-312.*
19. **Bal de Kier Joffe E., Alonso D. and Puricelli L.** (1991) Soluble factors released by the target organ enhance the urokinase-type plasminogen activator activity of metastatic tumor cells. *Clin. Exp. Metastasis, 9:51-56.*
20. **Bar-Ner M., Eldor A., Wasserman L., Matzner Y., Cohen I.R., Fuks A. and Vlodavsky I.** (1987) Inhibition of heparanase-mediated degradation of extracelullar matrix heparan sulfate by non-anticoagulant heparin species. *Blood, 70:551-557.*
21. **Barton J.K., Basile L.A., Danishefsky A. and Alexandrescu A.** (1984) Chiral probes for the handedness of DNA helices: enantiomers of tris (4,7-diphenylphenantroline) ruthenium (II). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1961-1965.*
22. **Barton J.K., Goldberg J.M., Kumar C.V. and Turro N.J.** (1986) Binding modes and base specificity of tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc., 108: 2081-2088.*
23. **Bârzu, T., Herbert J.M., Desmuliere A., Carayon P. and Pascal M.** (1994) Characterization of rat smooth muscle cells resistant to the antiproliferative activity of heparin following long-term heparin treatment. *J. Cell. Physiol., 160: 239-248.*
24. **Bârzu, T., Pascal M, Maman M., Roque C., Lafont F. and Roussselete A.** (1996) Entry and disribution of fluorescent antiproliferative heparin derivatives into rat vascular smooth muscle cells: Comparison between heparin-sensitive and heparin-resistant cultures. *J. Cell. Physiol., 167: 8-21.*
25. **Bashkin P., Doctrow S., Klagsbrun M., Svahn C-M, Folkman J. and Vlodavsky I.** (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry, 28:1737-1743.*
26. **Bashkin P. Razin E., Eldor A. and Vlodavsky I.** (1990) Degranulating mast cells secrete an endoglycosidase that degrades heparan sulfate in subendothelial extracellular matix. *Blood, 75:2204-2212.*
27. **Bastida E., Ordinas A., Escolar G. and Jamieson G.A.** (1984) Tissue factor in microvesiclesshed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. *Blood, 64: 177-184.*
28. **Bauri M.R., Falanga A., Alessio M.G., Radice E., Consonni R., Giavazzi R. and Donati M.B.** (1992) Blood coagulation changes in nude mice bearing human colon carcinoma . *Int. J. Cancer, 50:75-79.*
29. **Becker R.P. and Sogard M.** (1979). Visualization of sub-surface structures in cells and tissues by backscattered electron imaging. *Scanning Electron Microsc., 2: 835-870.*
30. **Belfort D.A., Hendry I.A. and Parish C.R.** (1992) Ability of different chemically modified heparins to potentiate the biological activity of heparin-binding growth factor I: Lack of correlation with growth factor binding. *Bichemistry 31:6498-6503.*
31. **Bereta J., Bereta M., Cohen S. and Cohen M.C.** (1991) Studies on the role of protein kinases in the TNF-mediated enhancement of murine tumor cell-endothelial cell interactions. *J.Cell Biochem., 47: 62-78.*
32. **Biswas C.** (1988) Heparin and heparan sulfate binding sites on B16 melanoma cells. *J. Cell. Physiol., 136: 147-153.*
33. **Bitan M., Mohsen M., Levi E., Wygoda M.R., Miao H.Q., Lider O., Svahn C.M., Eker H.P., Ishai-Michaeli R. and Bar-Shavit R.** (1995) Structural requeriments for

inhibition of melanoma lung colonization by heparanase inhibiting species of heparin. *Isr. J. Med. Sci., 31(2-3): 106-118.*

34. **Bitter T. and Muir H.M.** (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem., 4: 330-334.*
35. **Blasi F., Vasalli J.D. and Danø K.** (1987) Urokinas-type plasminogen activator: proenzyme, receptors and inhibitors. *J. Cell Biol., 104: 555-565.*
36. **Blasi F.** (1988) Surface receptors for urokinase plasminogen activator. *Fibrinolysis, 2:73-84.*
37. **Bleiberg I., Mc Gregor I. and Aronson N.** (1983) Heparin receptors on mouse macrophages. *Thromb. Res., 29: 53-61.*
38. **Burtin C., Ponvert C., Fray A., Scheinmann P., Lespinats G., Loridon B., Canu P. and Paupe J.** (1985) Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in W/Wv, V/+, +/+ mice. *J. Natl. Cancer Inst., 74: 671-674.*
39. **Callander N.S., Varki N., Rao L.V.** (1992) Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer 70: 1194-1201.*
40. **Carty N.J., Taylor I., Roath O.S., El-Baruni and Francis J.L.** (1992) Tissue procoagulant activity may be important in sustaining metastatic tumor growth. *Clin. Exp. Metastasis 10: 175-181.*
41. **Cassaro C.M.F. and Dietrich C.P.** (1977) The distribution of sulfated mucopolysacharides in invertebrates. *J. Biol. Chem., 252: 2254-2261.*
42. **Castellot J.J., Addonizio M.L., Rosenberg R.D. and Karnovsky M.J.** (1981) Cultured endothelial cells produce a heparin-like inhibitor of smooth muscle cell growth. *J. Cell. Biol., 90: 372-379.*
43. **Castellot J.J, Beeler D.L., Rosenberg R.D. and Karnovsky M.J.** (1984) Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol., 120: 315-320.*
44. **Castellot J.J., Hoover R.L., Harper P.A. and Karnovsky, M.J.** (1985a) Heparin and glomerular epithelial cell secreted heparin-like species inhibit mesangial -cell proliferation. *Am. J. Pathol., 120: 427-435.*
45. **Castellot J.J., Weng K., Herman B., Hoover R., Albertini D., Wrigth T., Caleb B. and Karnovsky M.J.** (1985b) Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol., 124: 13-20.*
46. **Castellot J.J., Pukac L.A., Caleb B.L., Wrigth T.C. and Karnovsky M.J.** (1989) Heparin selectively inhibits protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progressin in calf aortic smooth muscle cells. *J. Cell Biol., 109: 3147-3155.*
47. **Casu, B.** (1985) Structure and biological activity of heparin. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 43: 51-134.*
48. **Clowes A.W. and Karnovsky M.J.** (1977) Supression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature, 265: 625-626.*
49. **Colombo L., Bonaparte Y., Klein S. y Stillitani-D'Elía.** (1980) Selección in vivo de una linea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. *Medicina (Buenos Aires), 40: 827-828.*
50. **Colombo L.** (1986) Obtención y estudio in vitro e invivo de las características de un modelo adecuado para el enfoque de la heterogeneidad celular en la biología del proceso metastásico. *Tesis de Doctorado en Medicina, Fac. de Medicina, UBA.*
51. **Constantini V. and Zacharski L.R.** (1992) The role of fibrin in tumor metastasis. *Cancer Met. Rev., 11: 283-290.*
52. **Coombe D.R., Parish C.R., Ramshaw I.A. and Snowden J.M.** (1987) Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulphated polysaccharides. *Int. J. Cancer, 39: 82-88.*

53. **Coombs J.W., Lagunoff D. and Beneditt E.** (1965) Differentiation and proliferation of embryonic mast cell of the rats. *J. Cell Biol., 75: 577-592.*
54. **Curatolo L., Colucci M., Cambini A.L., Poggi A., Morasca L., Donati M.B. and Semenaro N.** (1979) Evidence that cells from experimental tumours can activate coagulation factor X. *Br. J. Cancer, 40:228-233.*
55. **Chang, J.-Y.** (1989) Binding of heparin to human antithrombin III activates selective chemical modification at lysine 236. *J. Biol. Chem., 264: 3111-3115.*
56. **Choi K. and Claman H.** (1987) Mast cells, fibroblast and fibrosis. *Immunol. Res., 6: 145-152.*
57. **Dabbous M., Walker R., Haney L., Carter L.M., Nicolson G.L. and Wolley D.E.** (1986) Mast cells and matrix degradation at sites of tumor invasion on rat mammary adenocarcinoma. *Br. J. Cancer., 54: 459-464.*
58. **Damus P.S., Hicks M. and Rosenberg R.D.** (1973) Anticoagulant action of heparin. *Nature, 246: 355-357.*
59. **Damon D.H., Lobb R.R., D'Amore P.A. and Wagner J.A.** (1989) Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its half-life. *J. Cell. Physiol., 138: 221-226.*
60. **Damon D.H., Halegoua S., D'Amore P. and Wagner J.A.** (1992) Rapid fibroblast growth factor-induced increase in protein phosphorylation and ornithine decarboxylase activity: regulation by heparin and comparison to nerve growth factor- induced increase. *Exp. Cell Res., 201: 154-159.*
61. **Danø K., Andreasen P.A., Grøndahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L.S. and Skriver L.** (1985) Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res., 44: 139-266.*
62. **Davel L., Miguez M. and Sacerdote de Lustig E.** (1984) Angiogenesis induction by lymphocytes from the tumor bearing mice in a singeneic combination. *Transplantation, 37: 327-331.*
63. **Davel L. y Sacerdote de Lustig E.** (1993) Cáncer y angiogénesis: La angiogénesis como terapia coadyuvante en oncología. *Tumor, 6: 27-31.*
64. **De Vauge M.W., Yamazaki A., Bennet S.A.L., Chen J.H., Shwed P.S., Couture Ch. and Birnboim H.C.** (1994) Immunoselection of grp94/endoplasmin from KNRK cell specific lgt11 library using antibodies directed against a putative heparanase amino terminal peptide. *Int. J. Cancer, 56: 286-294.*
65. **Dexter T., Stoddart R. and Quazzaz S.** (1981) What are mast cells for? *Nature, 91: 110-111.*
66. **Edelberg J.M., Conrad E.H. and Pizzo S.V.** (1991) Heparin oligasaccharides enhanced tissue-type plasminogen activator: A correlation between oligosaccharide length and stimulation of plasminogen activation. *Biochemistry, 30: 10999-11003.*
67. **Edelman E.R. and Karnovsky M.J.** (1994) Contrasting effects of the intermittent and continuous adminstration of heparin in experimental restenosis. *Circulation, 89: 770-776.*
68. **Edwards R.L. Morgan D.L., Rickles F.R.** (1990) Animal tumor procoagulants: Registry of the subcomittee on Haemostasis and <alignancy of the Scientific and Standardization Comittee, International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost., 63: 133-138.*
69. **Enerbäck L.** (1966a) Mast cell in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav., 66: 289-302.*
70. **Enerbäck L.** (1966b) Mast cell in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye binding metachromatic properties. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav., 66: 303-312.*
71. **Enerbäck L., Berlin G., Svensson I. and Rundquist I.** (1976) Quantitation of mast cell heparin by flow cytofluorometry. *J. Histochem. Cytochem., 24: 1231-1238.*

72. **Erlich P.** (1879) Beiträge zur Kerntnitss der granulierten bindegewebszellen und der eosinophilen leukocyten. *Arch. Anat. Physiol., 3: 166-169.*
73. **Esumi N., Todo S. and Imashuku S.** (1987) Platelet aggregating activity mediated by thrombin generation in the NCG human neuroblastoma cell line. *Cancer Res., 47: 2129-2135.*
74. **Esumi N., Fan D. and Fidler I.J.** (1991) Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res., 51: 4549-4556.*
75. **Evans D.LL., Marshall C.J., Christey P.B. and Carrell R.W.** (1992) Heparin binding site, conformational change and activation of antithrombin. *Biochem., 31: 12629-12642.*
76. **Farram E. and Nelson D.** (1989) Mouse mast cells and antitumor effector cells. *Cell. Immunol., 55: 294-301.*
77. **Fidler I.J.** (1970) Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125-I-5-iodo-2-deoxyuridine. *J.Natl.Cancer Inst., 45: 773- 779*
78. **Fidler I.J.** (1976) Patterns of tumor cell arrest and development. En Fundamental Aspects of Metastasis. Weiss L, Ed, North Holland, Amsterdam.
79. **Fidler I.J.** (1978) Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res., 38: 2651-2656*
80. **Fisher E. and Fisher B.** (1965) Role of mast cells in tumor growth. *Arch. Pathol., 79: 185-191.*
81. **Fisher E, Sass R., Wtkins G., Johal J. and Fisher B.** (1985) Tissue mast cells in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat., 5: 285-291.*
82. **Folkman J. and Klagsbrun M.** (1987). Angiogenic factors. *Science, 235: 442-447.*
83. **Folkman J., Weisz P., Joullie M., Li W. and Ewing W.** (1989) Control of angiogenesis with syntethetic heparin subtitutes. *Science, 243: 1490-1493.*
84. **Folkman J.** (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J.Natl.Cancer Inst., 82: 4 -6.*
85. **Galli S.** (1993) New concepts about the mast cell. *New. England J. Med., 328:257-265.*
86. **Giancotti F. and Mainiero F.** (1994) Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochem. Biophys. Acta, 1198: 47-64.*
87. **Glimelius B., Busch C. and Hook M.** (1978) Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cell. *Thromb. Res., 12: 773-780.*
88. **Gogstad G.O., Solum N.O. and Krutnes M.B.** (1983) Heparin binding platelet proteins demostrated by crossed affinity immunoelectrophoresis. *Br. J. Haematol., 53: 563-568.*
89. **Gonzalez A.M., Buscaglia M., Ong M. and Baird A.** (1990) Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement menbrane of diverse tissues. *J. Cell Biol., 110: 753-765.*
90. **Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori C., and Lifshin E.** (1984). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Plenum. Press, New York.*
91. **Gorski A., Wasik M., Nowaczyk M. and Korczak-Kowalska G.** (1991) Immunomodulating activity of heparin. *FASEB J., 5: 2287-2291.*
92. **Graham R. and Graham J** (1966) Mast cells and cancer of the cervix. *Surg. Gynecol. Obstet., 123: 3-9.*
93. **Granelli-Piperno A. and Reich E.** (1978) A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J. Exp. Med., 148: 223-234.*
94. **Hadler W.A., Cruz-Höfling M.A. and Ziti L.M.** (1978). The benzidine technique for histochemical detection of SO4 ion. *Acta Histochem., 61: 197-203.*
95. **Halper J. and Carter B.J.** (1989) Modulation of growth of human carcinoma SW13 cells by heparin and growth factors. *J. Cell. Physiol., 141: 16-23.*

96. **Hatamochi A., Fujiwara K. and Veki H.** (1985) Effect of histamine on collagen synthesis by cultured fibroblasts derived from guinea-pig skin. *Arch. Dermatol. Res., 277: 60-64.*

97. **Hartveit, F.** (1981) Mast cell and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequences. *J. Pathol., 134: 7-11.*

98. **Hauert J., Nicoloso G., Schleuning W., Bachmann F., and Shapira M.** (1989) Plasminogen activators in dextran sulfate-activated euglobulin fractions: a molecular analysis of factor XII- and prekalikrein-dependent fibrinolysis. *Blood, 4: 994-999.*

99. **Heidtmann H.H., Havemann K. and Schwartz-Albiez R.** (1992) Regulation of the plasminogen activator system in non-small cell lung cancer cell lines by growth factors EGF, TGF-alfa, and TGF-beta. *Br. J. Cancer, 65: 154 -157.*

100. **Henderson W., Chi E., Jong E. and Klebanoff S.J.** (1981) Mast cell- mediated tumor cell cytotoxicity: Role of the peroxidase system. *J. Exp. Med., 153: 520-533.*

101. **Horne M.K. and Hart J.S.** (1986) Heparin binding to platelet. *Blood, 68: 317a (suppl. 1).*

102. **Howell W.H. and Holt E.** (1918) Two new factors in blood coagulation: Heparin and pro-antithrombin. *Am. J. Physiol., 47: 328-334*

103. **Ihle J.N., Keller J. and Oroszlan S.** (1983) Biological properties of homogeneous interleukin 3. 1. Demostration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, cell-stimulating factor activity and histamine producing cell-stimulating factor activity. *J. Immunol., 131: 282-290.*

104. **Incardona F., Lewalle J.M., Morandi V., Lambert S., Legrand Y., Foidart J.M. and Legrand C.** (1995) Thrombospondin modulates human breast adenocarcinoma cell adhesion to human vascular endothelial cells. *Cancer Res., 55: 166-173.*

105. **Irimura T., Nakajima M. and Nicolson G.L.** (1986) Chemically modifed heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-β-glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells. *Biochemistry, 25: 5322-5328.*

106. **Ishai-Michaeli R., Svahn C-M, Webwe M., Chajek-Shaul L., Korner G., Eker H.R. and Vlodavsky I.** (1992) Importance of size and sulfation of heparin in release of basic fibroblast growth factor from the vascular endothelium and extracellular matrix. *Biochemistry, 31:2080-2088.*

107. **Jacobsson I, Lindahl U., Jensen J.W., Rodén L., Prihar H. and Feingold D.S.** (1984) Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucurunosyl 5-epimerase. *J. Biol. Chem., 259: 1056-1063.*

108. **Jin L., Nakajima M. and Nicolson. G.L.** (1990) Immunhistochemical localization of heparanase in mouse and human melanomas. *Int. J. Cancer, 45: 1088-1095.*

109. **Johnson W.C. and Helwing E.B.** (1963) Histochemistry of primary and metastatic mucus-secreting tumors. *Ann. NY Acad. Sci., 106: 794-800*

110. **Jove R. and Hanafusa H.** (1987) Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu. Rev. Cell Biol., 3: 31-56.*

111. **Kakkar A.K., Hedges A.R., Williamson R.C.N. and Kakkar V.V.**(1995) Perioperative heparin therapy inhibits late death from metastatic cancer. *Int. J. Oncol., 6: 885-888.*

112. **Kato S. and Gotoh M.** (1990) Application of backscattered electron imaging to enzyme histochemistry of lymphatic capillaries. *J. Electron Microsc., 39: 186-190.*

113. **Keller K.M., Keller J.M. and Kuhn K.** (1986) The c-terminus of type I collagen is a major binding site for heparin. *Biochem. Biophys. Acta, 882: 1-5.*

114. **Kelly J.M., Tossi A.M., McConnell D.J. and OhUigin C.** (1985) A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nuclei Acids Res., 13: 6017-6034.*

115. **Kessler D., Langer R., Pless N. and Folkman J.** (1976) Mast cell and tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer, 18: 703-709.*

116. **Kjellen L., Oldberg A., Rubin K. and Höök M.** (1977) Binding of heparin and heparan sulfate to rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm., 74: 126-131.*

117. **Kluft C., Trumpi-Kalshoven M., Jie A. and Veldhuyzen-Stolk E.** (1979) XII dependent fibrinolysis: A double function of plasma kalikrein and the occurrence of a previously undescribed factor XII- and kalikrein dependent plasminogen activity. *Thromb. Haemost., 41: 756-773.*

118. **Krasna A.I.** (1980) Acridines, deazaflavins and tris (2,2'-bipyridine) ruthenium as catalysts for photoproduction of hydrogen from organic compounds. *Photochem. Photobiol., 31: 75-80*

119. **Kwaan H.C.** ((1992) The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev., 11: 291-311.*

120. **Kyhese-Andersen, J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods, 10: 203-209.*

121. **Labarca C. and Paigen K.** (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem., 102:344-352.*

122. **Ladeda V., Puricelli L., Urtreger A., Alonso D., Kornblihtt A. y Bal de Kier Joffé E.** (1994) Acción del suero y de inhibidores proteásicos sobre la expresión in vitro de fibronectina. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas. 91a.

123. **Laemmli, U.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227: 680-685.*

124. **Lagunoff, D.** (1974) Analysis of dye binding sites in mast cell. *Biochemistry, 13: 3982-3986.*

125. **Laiho M. and Keski-Oja J.** (1989) Growth factors in the relation of pericellular proteolysis: a reviw. *Cancer Res., 49:2533-2553.*

126. **Lane D.A., Björk I. and Lindahl U.** (1992) Heparina and related polysacchareides. Ed. Lane D.A. Plenum Press, New York.

127. **Lauri D., Martin-Padura I., Biondelli T., Rossi G., Bernasconi S., Giavazzi R., Passerini F., Vanhinsbergh V. and Dejan E.** (1991) Role of beta 1 integrins in tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. *Lab. Invest., 65: 525-532.*

128. **Lauria de Cidre L. and Sacerdote de Lustig E.** (1990) Mast cell kinetics during tumor growth. *Tumor Biol., 11: 196-201.*

129. **Lauría de Cidre L.** (1994) Accion de los mastocitos en el desarrollo tumoral. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

130. **Lawes G.** (1987) Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Wiley, Chichester De.

131. **Lawler J. and Slayter H.** (1981) The release of heparin binding peptides from platelets thrombospondin by proteolytic action of thrombin, plasmin and trypsin. *Throm. Res., 22: 267-279.*

132. **Lederman S., Gulick R. and Chess L.** (1989) Dextran sulfate and heparin interact with CD4 molecules to inhibits the binding of coat protein (gp120) of HIV. *J. Immunol., 143: 1149-1154.*

133. **LeBaron R.G., Esko J.D., Woods A., Johansson S. and Höök M.** (1988) Adhesion of glycosaminoglycans-deficient chinase hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *J. Cell Biol., 106: 945-952.*

134. **Leung L., Katsuyasu S. and Grant D.** (1989) Heparin binds to human monocytes and modulates their procoagulant activities and secretory phenotypes. Effect of histidine-rich glycoprotein. *Blood, 73: 177-184.*

135. **Lev R. and Spicer S.S.** (1964) Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem., 12: 309-314*

136. **Lidholt K., Kjellén L. and Lindahl U.** (1989) Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes. *Biochem. J., 261: 999-1007.*

137. **Lindahl U., Bäckström G., Höök M., Thunberg L., Fransson L.Å. and Linker A.** (1979) Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76: 3198-3202.*

138. **Lindahl U., Backström G., Thunberg L. and Leder I.G.** (1980) Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin binding-sequence of heparin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77: 6551-6555.*

139. **Lindahl U., Backström G. and Thunberg L.** (1983) The antithrombin binding-sequence in heparin. Identification of an essential 6-O-sulfate group. *J. Biol. Chem., 258: 599-609.*

140. **Lindahl U., Thunberg L., Backström G., Riesenfeld J., Nordling K. and Björk I.** (1984) Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J. Biol. Chem., 259: 12368-12373.*

141. **Lindahl U., Feingold D.S. and Rodén L.** (1986) Bioynthesis of heparin. *TIBS, 11: 221-225.*

142. **Lindahl U.** (1989) Heparin: Chemical and biological properties; Clinical applications . Ed. por Lane D.A. y Lindahl, U. Eds. Edward. Arnol Ltd. London.

143. **Liotta L.A., Goldfarb R., Brundage R., Siegal G., Terranova V. and Garbisa S.** (1981) Effects of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res., 41: 4629-4636.*

144. **Liotta L.A., Thorgeirsson U.P. and Garbisa S.** (1982) Role of collagenases in tumor cell invasion. *Cancer Metast. Rev., 1:277-288.*

145. **Liotta L.A.** (1986) Tumor invasion and metastasis- Role of the exctracellular matrix. *Cancer Res., 46: 1-7.*

146. **Liotta L.A., Steeg P.S. and Stetler-Stevenson W.G.** (1991) Cancer Metástasis and angiogénesis- an imbalance of positive and negative regulation. *Cell, 64:327-336.*

147. **Lobb R.R., Sasse J., Shing Y., D'Amore P., Sullivan R., Jacobs J. and Klagsbrun M.** (1986) Purification and characterization of heparin-binding growth factors. *J. Biol. Chem., 261: 1924-1928.*

148. **Love L.D.** (1979) Fluorescence microscopy of viable mast cell stained with different concentrations of acridine orange. *Histochemistry, 62: 221-225.*

149. **Llorente A.R., Del Castillo P. and Stockert J.C.** (1989) Aluminium binding to chromatin DNA as revealed by formation of fluorescent complexes with 8-hidroxyquinolone and other ligands. *J. Microsc., 155: 227-230.*

150. **Manda T., Nishigaki F., Mori J.** (1988) Important role of serotonine in the antitumor effects of recombinant human TNF α in mice. *Anal. Biochem., 48: 4250-4255.*

151. **Markwardt E.G. and Klöcking H.P.** (1977) Heparin-induced release of plasminogen activator. *Haemostasis, 6:370-374.*

152. **Matzner Y., Bar-Ner M., Yahalom J., Ishai-Michaeli R., Fuks Z. and Voldavky I.** (1985) Degradation of heparan sulfate in the subendothelilal extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *J. Clin. Invest., 76: 1306-1313.*

153. **McAvoy T.J.** (1979) Pharmacokinetiks modeling of heparina and its clinical inplications. *J. Pharmacokinet Biopharm., 7: 331- 354.*

154. **McCarthy J.B. and Furcht L.T.** (1984) Laminin and fibronectin promote the heptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. *J. Cell. Biol., 98: 1474-1480.*

155. **McCarthy J.B., Hagen S.T. and Furcht L.T.** (1986) Human fibronectin contains distinct adhesion - and motility - promoting domains for metastatic melanoma cells. *J. Cell. Biol., 102: 179-188.*

156. **McCarthy J.B., Skubitz A.P.N., Palm S.L. and Furcht L.T.** (1988) Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin. *J. Natl. Cancer Inst., 80: 108-116.*

157. **Mc Lean J.** (1916) The thromboplastic action of cephalin. *Am. J. Physiol. 42, 250-255*

158. **Mello M.L.S., Campos Vidal B., Planding W. and Schenk U.** (1994) Image analysis: video system adequacy for the assortment of nuclear phenotypes based on chromatin texture evaluation. *Acta Histochem. Cytochem., 27: 23-31.*

159. **Módis L. and Batschwarowa M.** (1969) Fluorescence histochemical investigations of connective tissue. III. Fluorescence histochemistry of the heparin content of mast cell. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung., 17: 235-240.*

160. **Morgas A., García-Bonafé M., Torresi I. and Sans M.** (1993) Textural analysis of lymphoid cells in serous effusions. *Analyt. Quant. Cytol. Histol., 15: 165-170.*

161. **Moskowitz R.W., Schwartz H.J., Michel B., Ratnoff O.D. and Astrup T.** (1970) Generation of kinin-like agents by chondroitin sulfate, heparin, chitin sulfate and human articular cartilage. Possible pathophysilogic implications. *J. Lab. Clin. Med., 76: 790-798.*

162. **Muro A., Puricelli L., Kornblihtt A.R. and Bal de Kier Joffé E.** (1991) Inverse correlation between fibronectin mRNA levels and the metastatic potential of two murine mammary adenocarcinomas. *Invas. Metast., 11: 281-287.*

163. **Murphy C.J., Arkin M.R., Jenkins Y., Ghatlia N.D., Bossman S.H., Turro N.J. and Barton J.K.** (1993) Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix. *Science, 262: 1025-1029.*

164. **Nader H.B., Ferreira T.M.P.C., Paiva J.F., Medeiros M.G.L., Jerônimo S.M.B., Paiva VM.P.P. and Dietrich C.P.** (1984) Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of moluscs. *J. Biol. Chem., 259: 1431-1435.*

165. **Nader H.B., Porcinatto M.A., Tersariol I.L.S., Pinhal M.A.S., Oliveira F.W., Moraes C.T. and Dietrich C.P.** (1990) Purification and substrate specificity of heparitinase Y and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum. J. Biol. Chem., 265: 16807-16813.*

166. **Nader H.B., Oliveira F.W., Jerônimo S.M.B., Chavante S.F., Sampaio L.O. and Dietrich C.P.** (1996) Syncronized order of appearance of hyaluronic acid (or acid galactan) > chondroitin C-6 sulfate > chondroitin C-4/C-6 sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate > heparin during morphogenesis, differentation and development. *Braz. J. Med. Biol. Res., 29: 1221-1226.*

167. **Nakajima M., Irimura T., Di Ferrante D., Di Ferrante N. and Nicolson G.L.** (1983) Heparan sulfate degradation: Relation to tumour invasion and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. *Science, 220: 611-613.*

168. **Nakajima M., Irimura T. and Nicolson G.L.** (1988) Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem., 36: 157-167.*

169. **Nicolson G.L.** (1989) Metastatic tumor cell interactions with the endothelium basement membrane and tissue. *Curr. Opin. Cell Biol., 1: 1009-1015*

170. **Norby K.** (1985) Evidence of mast cell histamine being mitogenic in intact tissue. *Agents Actions, 16: 287-291.*

171. **Nordlund J. and Askenase P.** (1983) The effect of histamine, antihistamine, and a mast cell stabilizer on the growth of Could-man melanoma cells in DBA/2 mice. *J. Invest. Dermatol., 81: 28-31.*

172. **Nowell PC.** (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science, 194: 23-28.*

173. **Ogura K. and Hasegawa Y.** (1980) Aplication of backscattered electron image to biological specimens. *J. Electron Microsc., 29: 68-71.*

174. **Oosta G.M., Favreau L.V., Beeler D.L. and Rosenberg R.D.** (1982) Purification and properties of human platelet heparitinase. *J. Biol. Chem., 25: 11249-11255.*

175. **Ottlinger M.E., Pukac L.A. and Karnovsky M.J.** (1993) Heparin inhibits mitogenic actived protein kinase activation in intact rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem., 268: 19173-19176.*

176. **Oyama V. and Eagle H.** (1956) Measurement of cell growth in tisue culture with phenol reagent (Folin-Ciocalteau). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91: 305-307.*

177. **Padawer J.** (1973) Identification of mast cell in the SEM by cathodoluminiscence or X-ray analysis. *J. Histochem. Cytochem., 21: 414-415.*

178. **Paget S.** (1889) The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet, 1: 571-576*

179. **Pâques E. -P., Stöhr H. -A. and Heimburger N.** (1986) Study on the mechanism of action of heparin and related substances on the fibrinolytic system: Relationship between plasminogen activators and heparin. *Thromb. Res., 42: 797-807.*

180. **Parish C.R., Coombe D.R., Jakobsen K.B., Bennett F.A. and Underwood P.A.** (1987) Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *Int. J. Cancer, 40: 511-518.*

181. **Paul D., Niewiarowsky S., Varma K.G. and Rucker S.** (1980) Inhibition of mitogenic activity of a platelet growth factor (platelet basic protein) in 3T3 cells by heparin. *Thromb. Res., 18: 883-888.*

182. **Pauli B.U., Schwartz D.E., Thonar E.J. and Kuettner K.E.** (1983) Tumor invasion and host extracellular matrix. *Cancer Metast. Rev., 2: 129-152.*

183. **Pauli B.U. and Knudson W.** (1988) Tumor invasion: a consequence of a destructive and copositional matrix alteration. *Hum.Pathol., 19: 628-634*

184. **Paweletz N. and Boxberger H.J.** (1994) Defined tumor cell-host interaction are necesary for tumor growth. *Critical Rev.Oncogen, 5: 69-75*

185. **Pearlstein E., Ambrogio C., Gasic G. and Karpatkin S.**(1981) Inhibition of the platelet-aggregating activity of two human adenocarcinomas of the colon and an anaplastic murine tumor with a specific thrombin inhibitor, dansylarginine N-(3-ethyl-1,5-pentanediyl)amide. *Cancer Res., 41: 4535-4539.*

186. **Pearse, A.G.E.** (1968) Histochemistry. Theroritical and applied. Vol. 1. 3rd ed. London, Churchill.

187. **Pejler G. and Berg L.** (1995) Regulation of rat mast cell proteasa 1 activity. Protease inhibition is prevented by heparin proteoglycan. *Eur. J. Biochem., 233: 192-199.*

188. **Pettersson I., Kusche M., Unger E., Wlad H., Nylund L., Lindahl L. and Kjellén L.** (1991) Biosynthesis of heparin. Purification of a 110-kDa mouse mastocitoma protein required for both glucosaminyl N-deacetylation and N-sulfation. *J. Biol. Chem., 266: 8044-8049.*

189. **Porta R., Pescador R., Niada R., Diamantini G., Fedeli G.F., Mantovani M. and Prino G.** (1989) Profibrinolytic activities of chemically modified heparins with very low anticoagulant activities. *Throm. Res., 53: 435-445.*

190. **Pukac L.A., Castellot JJ., Wrigth T.C., Caleb B.L. and Karnovsky M.J.** (1990) Heparin inhibits c-fos and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Regul., 1: 435-443.*

191. **Pukac L.A., Hirsch G.M., Lormeau J-C., Petitou M., Choay J. and Karnovsky M.J.** (1991) Antiproliferative effects of novel, nonanticoagulant heparin derivitives on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.;139: 1501-1509.*

192. **Pukac L.A., Ottlinger M.E. and Karnovsky M.J.** (1992) Heparin supresses specific second messenger pathways for protooncogene expression in rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem., 267: 3707-3711.*

193. **Puricelli L., Gomez D.E., Vidal M. del C., Eiján A.M., Spinelli O., Alonso D.F., Sacerdote de Lustig E. and Bal de Kier Joffé E.** (1994) Effect of host-organ environment on the in vivo and in vitro behavior of a murine mammary adenocarcinoma. *Tumor Biol., 15: 284-293.*

194. **Raz A., Meromsky L. and Carmi P.** (1984) Monoclonal antibodies to endogenous galactose especifc tumor cell lectins. *EMBO J., 3: 2979-2985*

195. **Raz A. and Lotan R.** (1987) Endogenous galactoside-binding lectins: an new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metast. Rev., 6: 433-439*

196. **Redini F., Moczar E., Antoine E. and Poupon M.F.** (1989) Binding and internalization of exogenous glycosaminoglicans in weakly and highly metastatic rhabdomyosarcoma cell. *Biochem. Biophys. Acta, 991: 359-366.*

197. **Rehmann J.P. and Barton J.K.** (1990) 1H NMR studies of tris(phenantroline) metal complexes bound to oligonucleotides: characterization of binding modes. *Biochemistry, 29: 1701-1709.*

198. **Reilly C.F., Fritze L.M.S. and Rosenberg R.D.** (1987) Antiproliferative effects of heparin on vascular smooth muscle cell are reversed by epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol., 131: 149-157.*

199. **Reilly C.F. Fritze L.M.S. and Rosenberg R.D.** (1988) Heparin-like molecules regulate the number of epidermal growth factors on vascular smooth muscle cell. *J. Cell. Physiol., 136: 23-32.*

200. **Reilly C.F., Kindy M.S., Brown E.E., Rosenberg R.D. and Sonenshein G.E.** (1989) Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem., 264: 6990-6995.*

201. **Rickles F.R. and Edwards R.L.** (1983) Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood, 62: 14-31.*

202. **Rickles F.R., Hancock W.W., Edwards R.L. and Zacharsky L.R.** (1988). Antimetastatic agents. Role of cellular procoagulants in the pathogenesis of fibrin deposition in cancer and the use of anticoagulants and/or antiplatelet drugs in cancer treatment. *Semin. Thromb. Hemost., 14: 88-94.*

203. **Rickles F.R., Levine M. and Edwards R.L.** (1992) Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metast. Rev., 11: 237-248.*

204. **Riesenfeld J., Thunberg L., Höök M. and Lindahl U.** (1981) The antithrombin binding -sequence of heparin. Localization of essential N-sulfate groups. *J. Biol. Chem., 256: 2389-2394.*

205. **Ristow H.J. and Messmer T.O.** (1988) Heparin as a growth inhibitor for cultured keratinocytes. *J. Cell. Biol., 107: 269a.*

206. **Rocha E., Páramo J., Fernández F., Cuesta B., Hernández M., Paloma M. and Rifón J.** (1989) Clotting activation and impairment of fibrinolysis in malignancy. *Thromb. Res., 54: 699-707.*

207. **Roche W.** (1985) Mast cell and tumors: the specific enhancement of tumor proliferation in vitro. *Am. J. Pathol., 119: 57-64.*

208. **Rochow T.G. and Rochow E.G.** (1978) An introduction to microscopy by means of light, electrons, X-rays, or ultrasound. Plenum. Press, New York, London.

209. **Rosales C., O'Brien V.O., Kornberg L. and Juliano R.** (1995) Signal trnsduction by cell adhesion receptors. *Biochem. Biophys. Acta, 1242: 77-98.*

210. **Rosenberg R.D. and Damus P.S.** (1973) The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem., 248: 6490-6505.*

211. **Rosengart T.K., Johnson W.V., Friesel R., Clark R. and Maciag T.** (1988) Heparin protects heparin-binding growth factor-I from proteolytic inactivation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 152: 432-440.*

212. **Saksela O.** (1981) Radial caseinolysis in agarose: a simple method for detection of plasminogen activator in the presence of inhibitor substanses and serum. *Anal. Biochem., 111: 276-282.*

213. **Sakashita S., Engvall E. and Ruoslahti E.** (1980) Basement membrane glycoprotein laminin bind to heparin. *FEBS Lett., 116: 243-246.*

214. **San Antonio J.D., Lander A.D., Wright T.C. and Karnovsky M.J** (1992) Heparin inhibits the attachment and growth of Balb/c-3T3 fibroblasts on collagen sustrata. *J. Cell. Physiol., 150: 8-16.*

215. **San Antonio J.D., Slover J., Lawler J., Karnovsky M.J. and Lander A.D.** (1993) Specificity in the interacctions of extracellular matrix proteins with supopulations of the glycosaminoglycans heparin. *Biochem., 32: 4746-4755.*

216. **Sasisekharan R., Blumer M., Moremen K.W., Cooney C.L. and Langer R..** (1993) Cloning and expression of heparinase I gene from *Flavobacterium heparinum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 3660-3664.*

217. **Schilt A.A.** (1969) Analytical applications of 1,10-phenantroline and related compounds. International Series of Monogrphs in Analytical Chemistry. Vol 32, Pergamon Press, Oxford.

218. **Schwartz L** (1994) Mast cells: function and contents. *Curr. Opp. Immunol., 6: 91-97.*

219. **Scott J.E.** (1973) Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. *Biochem. Soc. Trans., 1: 787-806.*

220. **Smith S. and Basu P.** (1970) Mast cells in corneal immune reaction. *Can. J. Ophthalmol., 5: 175-183.*

221. **Soligo D., Pozzoli E., Nava M.T., Polli N., Lambertenghi-deliliers G. and de Harven E.** (1983) Cytochemical methods for the backscattered electron imaging mode of scanning electron microscopy: Further applications to the study of human leukemic cells. *Scanning Electron Microsc., 39: 186-190.*

222. **Soncin F., Shapiro R. and Fett JW.** (1994) A cell-surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin. *J. Biol. Chem., 269: 8999-9005.*

223. **Spicer S.S. and Duvenci J.** (1964) Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exorbital lacrimal glands. *Anat. Rec., 149: 333-357.*

224. **Stauber W.T., Miller G.R., Gibala M.J. and Mac Dougall J.D.** (1995) Use of double labelling and photo CD for morphometric analysis of injured skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem., 43: 1179-1184.*

225. **Stein P.L., Van Zonneveld A.J., Pannekock H. and Strickland S.** (1989) Structural domains of human tissue-type plasminogen activator that confer stimulation by heparin. *J. Biol. Chem., 264: 15441-15444.*

226. **Stephens R.W., Pöllänen J., Tapiovaara H., Woodrow G. and Vaheri A.** (1991) Stimulation of cell surface plasminogen activation by heparin and related polyionic substances. *Semin. Thromb. Hemost., 17: 201-209.*

227. **Sterk A.R. and Ishizaka T.** (1982) Binding properties of IgE receptors on normal mouse mast cells. *J. Immunol., 128: 838-843.*

228. **Stockert J.C. and Armas-Portela R.** (1995) Selective staining reaction of the cationic complex tris(1,10-phenantroline)-iron (II) with cell and tissue polyanions. *Biocell, 19: 43-48.*

229. **Sullivan L.M. and Quigley J.P.** (1986) An anticatalytic monoclonal antibody to avian plasminogen activator: its effect on behavior of RVS-transformed chick fibroblast. *Cell, 45: 905-915.*

230. **Tanooka H., Kitamura Y., Sado T., Tanaka K., Nagase M. and Kondo S.** (1982) Evidense for involvement of mast cells in tumor supression in mice. *J. Nat. Cancer. Inst., 69: 1305-1309.*

231. **Terranova V.P., Di Florio R., Lyall R.M., Hic S., Friesel R. and Maciag T.** (1985) Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell Biol., 101: 2330-2334.*

232. **Thompson S.M.** (1966). Selected histochemical and histopathological methods. Springfield, IL, Charles C. Thomas.

233. **Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M.W., Mosmann T.R., Moore K.W. and Rennick D.M.** (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cell and their progenitors. *J. Exp. Med., 173: 507-513*

234. **Tiozzo R., Reggiani D., Cingi M.R., Bianchi P., Osima B. and Calandra S.** (1991) Effect of heparin derived fractions on the proliferation and protein synthesis of cell in culture. *Thromb. Res., 62: 177-188.*

235. **Todd A. S.** (1977) Endothelium and fibrinolysis. *Atherosclerosis, 15:137-140.*

236. **Towle M.J., Lee A., Maduakor E.C., Schwartz C.E., Bridges A.J. and Littlefield B.A.** (1993) Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidines: an important new class of selective synthetic urokinase inhibitor. *Cancer Res., 53: 2553-2559.*

237. **Trigoso C.I., Tato A., Ferrer J.M. and Stockert J.C.** (1992) Localization of metal cations in horse eosinophil leucocytes as revealed by the Timm sulphide-silver method and energy-dispersive X-ray microanalysis. *Eur. Arch. Biol., 103: 231-237.*

238. **Tunuli M.S. and Fendler J.H.** (1981) Aspects of artifitcal photosynthesis. Photosensitized electron transfer across bilayers, charge separation, and hydrogen production in anionic surfactant vesicles. *J. Am. Chem. Soc., 103: 2507-2513*

239. **Twail N.J., Wilson P. and Carbonetto S.** (1993) Integrins in points contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation and point contacts vs focal contacts. *J. Cell Biol., 120: 261-271.*

240. **Ueda T., Aozasa K., Tsujimoto M., Yoshikawa H., Kato T., Ono K. and Matsumoto K.** (1988) Prognostic significance of mast cells in soft tissue sarcoma. *Cancer, 62: 2416-2419.*

241. **Urtreger, A.J., Ladeda V.E., Puricelli L.I., Rivelli A, Vidal M. del C., Sacerdote de Lustig E. and Bal de Kier Joffé E.** (1997) Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated to the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol., 11: 489-496.*

242. **Vairel E.G., Bouty-Boye H., Toulemonde F., Doutremepuich C., Marsh N.A. and Gaffney, P.J.** (1983) Heparin and low molecular weight fraction enhances thrombolysis and by this pathway excercises a protective effect against thrombosis. *Thromb. Res., 30: 219-224.*

243. **Vasalli J.D. and Bellin D.** (1987) Amiloride selectively inhibit the urokinase type plasminogen activator. *FEBS lett., 214: 187-191.*

244. **Verstraete M** (1990) Pharmacoherapeutic aspects of unfractionated and low molecular weight heparin. *Drugs, 40: 498-530.*

245. **Vinazzer H., Stemberger A., Haas S. and Blümel G.**(1982) Influence of heparin, of different heparin fractions and of a low molecular weight heparin-like substance on the mechanism of fibrinolysis. *Thromb. Res., 27: 341-352.*

246. **Vlodavsky I., Ariav Y., Atzmon R. and Fuks Z.** (1982) Tumor cell attachment to the vascular endothelium and subsequent degradation of the subendothelial extracellular matrix. *Exp. Cell Res., 140:145-151.*

247. **Vlodavsky I., Fuks Z., Bar-Ner M., Ariav Y. and Schirrmacher V.** (1983) Lymphoma cell mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendethelial extracellular matrix: Relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res., 43: 2704-2711.*

248. **Vlodavky I., Eldor A., Haimovitz-Friedman A., Matzner Y., Ishai-Michaeli R., Lider O., Naparstek Y., Cohen I.R. and Fuks Z.** (1992) Expression of heparanase by Platelets and Circulating Cells of the immune system: Possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invas. Metast., 12:112-127.*

249. **Weiss L., Orr F.W. and Honn K.V.** (1989) Interactions between tumor cells and the microvasculature: a rate regulator of metastasis. *Clin. Exp .Metast., 7: 127-134*

250. **West S.S., Golden J.F., Menter J.M. and Love L.** (1976) Quantitation of fluorescence fading phenomena for identifying intracellular biopolymers. *J. Histochem. Cytochem., 24: 59-63.*

251. **Woods A., Couchman R., Johansson S. and Höök M.** (1986) Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J. 5: 665-670.*

252. **Wrigth T.C., Johostone T.V., Castellot J.J. and Karnovsky M.J.** (1985) Inhibition of rat cervical epithelial cell growth by heparin and its reversal by EGF. *J. Cell. Physiol., 125: 499-506.*

253. **Wrigth T.C. and Karnovsky M.J.** (1987) Metabolic effects of heparin on rat cervical epithelial cells. *J. Cell. Physiol., 132: 255-262.*

254. **Wrigth T.C., Pukac L.A. Castellot J.J., Karnovsky M.J., Levine R.A., Kim-Park H.Y. and Campisi J.** (1989) Heparin supresses the induction of c-fos and c-myc mRNA in murine fibroblasts by selective inhibition of protein kinase C-dependent pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 3199-3203.*

255. **Wun T.C., Schleuning W.D. and Reich E.** (1982) Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem., 257: 3276-3283.*

256. **Yamada K.M., Kennedy D.W., Kimata K. and Pratt R.M.** (1980) Characterization of fibronectin interactions with glycosaminoglycans and identification of active proteolytic fragments. *J. Biol. Chem., 255: 6055-6063.*

257. **Yamanishi H., Nonomura N., Tanaka A., Nishizawa Y., Terada N., Matsumoto K. and Sato B.** (1991) Proliferation of shingoi carcinoma 115 cells by glucocorticoid-induced autocrine heparin-binding growth factor(s) in serum free medium. *Cancer Res., 51: 3006-3010.*

258. **Yayon A. and Klagsbrun M.** (1990a) Autocrine transformation by a chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87: 5346-5350.*

259. **Yayon A. and Klagsbrun M.** (1990b) Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev., 9: 191-202.*

260. **Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P. and Ornitz D.M.** (1991) Cell-surface, heparin -like molecules are requiered for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell, 64: 1924-1928.*

261. **Zacharski L.R., Memoli V.A., Ornstein D.L., Rousseau S.M., Kisiel W. and Kudryk B.J.** (1993) Tumor cell procoagulant and urokinase expression in carcinoma of the ovary. *J. Nat.Cancer Inst., 85: 1225-1230.*