

Tesis de Posgrado

Resistencia concomitante antitumoral inducida por tumores murinos de distintos grados de inmunogenicidad

Franco, Marcela

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:

Franco, Marcela. (1998). Resistencia concomitante antitumoral inducida por tumores murinos de distintos grados de inmunogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3062_Franco.pdf

Cita tipo Chicago:

Franco, Marcela. "Resistencia concomitante antitumoral inducida por tumores murinos de distintos grados de inmunogenicidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3062_Franco.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DOCTORAL

***RESISTENCIA CONCOMITANTE ANTITUMORAL INDUCIDA POR
TUMORES MURINOS DE DISTINTOS GRADOS DE
INMUNOGENICIDAD***

Autora: Licenciada Marcela Franco

Director: Dr Raúl A. Ruggiero

-1998-

Nº 3 06 2 3062

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

DOCTORAL THESIS

***CONCOMITANT ANTITUMOR RESISTANCE INDUCED BY
MURINE TUMORS OF WIDELY DIFFERENT IMMUNOGENICITY***

Author: Lic. Marcela Franco

Director: Dr Raúl A. Ruggiero

-1998-

INDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCION	5
EL CONCEPTO DE NEOPLASIA	6
NEOPLASIAS BENIGNAS Y MALIGNAS:	7
<i>Clasificación de las neoplasias malignas</i>	8
METÁSTASIS	8
INTERACCIONES TUMOR - HUÉSPED.....	9
LOS TUMORES Y EL SISTEMA INMUNE.....	10
EFECTO DE UN TUMOR PRIMARIO SOBRE LAS METÁSTASIS DISTANTES	13
EL MODELO DE RESISTENCIA CONCOMITANTE ANTITUMORAL.....	13
<i>Mecanismos de Resistencia Concomitante</i>	15
EL CICLO CELULAR Y EL CANCER.....	19
LA APOPTOSIS Y EL CANCER.....	21
OBJETIVO	23
MATERIALES Y METODOS	26
ANIMALES.....	27
TUMORES	27
CALCULO DE LA "DOSIS TUMORAL 50" (DT50).....	29
ENSAYOS DE INMUNIZACION.....	29
ENSAYO DE RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	30
EXAMEN HISTOLOGICO	31
TECNICA DE UNION DE DOS RATONES EN PARABIOSIS.....	31
MEDIO DE CULTIVO.....	33
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS Y COMPLEMENTO IN VITRO.....	33
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS IN VITRO.....	33
ENSAYO DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE ESPLENOCITOS	34
TEST DE WINN	34
RECuento DE VASOS SANGUINEOS QUE DRENAN EL TUMOR SECUNDARIO.....	34
SUERO.....	35
DIALISIS.....	35
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA SEPHADEX G-15.....	35
CELULAS EN CULTIVO.....	36
ENSAYO DE PROLIFERACION IN VITRO MEDIDA POR INCORPORACION DE (³ H)TIMIDINA	38
ENSAYO DE DETECCION DE APOPTOSIS POR CITOFLUOROMETRIA DE FLUJO.....	39
TECNICA DE VISUALIZACION DE APOPTOSIS POR TINCION CON COLORANTES FLUORESCENTES.....	40
ANALISIS DE LA DISTRIBUCION EN EL CICLO CELULAR POR CITOFLUOROMETRIA DE FLUJO.....	40
OBTENCION DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS TUMORALES	41
TECNICA DE DETECCION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRIA DE FLUJO.....	42
DOSAJE DE CORTICOSTERONA EN SUERO	43
DOSAJE DE TNF α (TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALFA) EN SUERO	43
DOSAJE DE NITRITOS (NO ₂ -) EN SUERO DESPROTEINIZADO DE RATONES PORTADORES DE TUMOR.....	44
ANALISIS ESTADISTICO	44
RESULTADOS	45
PRIMERA PARTE	
CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS NUEVE TUMORES MURINOS ESTUDIADOS.....	46
GRADO DE INMUNOGENICIDAD	48
RESISTENCIA CONCOMITANTE GENERADA POR NUEVE TUMORES MURINOS EN RATONES BALB/C.....	50
ROL DEL TIMO EN EL FENÓMENO DE RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	56
ESTUDIO DEL GRADO DE ESPECIFICIDAD DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE	58

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEL TUMOR SECUNDARIO DE REANUDAR SU CRECIMIENTO AL EXTIRPAR EL TUMOR PRIMARIO.....	61
SEGUNDA PARTE	
EXAMEN HISTOLÓGICO DEL TUMOR SECUNDARIO MC-C Y LB INHIBIDO POR RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	64
ESTUDIO DE LOS PATRONES DE PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR EN EL TUMOR SECUNDARIO MC-C O LB INHIBIDO POR RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	73
INDUCCIÓN DE ALTERACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN EN EL CICLO CELULAR.....	88
TERCERA PARTE	
ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR, Y SU PARTICIPACIÓN	92
INHIBICIÓN DE LA NEOVASCULARIZACIÓN EN EL TUMOR SECUNDARIO MC-C O LB INHIBIDO POR RESISTENCIA CONCOMITANTE.....	101
FACTORES SOLUBLES ANTITUMORALES: ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO DE RATONES BALB/C. PORTADORES DE TUMOR SOBRE LA PROLIFERACIÓN IN VITRO DE LAS CÉLULAS TUMORALES.....	104
<i>Caracterización funcional de la actividad inhibitoria sérica:</i>	108
<i>Caracterización parcial de los factores séricos antitumorales asociados a la actividad antiproliferativa y de inducción de alteraciones en el ciclo celular y apoptosis.</i>	126
<i>Curso temporal de los distintos efectos exhibidos por fracciones de bajo peso molecular.</i>	140
DISCUSION	143
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	162
BIBLIOGRAFIA	164
PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS , etc	174
AGRADECIMIENTOS	177

RESUMEN

La resistencia concomitante antitumoral (RC) es la capacidad de un individuo portador de un tumor de inhibir el crecimiento de un segundo implante tumoral realizado en un sitio distinto del primero. Se estudió este fenómeno en ratones eutímicos y atímicos, usando nueve tumores murinos con distintos grados de inmunogenicidad. Se describieron dos picos de RC durante el desarrollo del tumor primario. El primer pico fue generado sólo por tumores inmunogénicos pequeños, fue específico e irreversible y estuvo asociado a mecanismos inmunológicos convencionales dependientes del timo. El segundo pico de RC fue compartido por tumores inmunogénicos y no inmunogénicos de gran volumen, fue inespecífico, timo-independiente y al menos en parte, reversible y estuvo asociado a la actividad de un factor/es inhibidor de aproximadamente 1000 D de peso molecular, presente en el suero de ratones portadores de tumor. Este factor ejercería un efecto inhibitorio directo e indirecto sobre el tumor secundario: el efecto directo se ejercería sobre las propias células tumorales; el efecto indirecto se ejercería a través de la inhibición de la neovascularización. El efecto inhibitorio se manifestó como una inhibición de la proliferación –con disminución en el número de células en mitosis y de células positivas para el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)- y como un aumento en el número de células en apoptosis. Asimismo, se observaron alteraciones en la cinética del ciclo celular, con un aumento de la fase S y disminución de las fases (G_0 - G_1) y (G_2 -M).

SUMMARY

Antitumor concomitant resistance is the phenomenon according to which a tumor-bearing host inhibits the development of secondary tumor implants carried out in a different site. This phenomenon was studied in euthymic and athymic mice, using nine murine tumors with widely different immunogenicity. Two temporally separate peaks of concomitant resistance were detected during primary tumor development. The first one was exhibited only by small immunogenic tumors; it was tumor-specific, irreversible and mediated by classical immunological T cell dependent mechanisms. The second peak was shared by both immunogenic and non-immunogenic large tumors; it was non-specific, thymus-independent and partially reversible and correlated with the activity of an antitumor factor/s (molecular weight = 1000 D aprox.) present in the serum of tumor-bearing mice. This factor/s would exert direct and indirect inhibitory effects on secondary tumor growth, the former affecting tumor cells themselves and the latter limiting neovascularization. The inhibitory effect was associated with a decrease in the number of both cells in mitosis and cells expressing the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), with an increase in the number of apoptotic cells and alterations in cell cycle kinetics, such as an increase in the proportion of cells in S phase and a decrease in (G_0 - G_1) and (G_2 -M) phases.

INTRODUCCION

El concepto de neoplasia

Se denomina ***neoplasia*** al crecimiento proliferativo relativamente autónomo de un tejido (1,2). Esta definición engloba varios aspectos:

- a) *autonomía***: este término indica la no sujeción a los mecanismos de control que gobiernan la proliferación de las células normales
- b) *relatividad***: este término relativiza el concepto de autonomía, indicando que si bien las células neoplásicas no responden de la misma forma que las células normales a los mecanismos de control de la proliferación celular, no han perdido totalmente la dependencia respecto de ellos.
- c) *crecimiento proliferativo***: este concepto indica un aumento en el número de células ya sea por una mayor tasa de división como por una menor tasa de muerte celular con respecto a su contraparte normal. Si se toma a la célula neoplásica individualmente y se la compara con una célula normal cuando ésta se encuentra en etapa proliferativa, se observa que la primera puede tener un tiempo de duplicación menor, igual o mayor que la segunda. En cambio, si consideramos la vida total de un tejido normal y se promedian sus etapas proliferativas y no proliferativas, el grado de crecimiento de las neoplasias es mayor debido a que mientras los tejidos normales tienen su crecimiento limitado por la homeostasis del organismo, las neoplasias están menos limitadas y sus células continúan dividiéndose..
- d) *tejido***: indica que una neoplasia sólo puede ser definida en un organismo multicelular.

A pesar de que en sentido estricto los términos *tumor* y *neoplasia* no son equivalentes, ya que el primero es más general –abarcando también a las masas parasitarias, granulomas, abscesos crónicos, etc- , ambos se utilizan habitualmente como sinónimos y por lo tanto por razones de simplicidad, se denominarán indistintamente en esta Tesis.

Neoplasias benignas y malignas:

Las neoplasias ***benignas*** son aquellas que no invaden tejidos adyacentes ni se diseminan a otros sitios distantes sino que se restringen a su tejido de origen, permaneciendo encapsuladas y con alto grado de diferenciación. Generalmente este tipo de neoplasia se asocia con un buen pronóstico.

Se habla de una neoplasia ***maligna***, en cambio, cuando ésta es capaz de *invadir* los tejidos adyacentes o diseminar hacia tejidos distantes, dando lugar al establecimiento de metástasis. Generalmente las neoplasias malignas presentan un bajo grado de diferenciación y están asociadas con un mal pronóstico.

Son las neoplasias malignas las que reciben el nombre genérico de *cáncer*.

Clasificación de las neoplasias malignas

Las neoplasias malignas pueden clasificarse en base a un criterio histogenético y embriológico en:

- ***Carcinomas***: se originan a partir de estructuras derivadas del ectodermo o endodermo, como los epitelios que recubren la superficie del cuerpo y los que conforman las glándulas.
- ***Sarcomas***: son neoplasias malignas que surgen a partir de tejidos derivados del mesodermo, como tejido óseo, muscular, etc.
- ***Leucemias y linfomas***: se originan a partir de las células del tejido linfático.
- ***Teratoma***: se originan a partir de células germinales.

Metástasis

Se define como ***metástasis*** a los focos de crecimiento tumoral en sitios distantes del tumor primario, sin continuidad con el mismo.

Se describe al proceso que lleva a la formación de metástasis a partir de un tumor primario como ***cascada metastásica (3)***, la cual incluye una serie de pasos secuenciales, cada uno de los cuales involucra distintos mecanismos en los que interactúan el tumor y el huésped.

Estos pasos incluyen: la proliferación del tumor primario, la formación de neovasos, la invasión de tejidos adyacentes e invasión de los vasos sanguíneos y linfáticos (intravasación), seguidos de la circulación de las células tumorales solas o

formando émbolos, adherencia al endotelio vascular, retracción del endotelio, adhesión a la membrana basal, disolución de la misma y diapédesis de las células tumorales a través de ella llegando al establecimiento de colonias (metástasis) que generan sus propios vasos (angiogénesis) y proliferan. Todo este proceso tiene una eficiencia muy baja: sólo un 0.01% de las células tumorales circulantes logran formar metástasis.

Si bien la diseminación desde el tumor primario hasta el órgano blanco se hace frecuentemente a través de los sistemas circulatorio y linfático, existen otras vías de diseminación: a través de cavidades naturales (diseminación transcelómica), líquido cefalorraquídeo y serosas.

Interacciones tumor - huésped

El tumor no debe ser considerado como una entidad aislada sino como un componente más del organismo, en estrecha asociación con otros tejidos y órganos del huésped e inmerso en el mismo ambiente. El crecimiento tumoral es afectado por elementos del huésped y reciprocamente, el resto del organismo es alterado por la presencia de un tumor en crecimiento.

La intrincada red de interacciones entre el tumor y su huésped se manifiesta a través de la utilización de nutrientes, como así también de hormonas, factores de crecimiento y factores antiproliferativos producidos por otros tejidos y por el propio tumor y que afectan a ambos en forma bidireccional. Por otro lado, el tumor utiliza vasos sanguíneos preexistentes a partir de los cuales genera sus propios vasos (neovascularización) y también interactúa con la matriz extracelular, secretando enzimas degradativas que actúan sobre ella (4,5). Asimismo, puede existir una

interacción entre el tumor y el sistema inmune del huésped, que puede llevar a la citotoxicidad de las células tumorales y que también se manifiesta con la producción de factores por parte del tumor, que actúan sobre distintos efectores de la respuesta inmune (6-8). Por último, merece mencionarse que la respuesta inmune que puede generarse en respuesta al desarrollo tumoral no siempre tiene un efecto benéfico para el huésped sino que en algunos sistemas tendría un efecto estimulador del crecimiento tumoral (9,10).

El tumor está integrado al resto del organismo y justamente esto genera serios obstáculos a la hora de diseñar terapias que actúen específicamente sobre el tumor, sin dañar al resto del individuo.

Los tumores y el sistema inmune

La aplicación de la inmunología al problema del cáncer ha fascinado a muchos investigadores desde comienzos de siglo, luego de la observación de que un animal al que se le había extirpado el tumor o que había rechazado un tumor espontáneo, era capaz de inhibir el desarrollo de implantes tumorales posteriores.

Con el desarrollo de cepas endocriadas de ratones, se demostró - mediante experimentos de extirpación del tumor y posterior desafío con esas mismas células tumorales- que los ratones podían ser inmunizados en forma específica contra tumores singéneos inducidos por metilcolantreno (11-14). Otros procedimientos exitosos de inmunización fueron el pretratamiento con dosis subletales de tumor o con células tumorales muertas por radiación X (15). Estas observaciones se extendieron luego a otros tumores de origen químico, físico y viral (16-19) y mediante la utilización de diversas técnicas *in vivo* e *in vitro* se llegó a establecer que la respuesta inmune frente a

muchos tumores experimentales (especialmente aquellos tumores inducidos por virus o químicamente) estaba mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos y, en menor medida, por macrófagos, anticuerpos, células NK (natural Killer), etc (20-24)

Todo esto llevó a la convicción de que todos los tumores –independientemente de su etiología- debían portar antígenos diferentes de los del huésped, que los harían potencialmente reconocibles –y eventualmente, blanco de su acción citotóxica- por el sistema inmune.

A fines de la década del '60 Burnet (25) propuso la *Teoría de la vigilancia inmunológica*. Según esta teoría, las células tumorales con antígenos “tumor-específicos” aparecen continuamente en el organismo pero su crecimiento está impedido por el sistema inmune del individuo; mediante la actividad de los linfocitos T citotóxicos, que “patrullan” el organismo y destruyen las células neoplásicas incipientes. De acuerdo con esta teoría, la aparición de tumores era explicada mediante “mecanismos de escape” de esa inmunovigilancia, como por ejemplo: expresión deficiente de los antígenos tumorales o de las moléculas del MHC clase I, enmascaramiento de antígenos, desfasaje entre la respuesta inmune y el desarrollo del tumor (“sneaking through”), supresión inmunológica, etc (6-8,26).

Sin embargo, a mediados de los '70 esta teoría perdió mucho de su credibilidad al demostrarse en primer lugar, que ratones *nude* (genéticamente timoprivos) no presentaban mayor incidencia de tumores espontáneos que ratones normales y en segundo lugar, que los pacientes inmunosuprimidos no exhibían mayor número de tumores, excepto aquéllos del sistema linforeticular (27-29).

A fines de la década del '70 y principios de los '80, el otro pilar de la inmunología tumoral, a saber, el paradigma de que todos los tumores eran inmunogénicos, sufrió un serio descrédito al demostrarse en primer término que la gran

mayoría de los tumores espontáneos de ratón (30) y de rata (31) carecían de inmunogenicidad detectable y en segundo término, que los tratamientos de inmunoterapia aplicados contra tumores humanos y experimentales no ofrecían resultados alentadores (22,32).

Todos estos hechos hicieron que, como ocurre a menudo en muchos campos del conocimiento, el entusiasmo que se había generado por la posibilidad de controlar el cáncer a través del sistema inmune fuera seguido de un período de escepticismo.

No obstante, para evitar pasar de un dogmatismo donde se aceptaba que todos los tumores eran inmunogénicos y que la inmunoterapia era la llave para solucionar el problema del cáncer a otro donde nada de esto era verdadero, deben destacarse dos hechos. En primer lugar, la ausencia de inmunogenicidad del tumor no significa insensibilidad frente a un ataque del sistema inmune. En segundo término, el fracaso de la inmunoterapia contra tumores humanos no implica necesariamente la ausencia de antígenos tumorales, ya que aún tumores de ratón fuertemente inmunogénicos, una vez establecidos, no son sensibles a este tipo de terapia.

Actualmente se postula que los tumores varían en un amplio rango con respecto a su capacidad de inducir una respuesta inmune en el huésped, dependiendo del origen del tumor, tipo histológico, forma de inoculación (en el caso de modelos experimentales), etc.

Efecto de un tumor primario sobre las metástasis distantes

La acción de un tumor primario sobre sus metástasis fue sugerida por varios autores a partir de la observación de que la extirpación quirúrgica de un tumor puede ir acompañada por el crecimiento acelerado de las metástasis que hasta ese momento permanecían en estado dormido (33-39). A partir de estas observaciones, se ha sugerido la existencia de distintas etapas en el desarrollo de un tumor, según las cuales el equilibrio entre su capacidad de sembrar nuevas metástasis y de controlarlas se inclinaría hacia el mayor o menor desarrollo metastásico (38). En el mismo sentido, se ha observado que la inmunosupresión puede estimular el desarrollo metastásico y que la posterior extirpación del tumor lleva a un aumento adicional del crecimiento de las metástasis indicando que, además de los mecanismos inmunes convencionales, existen otros mecanismos dependientes de la presencia del tumor que ejercerían este control (38,39).

El modelo de Resistencia Concomitante Antitumoral

La resistencia concomitante antitumoral (RC) es el fenómeno según el cual un individuo portador de un tumor es capaz de restringir el desarrollo de un implante secundario de células del mismo tumor realizado en un sitio distante del primero. Este fenómeno fue descrito originalmente por Paul Ehrlich en 1906 (40) y en el año 1908 Bashford (41) acuñó el término "inmunidad concomitante" con el que se lo ha conocido habitualmente. Este nombre anticipa una explicación inmunológica, que como veremos, es válida para algunos modelos tumorales pero no para otros; por esta razón nuestro

grupo de trabajo propuso el nombre de "resistencia concomitante" (42) que describe el fenómeno sin anticipar ningún mecanismo particular.

Como se mencionó previamente, el tumor primario puede ejercer un control sobre sus propias metástasis y el modelo de la RC nos permite estudiar este fenómeno, teniendo en cuenta que las metástasis pueden considerarse como implantes secundarios naturales del tumor. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre la capacidad de un tumor de generar RC y su capacidad de generar metástasis (43).

El modelo de RC nos permite focalizar el estudio especialmente en los últimos pasos de la "cascada metastásica" o sea una vez establecida la metástasis, evento que en la clínica generalmente ya ha ocurrido en más del 50% de los casos en el momento de diagnosticar un tumor (4,33,44). Asimismo, el estudio de la RC encierra también un interés teórico ya que en este modelo el tumor secundario es inhibido mientras que, paradójicamente, el tumor primario continúa su crecimiento, en torno de lo cual se han postulado diversas hipótesis y modelos matemáticos (33,45,46).

Mecanismos de Resistencia Concomitante

1. Mecanismos inmunes

La resistencia concomitante es inducida tanto por tumores inmunogénicos como no inmunogénicos.

En el primer caso, se demostró que algunos tumores, especialmente aquéllos inducidos químicamente o por virus eran capaces de generar RC y respuesta inmune antitumoral (evidenciada por varios ensayos *in vivo* e *in vitro*). En estos sistemas, la RC caía o disminuía drásticamente al utilizar ratones inmunosuprimidos genéticamente (ratones *nude*) o por distintos tratamientos como timentomía, irradiación o depleción de médula ósea (20,22,37,47-52). Se postuló entonces que el tumor primario generaba una respuesta inmune que era tardía o insuficiente como para restringir su propio crecimiento pero que en cambio era capaz de inhibir el desarrollo de implantes secundarios distantes.

Sin embargo, existe otro grupo de tumores, que incluye tumores espontáneos como el carcinoma 3LL, el melanoma B16, el carcinoma M109 y el linfoma LB que no generan una respuesta inmune detectable mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* y a pesar de ello, son capaces de generar RC. Se ha demostrado que en estos sistemas, la RC permanece inalterada en ratones deprimidos en su función T (timentomizados o *nude*), inmunosuprimidos por irradiación, deprimidos en su función macrofágica y NK (ratones "beige") y deprimidos en su función macrofágica por tratamiento con sílica (42,53-55).

Estas observaciones abrieron un nuevo panorama en el cual se enmarcan las siguientes explicaciones "no inmunológicas":

2. Atrepsia

Esta hipótesis fue formulada a comienzos de siglo por Paul Ehrlich en 1906 (40) y poco más tarde por E. Tyzzer en 1913 (56). Postula que existe una competencia por los nutrientes esenciales entre el segundo implante tumoral y el tumor primario como resultado de la cual el tumor primario sustrae de la circulación los nutrientes que el tumor secundario necesita para crecer y en consecuencia, éste es inhibido. En este sentido se ha demostrado que un tumor en crecimiento establece un gradiente de glucosa y aminoácidos en su favor y esto podría favorecer el debilitamiento y desnutrición (caquexia) que se observa habitualmente en los individuos portadores de un tumor avanzado. Es decir, se considera que muchos de los tejidos de un organismo portador de tumor se ven afectados por éste, lo cual nos permitiría suponer que sería un ambiente menos favorable para la proliferación del segundo implante tumoral o de las metástasis (33,38). Sin embargo hasta el presente no se han llevado a cabo estudios sistemáticos con el fin de correlacionar estas deficiencias con el fenómeno de RC.

3. Inhibición de la angiogénesis

Numerosos datos experimentales han demostrado que los tumores sólidos dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos para crecer más allá de cierto volumen -unos pocos mm de diámetro- (4,57-59). Los vasos sanguíneos no actúan solamente como vías de transporte de nutrientes hacia el tumor; adicionalmente, las células endoteliales de estos vasos actúan como productoras *per se* de factores de crecimiento que favorecerán el crecimiento tumoral (57).

El fenotipo angiogénico depende del balance entre los factores estimulatorios e inhibitorios de la angiogénesis, liberados por el propio tumor o por otras células del huésped. Entre los factores estimulatorios de la angiogénesis, los cuales pueden ejercer su acción afectando la migración y/o la proliferación de las células endoteliales, merecen mencionarse el aFGF y bFGF (factores de crecimiento de fibroblastos), el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), la nicotidamida, la angiogenina, el TGF- α (factor de crecimiento transformante), el PlGF (factor de crecimiento placentario) y el EGF (factor de crecimiento epidérmico) (60,61). Los factores inhibitorios de la angiogénesis pueden actuar inhibiendo la producción de factores angiogénicos -IFN α (interferón alfa), TIMP 1 y 2 (inhibidores de metalo-proteasas), fumigalina, trombospondina y glucocorticoides- o inhibiendo la proliferación de las células endoteliales -nuevamente la trombospondina, el factor de crecimiento derivado del glioma (estos dos regulados por el p53), la endostatina y la angiostatina, descrita hace pocos años y que se destaca por su fuerte poder antiangiogénico, observado sobre varios carcinomas de ratón y humanos en ratones SCID (35,57,62-66).

Se ha postulado que la inhibición de la neovascularización podría ser un mecanismo de la RC. Según esta hipótesis, el tumor primario, que estimula la angiogénesis en su propio lecho vascular, es capaz de inhibir la angiogénesis en el lecho vascular de las metástasis o de implantes secundarios (35).

4. Factores solubles antimitóticos de acción antitumoral

La producción o inducción de factores antimitóticos por el tumor primario fue propuesta por varios autores (33,34,38). Se han aislado factores inhibidores específicos e inespecíficos a partir del tumor y de órganos de portadores de tumor, de fluido ascítico, de sobrenadantes de cultivo de células tumorales y de suero de ratones y de pacientes portadores de tumor (67-72). Sin embargo, no se han realizado estudios con el propósito de demostrar una asociación entre éstos con el fenómeno de RC.

Se ha postulado en forma teórica que el tumor primario (y algunos tejidos normales) podría generar factores estimulatorios de acción local, creando un microambiente facilitador del crecimiento tumoral cuya acción estaría contrarrestada por factores inhibitorios circulantes. Por consideraciones geométricas y de difusión, en el segundo implante tumoral la acción de los factores facilitadores locales sería débil debido a la fácil pérdida de los mismos, teniendo en cambio mayor influencia sobre un tumor de mayor tamaño, el cual sigue creciendo, a pesar de la existencia de los factores inhibidores circulantes que sí son capaces de inhibir el segundo implante (45). El hecho de que todos los experimentos tendientes a rodear o encapsular al tumor favorecen su crecimiento es tomado como evidencia de la existencia de factores facilitadores locales (45).

En nuestro laboratorio habíamos demostrado que la RC generada por tumores de inmunogenicidad no detectable estaba asociada a la existencia de factores solubles antiproliferativos presentes en el suero. La actividad inhibitoria se evidenciaba por la disminución de la incorporación *in vitro* de (³H)timidina a las células tumorales y no era atribuible a anticuerpos ni complemento sino a factores de bajo peso molecular dado

que era capaz de dializar a través de una membrana de 12 500 Daltons (D) de punto de corte (73).

EL CICLO CELULAR Y EL CANCER

El ciclo celular es el conjunto de eventos celulares esenciales para la reproducción celular. Se considera que está compuesto de cuatro fases: a) el “gap” anterior a la replicación del DNA o fase G_1 , b) la fase de síntesis de DNA o fase S, c) el “gap” luego de la replicación del DNA o fase G_2 y d) la mitosis o fase M, que culmina con la división celular (74-78). Las células pueden encontrarse en estado de “quiescencia” durante largos períodos de tiempo; en muchos sistemas se ha observado que las células en fase G_1 abandonan el ciclo celular y por eso este estadio fue denominado fase G_0 (79)

Estas etapas tienen un contenido de DNA característico, lo cual constituye una de las herramientas posibles para estudiar las distintas subpoblaciones celulares. En este sentido, las células en fases G_0 y G_1 presentan un contenido de DNA que aumenta progresivamente a medida que la célula atraviesa la fase S, hasta alcanzar a duplicar su valor una vez alcanzadas las etapas G_2 y M (80-82).

El pasaje de una fase del ciclo celular a la siguiente se encuentra regulado por una serie de “*checkpoints*” o puntos de control que aseguran el orden de los eventos, integrando los procesos de duplicación del DNA, reparación del mismo, mitosis, etc (75,76,79,82).

Los principales checkpoints se encuentran en la transición G_1 -S y en el pasaje G_2 -M. En el primero intervienen las familias de ciclinas D y E; en el segundo

intervienen las ciclinas A y B (75,77,78,82). Se ha postulado que algunos defectos en estos sistemas de control podrían ser responsables de la transformación neoplásica (74,83,84)

Las células normales se encuentran mayoritariamente en estado quiescente o no proliferativo. Las células tumorales se encuentran con mayor frecuencia que las normales, en estado proliferativo.

El patrón de distribución en las distintas fases del ciclo celular en un momento dado varía según el tipo de tumor y los estímulos positivos y negativos que recibe.

En este sentido, se ha demostrado que las células tumorales estando bajo efecto de distintas terapias antineoplásicas –quimioterapia, radiación, etc- sufren cambios en el patrón de distribución de sus células en las distintas fases del ciclo celular (85-93). Estos cambios serían consecuencia de los mecanismos particulares de acción de cada agente (daño en el DNA, inhibición de la duplicación del DNA, inhibición de eventos involucrados en la mitosis, etc).

Por otro lado, se ha estudiado el “estado de tumor dormido”, que se refiere a un estado en que las células tumorales permanecen por un dado período de tiempo, sin crecimiento aparente (65,66,94-97), postulándose en algunos modelos que uno de los mecanismos responsables del mantenimiento de esta latencia sería el arresto en la proliferación.

LA APOPTOSIS Y EL CANCER

La apoptosis es una forma de muerte celular en la cual la célula tiene una participación activa (98) y que se da en diversos procesos fisiológicos –en el desarrollo embrionario, en la eliminación de clones T autorreactivos, en la involución de la mama luego de la lactancia, etc- y patológicos (99).

La apoptosis se reconoce por una serie de características morfológicas y bioquímicas. Entre las primeras se destaca la condensación y marginalización de la cromatina, condensación del citoplasma, formación de cuerpos apoptóticos, etc, y entre las últimas merece mencionarse el clivaje de doble cadena de DNA en la región “linker”, la activación de ciertas enzimas, el aumento de los niveles de RNA mensajero de Beta-tubulina, etc (99).

Se ha demostrado la ocurrencia de apoptosis en muchos tumores sin estar bajo ningún tratamiento (apoptosis espontánea) (99). Por otro lado, muchos agentes antineoplásicos como la radiación ionizante (98-100), los agentes quimioterápicos (87,98,99,102-110) y la terapia hormonal (99,111) inducen un aumento en los niveles de apoptosis del tumor. Por último, se ha demostrado que la inhibición del desarrollo tumoral por efecto de factores antiangiogénicos como la angiostatina se ejercería a través de la inducción de altos niveles de apoptosis (63-66).

La regulación de la apoptosis involucraría proto-oncogenes que paradójicamente son responsables de la modulación de la proliferación (98,99,106,112-116). Se ha postulado que el proto-oncogen bcl-2, que ejercería un efecto inhibitorio de la apoptosis, estaría involucrado en la resistencia a drogas y se ha observado una alta susceptibilidad a sufrir apoptosis en células tumorales que sobreexpresan el proto-oncogen c-myc.

Por último, se ha demostrado en algunos sistemas, una tendencia a sufrir apoptosis mayor en algunas fases del ciclo celular que en otras (85-87,98,108,117).

El estudio de los eventos relacionados con el ciclo celular y la apoptosis podría llevar a un mejor entendimiento del fenómeno de RC y eventualmente podría ser una herramienta en la posible aplicación terapéutica de este modelo.

OBJETIVO

La resistencia concomitante, esto es, la capacidad de un individuo portador de un tumor primario, de restringir el crecimiento de implantes secundarios del mismo tumor, puede ser generada tanto por tumores inmunogénicos como por tumores no inmunogénicos. Sin embargo, los mecanismos que se habían propuesto para uno y otro grupo de tumores eran muy diferentes.

El objetivo de mi trabajo de Tesis es determinar si existe un componente universal de la resistencia concomitante inducida por todos los tumores, independientemente de su inmunogenicidad. Para ello, se plantearon varios objetivos particulares:

- 1) *El primer objetivo es determinar si en el caso de los tumores inmunogénicos se genera algún mecanismo de resistencia concomitante análogo al propuesto para los tumores no inmunogénicos, en cuyo caso se agregaría al componente inmunológico clásico. Para esto se estudiará comparativamente, la resistencia concomitante inducida por tumores de distintos grados de inmunogenicidad.*
- 2) *En caso de existir un componente común a todos ellos, el segundo objetivo es describir cuáles son las alteraciones a nivel de la progresión en el ciclo celular que se producen en las células tumorales, determinando si se produce muerte celular por apoptosis y/o detenimiento de las células en su proliferación.*
- 3) *El último objetivo es determinar cuáles son los mecanismos efectores de la resistencia concomitante o sea, cuales son las causas (factores inmunológicos, inhibición de la neovascularización, producción de factores solubles antitumorales, etc) responsables de la inhibición del tumor secundario.*

Teniendo en cuenta que la resistencia concomitante es un modelo útil para estudiar la relación entre un tumor primario y sus metástasis ya que éstas pueden ser consideradas como implantes secundarios naturales del tumor, la comprensión de este mecanismo podría ayudar a revelar la existencia de factores antimetastásicos que podrían ser útiles para mejorar la terapia antitumoral en el futuro.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratones BALB/c de ambos sexos de 2 a 4 meses de edad, criados en nuestro bioterio y alimentados con pellets Nutric (Córdoba) y agua ad libitum.

Se usaron ratones *nude* (genéticamente atímicos) de ambos sexos de 2 a 4 meses de edad, proveídos por la Comisión Nacional de Energía Atómica.

TUMORES

MC-B: Fibrosarcoma inducido en un macho BALB/c de 4 meses de edad, 2.5 meses después de haber sido inoculado s.c. con cristales de metilcolantreno. Fue usado entre los pasajes 6 y 23.

MC-C: Fibrosarcoma inducido en un macho BALB/c de 5 meses de edad, 3 meses después de la implantación s.c. de un pellet de metilcolantreno. Fue usado entre los pasajes 5 y 20.

MC-D: Fibrosarcoma inducido en un macho BALB/c de 6 meses de edad, 4 meses después de la implantación de un pellet de metilcolantreno. Fue usado entre los pasajes 6 y 17.

M3: Adenocarcinoma de mama aparecido espontaneamente en una hembra BALB/c, cedido amablemente por el Dr L. Colombo del Instituto de Oncología Angel Roffo, Buenos Aires. Fue usado entre los pasajes 61 y 71.

MNU-2.1: Adenocarcinoma de mama inducido por N-methyl-N-nitrosourea (MNU). Apareció en una hembra BALB/c que recibió mensualmente una inoculación i.p. de 0.1 ml de MNU (5 mg/100g de peso corporal) repetida durante tres meses (118). El tumor surgió 5 meses después de la primera inoculación y fue mantenido por pasajes s.c. en hembras singeneicas y usado entre los pasajes 2 a 10.

MNUMPA-1.1: Adenocarcinoma de mama inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA) y MNU en una hembra BALB/c que recibió 40 mg de MPA (depot) y 1 semana después, 0.1 ml de MNU (solución) (5mg/100g de peso corporal), repetido 2 veces por mes. Los niveles de MPA se mantuvieron por inoculación de MPA cada tres meses (118). El tumor apareció 5 meses después de la primera inoculación; fue mantenido por pasajes s.c. singeneicos y usado entre los pasajes 2 y 12.

C7HI: Adenocarcinoma de mama altamente metastático originado en una hembra BALB/c tratada con 40 mg de MPA cada 3 meses durante un año y mantenido por pasajes singeneicos. Este tumor es hormono-independiente ya que en los sucesivos pasajes fue capaz de crecer en ausencia de MPA (119). Fue usado entre los pasajes 18 y 42.

L15: Leucemia linfoide de origen AKR (H-2^K) mantenida por pasajes s.c. singeneicos de los cuales se usaron los pasajes 54 a 143. En este trabajo, el L15 fue estudiado en un sistema alogeneico creciendo en ratones BALB/c (H-2^D), pretratados por vía i.p. con extracto acelular (e.a.) de L15, 10 a 16 días antes de la inoculación s.c. del tumor L15. El contenido total de proteína del e.a. fue de 700-900 µg estimado por el método de Lowry. La descripción detallada de la preparación del e.a. de L15 y la base racional de este tratamiento puede hallarse en: (120,121).

LB: Leucemia linfoide T aparecida espontáneamente en un macho BALB/c de 6 meses de edad y mantenida por pasajes s.c. singeneicos de los cuales se usaron los pasajes 69 a 170 (42,122).

CALCULO DE LA "DOSIS TUMORAL $_{50}$ " (DT_{50})

Se define como "dosis tumoral $_{50}$ " (DT_{50}) al número de células tumorales capaz de crecer y matar al 50% de los animales inoculados. En los experimentos se utilizaron dosis entre 10^3 y 2.5×10^7 células tumorales.

ENSAYOS DE INMUNIZACION (11-15)

Implantación y extirpación tumoral: Los tumores s.c. fueron extraídos quirúrgicamente cuando su volumen era de 400-600 mm³; 2 semanas después, se hizo un inóculo tumoral en el flanco opuesto de los ratones operados en los que el tumor no había recidivado.

Dosis subletales: Los ratones que habían sobrevivido a un primer implante tumoral fueron reinoculados con varias dosis del mismo tumor.

Células irradiadas: Las suspensiones celulares fueron irradiadas con 90 Gy en cámara plástica de irradiación; los rayos X fueron generados en un aparato Philips 250/15 Radiotherapy a 220 kv, 14 mA, y filtrados con 1 mm de Al. La tasa fue de 3.15 Gy/min a una distancia de 29 cm. Los animales fueron pretratados con 2 dosis s.c. de $2-4 \times 10^6$ células tumorales irradiadas, 7 y 14 días antes del desafío tumoral.

En todos los casos se evalúa la DT_{50} antes y después de la inmunización.

ENSAYO DE RESISTENCIA CONCOMITANTE

Se realizó un implante tumoral s.c. en el flanco derecho de los ratones, seguido, a diferentes intervalos, por un segundo implante s.c. del mismo tumor en el flanco izquierdo. El grupo control sólo recibió el inóculo tumoral en el flanco izquierdo. El segundo implante se llevó a cabo con distintas dosis de células tumorales (entre 10^3 y 2.5×10^7) de modo de poder determinar la DT_{50} del tumor secundario. Se define el título de resistencia concomitante como el cociente entre la DT_{50} del segundo implante tumoral en los ratones portadores de un tumor primario y la DT_{50} de los ratones del grupo control.

El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula de Attia y Weiss (123): $\text{volumen} = 0.4 \times (a \times b^2)$, siendo a y b los diámetros mayor y menor respectivamente.



implante tumoral control

GRUPO CONTROL



implante tumoral secundario

GRUPO EXPERIMENTAL
(PORTADOR DE UN TUMOR PRIMARIO)

TECNICA DE UNION DE DOS RATONES EN PARABIOSIS

Dos ratones BALB/c de 2-4 meses de edad (20-25g de peso) se anestesiaron con Embutal y se les realizó una incisión longitudinal de la piel –desde la región axilar hasta la inguinal- en el flanco derecho e izquierdo respectivamente. Una vez abierto este plano, se practicó una incisión similar en la membrana peritoneal. Luego se procedió a la sutura de los bordes de ambas membranas peritoneales, seguido de la sutura por afrontamiento, del borde de la piel de ambos ratones. Mediante la inyección endovenosa de un colorante vital en uno de los ratones pudimos comprobar que a los 7 días ya estaba establecida la circulación cruzada. Las parabiosis fueron realizadas entre ratones de la misma edad, sexo y peso.

EXAMEN HISTOLOGICO

Los cortes de piel incluyendo el implante tumoral secundario fueron fijados en formol 10%, deshidratados con etanol en grados crecientes y tratados con xilol, incubados en un baño de parafina a 58°C que se dejó solidificar para realizar más tarde cortes semiseriados de 4 µm de espesor, a los cuales se les realizó el procedimiento inverso al anterior. Los cortes obtenidos fueron teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) o fueron utilizados para su marcación mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Recuento de células en mitosis y en apoptosis por criterios morfológicos.

Se utilizaron cortes de piel del sitio del segundo implante tumoral teñidos con H&E. En el recuento mitótico se tomaron en cuenta principalmente las metafases, anafases y telofases. En el recuento de células en apoptosis realizado en base a la

morfología se tomaron en cuenta características como condensación de la cromatina, marginalización de la misma, formación de cuerpos apoptóticos y condensación del citoplasma (99).

Técnicas inmunohistoquímicas:

a) Detección de Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA): Los cortes de tumor procesados como se indicó más arriba fueron incubados con anticuerpos monoclonales anti PCNA (clon PC10, Bio Genex, CA). Se incubó con un segundo anticuerpo (anti inmunoglobulina de ratón) conjugado a biotina. Se detectó con el sistema estreptavidina-peroxidasa y se utilizó aminobenzidina como cromógeno. Se consideraron como positivos aquellos núcleos con marcación intensa y granular. La expresión del PCNA ha sido ampliamente utilizada como marcador de células en activa proliferación, siendo baja su expresión en células no proliferantes (88,124-127).

b) Detección de apoptosis: Se utilizó el ensayo *in situ* de la enzima "deoxinucleotidil transferasa terminal" (TdT), que se basa en la adición de nucleótidos tri-fosfato (dUTP unido a digoxigenina) en forma independiente de templado, al extremo 3'-OH de una cadena de DNA por acción de la enzima TdT. Como sistema de revelado se utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a una enzima "reporter" (peroxidasa) que transforma el sustrato diaminobenzidina en un producto coloreado. Mediante este procedimiento se detecta la existencia de fragmentación en el DNA, la cual genera la aparición de extremos 3'-OH libres (128).

Los cortes histológicos fueron realizados cuando el tumor secundario llevaba siete días de evolución, momento en el cual se comienzan a detectar las diferencias entre los grupos experimental y control.

MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY), con Penicilina G (10 µg/ml), Estreptomicina (25 µg/ml) y Amphotericina B (25 µg/ml).

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS Y COMPLEMENTO IN VITRO

Se utilizó el método de Rao y col. (121). El título de anticuerpos citotóxicos contra las células tumorales marcadas con ⁵¹Cr (Dupont) se define como la recíproca de la dilución de suero que produce un 50% de lisis específica y fue expresado en "unidades citotóxicas 50" por ml (UC₅₀/ml). La radioactividad fue medida en un contador Gamma (Beckman). El porcentaje de lisis específica fue calculado como: $[(\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontánea}) / (\text{cpm máxima} - \text{cpm espontánea})] \times 100$. Se define como lisis espontánea a la obtenida con medio de cultivo y como lisis máxima a la obtenida con Tritón X-100.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS IN VITRO

Se utilizó una modificación del método de Brunner (129): 0.1 ml de células tumorales marcadas con ⁵¹Cr fueron incubadas con un volumen igual de diferentes suspensiones de esplenocitos en una relación efector:target de 100:1, durante 4 hs a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Las células fueron luego centrifugadas y la radioactividad en el sobrenadante fue medida en un contador Gamma (Beckman). El porcentaje de lisis específica fue calculado como: $[(\text{cpm experimental} - \text{cpm normal}) / (\text{cpm máxima} - \text{cpm normal})] \times 100$.

Para medir actividad natural killer (NK) se utilizaron como blanco, células YAC-1 marcadas con ^{51}Cr y se utilizó como control positivo, esplenocitos provenientes de ratones BALB/c inoculados por vía i.p. con 0.1 ml de poli-Inosina-Citosina 1 mg/ml.

ENSAYO DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE ESPLENOCITOS

Se inocularon ratones normales por vía e.v. con 10^8 esplenocitos de ratones portadores de tumor o normales. Luego de 2 hs, se realizó un desafío s.c con células tumorales. Se evaluó el crecimiento de este implante tumoral y se tomó su inhibición como una medida de la protección transferida por los esplenocitos.

TEST DE WINN

Se midió la actividad antitumoral de los esplenocitos de ratones normales o portadores de tumor utilizando el test de Winn (21): se inocularon conjuntamente las células tumorales con los esplenocitos en una relación "efector:target" de 100:1 por vía subcutánea y se evaluó luego el crecimiento tumoral.

RECUESTO DE VASOS SANGUINEOS QUE DRENAN EL TUMOR

SECUNDARIO

Ratones BALB/c normales o portadores de un tumor primario MC-C >2000 mm^3 recibieron un inóculo de 10^6 células del mismo tumor en el flanco opuesto. Luego de 5, 10 o 18 días los ratones fueron sacrificados y la piel del sitio de este segundo implante fue removida y observada bajo lupa de disección (magnificación= x 10), llevando a cabo el recuento de los vasos sanguíneos que drenaban el tumor secundario.

Paralelamente se realizaron cortes de piel del sitio del segundo implante tumoral que fueron teñidos con Hematoxilina & Eosina y analizados microscópicamente.

SUERO

Los ratones fueron sangrados por el plexo retroorbital. Se dejó la sangre a temperatura ambiente por 1 h para su coagulación. Los sueros obtenidos por centrifugación fueron almacenados a -20°C hasta su uso. Para ser utilizados en los ensayos, los sueros fueron deplementados por calentamiento a 56°C durante 30 min.

DIALISIS

Se dializó un volumen de suero normal o tumoral utilizando membranas de 12500 D de punto de corte, contra un volumen 50 a 100 veces mayor de agua desionizada (miliQ) a 4°C durante 48 hs en agitador magnético. La fracción dializable fue liofilizada (a $10\ \mu\text{m}$ de Hg y -50°C) y resuspendida en su volumen original

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA SEPHADEX G-15

Se sembraron las muestras en columnas de Sephadex G-15 (SIGMA) cuyo rango de fraccionamiento es de 0 a 1500 D. Se utilizaron columnas de 66 cm de altura y 0.7 cm de diámetro. La elución se realizó con agua miliQ con un flujo de 0.44 ml / min. Como marcadores se usaron: Blue Dextrán (2000 kD), Pepstatina A (658.9 D), ATP (507.1 D) y ADP (427.2 D).

CELULAS EN CULTIVO

Células tumorales:

Las células tumorales MC-B, MC-C, MC-D, MNU-2.1, MNUMPA-1.1 y M3 fueron obtenidas a partir de tumores que crecían subcutáneamente en ratones BALB/c, mediante extracción de los tumores y disgregación mecánica utilizando malla metálica y fueron cultivadas en placas de 6 wells (10^6 células/ml; 3 ml/well) (CORNING) con RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de antibiótico.

Las células tumorales C7HI también fueron obtenidas a partir de tumores que crecían en forma subcutánea pero el procedimiento posterior fue diferente: los tumores se cortaron en fragmentos y se realizó la disgregación mediante digestión enzimática de los mismos con una solución de [tripsina 0.25 % (Gibco), colagenasa tipo II 0.25 % (SIGMA) y BSA (albúmina sérica bovina) (SIGMA) 0.5 %] con agitación magnética a 37°C durante 2 incubaciones de 20 min. El enriquecimiento en células epiteliales se hizo mediante decantación. Las células así obtenidas se cultivaron en placas de 6 wells (10^6 células /ml) (CORNING) con medio RPMI sin rojo fenol con 10% de SFB (previamente adsorbido con 5% de carbón activado durante 24 hs a 4°C con agitación magnética) y 1% de antibiótico.

Las células del tumor LB se extrajeron de tumores ascíticos, mediante lavado del peritoneo con medio RPMI y centrifugación de la suspensión obtenida y fueron sembradas directamente en placas de 96 wells (10^6 células/ ml) (CORNING) con RPMI con 1% de antibiótico.

Las células del tumor L15 se extrajeron de tumores subcutáneos, que fueron disgregados en forma mecánica utilizando malla metálica y fueron sembradas en placas de 96 wells (10^6 células/ml) con RPMI 1% de antibiótico .

Células normales:

Los linfocitos normales murinos fueron extraídos de ganglios linfáticos o timo de ratones BALB/c, disgregados en forma mecánica utilizando malla metálica y sembrados en placas de 96 wells con medio RPMI con 1% de antibiótico en presencia o ausencia de concanavalina A (Con A) 1 mg/ml.

Las células HUVEC (“human umbilical vein endothelial cells”) fueron provistas por la ABAC (Asociación Banco Argentino de Células) y fueron mantenidas en medio RPMI sin rojo fenol, con 20% de SFB (Suero Fetal Bovino) (Gibco), ECGS 50 ug/ml (suplemento de factor de crecimiento de células endoteliales) (SIGMA), piruvato de sodio 1mM, glutamina 2mM, heparina 45 µg/ml y antibiótico 1%. Las células fueron cultivadas en placas de 96 wells (1.5×10^4 células/well) durante 48 hs, hasta alcanzar el estado de subconfluencia.

Los fibroblastos murinos embrionarios fueron obtenidos a partir de embriones de 14 días de gestación, a los que se le separó la cabeza y el hígado. Los embriones fueron fragmentados y tratados con tripsina 0.25% con agitación magnética durante 15 min a 37°C. Luego de la adición de RPMI con 20% de SFB (para inactivar la tripsina) se centrifugó, se recuperó el pellet y se cultivó en placas de 6 wells (10^6 células/ml) con RPMI 10% de SFB.

ENSAYO DE PROLIFERACION IN VITRO MEDIDA POR INCORPORACION DE (³H)TIMIDINA

Las células que crecen adheridas al sustrato, ya sea tumorales -fibrosarcomas MC-B, MC-C y MC-D, carcinomas MNU-2.1, MNUMPA-1.1, M3 y C7HI- o normales -células endoteliales HUVEC y fibroblastos murinos embrionarios- se sembraron en 0.1 ml de medio RPMI (1.5×10^4 células / well) en una placa de microtitulación de 96 wells (CORNING, New York). Luego de 24hs (o 48 hs en el caso de las células HUVEC), se agregó 0.1 ml de varias diluciones (en un factor de 2) de suero de ratones normales o portadores de tumor.

Las células de crecimiento en suspensión tumorales (L15, LB) o normales (linfocitos murinos) fueron sembradas en 0,1 ml de medio RPMI (2×10^5 células / well) en la placa de 96 wells, simultáneamente con el suero de ratones normales o portadores de tumor.

Simultáneamente con el suero, todos los cultivos recibieron 20 μ l de (³H)timidina (Dupont, NEN Research Products, Boston, MA) a una concentración final de 1 μ Ci/ml y fueron incubados a 37°C durante 18 hs en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y cosechadas con un cosechador de células automático (Cambridge Technology Inc.) con (en el caso de células de crecimiento adherente) o sin (en el caso de células de crecimiento en suspensión) utilización de tripsina 0.25%. La radioactividad incorporada por las células fue medida en un contador de centelleo líquido Beta (Beckman). Los ensayos se realizaron por triplicado a sextuplicado. Se define el **título de actividad inhibitoria** como la recíproca de la dilución de suero que produce un 50% de inhibición de la incorporación de (³H)timidina con respecto a las células con medio de cultivo y fue expresado en "unidades inhibitorias del crecimiento 50" por ml (UI₅₀/ml).

ENSAYO DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS POR CITOFLUOROMETRIA DE FLUJO

Las células (10^6) fueron resuspendidas en una solución hipotónica conteniendo el fluorocromo (ioduro de propidio 50 $\mu\text{g/ml}$ (SIGMA) en una solución de citrato de sodio 0.1% + Tritón X100 0.1%). Los tubos fueron incubados a 4°C durante 2hs. Alternativamente, las células fueron fijadas en etanol 70% y almacenadas a 4°C, luego de lo cual fueron lavadas e incubadas con Ribonucleasa A (1 mg/ml) (SIGMA) y ioduro de propidio durante 30' a 37°C y luego a 4°C (130). El análisis citofluorométrico se llevó a cabo mediante un FACScan (Becton Dickinson) (láser Argón 488nm) utilizando software apropiado (CellQuest, Becton Dickinson). La apoptosis es reconocida por la aparición de un pico con contenido hipodiploide de DNA (sub- G_0) en el histograma de “contenido de DNA” (FL3-H) (650 LP) (130-132). Se observó una correlación entre la aparición de dicho pico y la aparición de una población de células o núcleos de menor tamaño y mayor complejidad (“granulosidad”) que las restantes en el diagrama de dispersión de la luz “Forward Scatter vs Side Scatter” (80, 131, 132). Se adquirieron 20.000 eventos, con un ratio de 200-400 células por segundo. Se utilizaron, como control negativo de la técnica, timocitos murinos normales recién extraídos y como control positivo, timocitos normales cultivados durante 24 hs con dexametasona.

El uso de ambos procedimientos -con o sin fijación previa- reveló resultados similares en los histogramas de “contenido de DNA” por lo tanto los resultados se analizaron en conjunto.

El tumor secundario fue extraído siete días después de haber sido inoculado, momento en el cual comienzan a detectarse diferencias de crecimiento entre el grupo experimental y el grupo control. Por otro lado, estos tumores eran suficientemente

pequeños de modo de disminuir una fuente de heterogeneidad intratumoral, como ha sido descrito (133).

TECNICA DE VISUALIZACION DE APOPTOSIS POR TINCION CON COLORANTES FLUORESCENTES.

Las células tumorales fueron teñidas con una mezcla fluorescente de naranja de acridina y bromuro de etidio y visualizadas bajo un microscopio de fluorescencia.

Puede hallarse información más detallada de esta metodología en: (134,135).

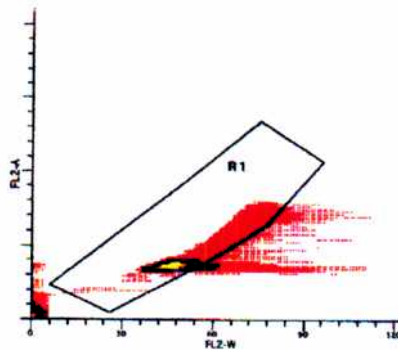
ANALISIS DE LA DISTRIBUCION EN EL CICLO CELULAR POR CITOFLUOROMETRIA DE FLUJO.

Las células (10^6) fueron resuspendidas en una solución hipotónica de yoduro de propidio (SIGMA) 50 $\mu\text{g/ml}$ en Citrato de Sodio 0.1% + Tritón X100 0.1%. En algunos casos las células fueron previamente fijadas en etanol 70% y tratadas con Ribonucleasa A (1mg/ml) (SIGMA Chemical Co) al incubarlas con el fluorocromo.

El análisis citofluorométrico se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) (láser Argón 488 nm) utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson). Los histogramas de DNA fueron generados a partir de las señales de DNA FL2 (585/42 LP) (width) (FL2-W) vs DNA (area) (FL2-A). En los histogramas se grafica el número de eventos en las ordenadas vs la fluorescencia relativa del yoduro de propidio (FL2-A) en las abcisas, indicativa del contenido de DNA. Se identifican las distintas fases o rangos G_0 - G_1 , S y G_2 -M sobre la base del contenido de DNA (80,81,86,131).

Los "dobletes" -grupos de dos núcleos o células que resultan de la agregación- fueron discriminados en base a su ubicación en el diagrama FL2-A *versus* FL2-W (81,129).

Se verificó una correlación entre el contenido de DNA (o posición en el ciclo celular estimada mediante la FL2-A) y la condensación cromatínica (estimada en base a la dispersión de la luz "Forward Scatter") (81).



Se adquirieron 20.000 eventos, con un "ratio" de 200-400 células por segundo. El uso de ambos procedimientos -con o sin fijación previa- reveló resultados similares en cuanto a los histogramas de "contenido de DNA" por lo tanto los resultados se analizan en conjunto.

OBTENCION DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS

TUMORALES

Se realizaron cultivos primarios de las células del tumor MC-C y de fibroblastos normales embrionarios. Las primeras fueron obtenidas de un tumor que crecía en forma subcutánea en ratones BALB/c; las segundas, a partir de fetos de 8 días de gestación. Las células (10^6 /ml) se sembraron en placas de 6 wells (CORNING) en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y se incubaron a 37°c en estufa gaseada

(5% CO₂). Se realizaron las curvas de crecimiento, obteniéndose en ambos casos un crecimiento exponencial entre los días 4 y 7 del cultivo.

Para la obtención de sobrenadantes (medios condicionados) se eliminó el SFB 10%, reemplazándolo por albúmina bovina sérica (BSA) 0.1% (SIGMA), el día 4 del cultivo, momento en que el cultivo se encontraba en subconfluencia. Los sobrenadantes fueron recolectados 24 hs después. Se normalizó realizando un dosaje de proteínas por el método de Lowry.

El efecto de estos sobrenadantes sobre la proliferación tumoral *in vitro* fue medido en microplaca de 96 wells (CORNING) mediante un ensayo de incorporación de (³H)timidna, descrito más arriba.

TECNICA DE DETECCION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Las células provenientes de un tumor LB (10⁶) creciendo en forma subcutánea fueron resuspendidas en buffer FLOW (RPMI 1640 sin Rojo Fenol con 3% SFB, 0.1% azida sódica y 10 mM HEPES) e incubadas con 0.1 ml de anticuerpos monoclonales contra el antígeno de membrana LFA-1 (Lymphocyte-Function-Associated Antigen) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CD11a-FITC) (Becton Dickinson) durante 30 min en oscuridad a 4°C, al cabo de lo cual fueron lavadas 2 veces, fijadas en etanol 70% y la intensidad de fluorescencia (FL1-H) fue analizada mediante citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, láser Argón 48 nm), con un filtro de 530/30 LP y software apropiado (CellQuest, Becton Dickinson) (136).

DOSAJE DE CORTICOSTERONA EN SUERO

Se llevó a cabo el dosaje de corticosterona en suero mediante radioinmunoensayo (RIA) utilizando un kit (^3H) disponible comercialmente (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA). El límite de detección fue de 30 ng/ml y los coeficientes de variación entre ensayos fueron de 7 a 10%. Este estudio se realizó tanto en ratones normales como adrenalectomizados. La adrenalectomía bilateral se practicó en ratones BALB/c de 2-3 meses de edad, a los que luego se proveyó de solución salina fisiológica y agua *ad libitum*

DOSAJE DE $\text{TNF}\alpha$ (TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALFA) EN SUERO

Se utilizó un ensayo de citotoxicidad sobre células de la línea L929, medido colorimétricamente (137). Brevemente, las células L929 en crecimiento exponencial fueron sembradas en microplaca ($3 \times 10^5/\text{ml}$) e incubadas a 37°C durante 18 hs. Se sembraron luego las muestras de suero en diluciones seriadas y $\text{TNF}\alpha$ recombinante (usado como control positivo, en distintas concentraciones entre 4 y 1000 pg/ml) e incubadas por 24 hs a 37°C en presencia de Actinomicina D ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$). Se realizaron controles de supervivencia con medio de cultivo. Se removieron las muestras (y las células despegadas) y se tiñeron las muestras con Violeta de Gensiana 0.05% en metanol 20%. Luego de 10 min, se lavó y las células teñidas fueron despegadas con ácido acético 33% y leve agitación. Las placas fueron leídas en espectrómetro a 550 nm (Organon Tecnika, Argentina). Se utilizó antisuero policlonal anti-($\text{TNF}\alpha$ r) (SIGMA) (30 min a 37°C), que no cruza con $\text{TNF}\beta$ ni otra citoquina conocida, utilizando 30 μl de una dilución 1/20, que es capaz de inhibir todas las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ probadas en la curva de calibración.

DOSAJE DE NITRITOS (NO_2^-) EN SUERO DESPROTEINIZADO DE RATONES PORTADORES DE TUMOR.

a) Desproteínización de los sueros.

Se realizó la desproteínización de los sueros de ratones normales y portadores de tumor mediante la utilización de rivanol. El método consiste en incubar 250 μl de suero con 750 μl de rivanol 0,4%, durante 15 min a temperatura ambiente, y luego centrifugar 15 min a 10000g.

b- Reducción de nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-).

Se utilizó la enzima nitrato reductasa (Gibco) para reducir los nitratos a nitritos.

c- Determinación de nitritos.

La concentración de nitritos en sueros fue utilizada como indicador del óxido nítrico (NO) en el suero de los ratones normales y portadores de tumor. Se utilizó la reacción de Griess con una curva standard de nitrito de sodio (138). Brevemente, se incubó 50 μl de suero desproteínizado con 100 μl de reactivo de Griess (mezcla de iguales volúmenes de solución 1% de sulfanilamida en HCl 1M, con 0,1% dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina en agua). La incubación se realizó durante 30 minutos en oscuridad, por triplicado en microplacas de 96 wells Posteriormente se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de microplaca (Dynatech, Marnes La-Coquette, Francia).

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizaron el test "t" de Student, el test de X^2 y el análisis de correlación de Spearman. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el P fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

Primera parte: Estudio comparativo de la resistencia concomitante inducida por nueve tumores murinos de distintos grados de inmunogenicidad.

Curvas de crecimiento de los nueve tumores murinos estudiados.

Los nueve tumores murinos estudiados en este trabajo se presentan en la **Tabla**

1. Se estudió la cinética de crecimiento de cada uno de ellos en ratones BALB/c (**Figura 1**).

Tabla I. Tumores murinos estudiados.

<i>Tumor</i>	<i>Tipo histológico</i>	<i>Origen</i>
MC-B	Fibrosarcoma	Inducido (MC) (BALB/c)
MC-C	“	”
MC-D	“	”
MNU-2.1	Carcinoma	Inducido (MNU) (BALB/c)
MNUMPA-1.1	“	Inducido (MNU + MPA) (BALB/c)
M3	“	Espontáneo (BALB/c)
C7HI	“	Inducido (MPA) (BALB/c)
L15	Linfoma	Espontáneo (AKR)
LB	“	Espontáneo (BALB/c)

(MC: metilcolantreno; MNU: metilnitrosourea; MPA: acetato de medroxiprogesterona)

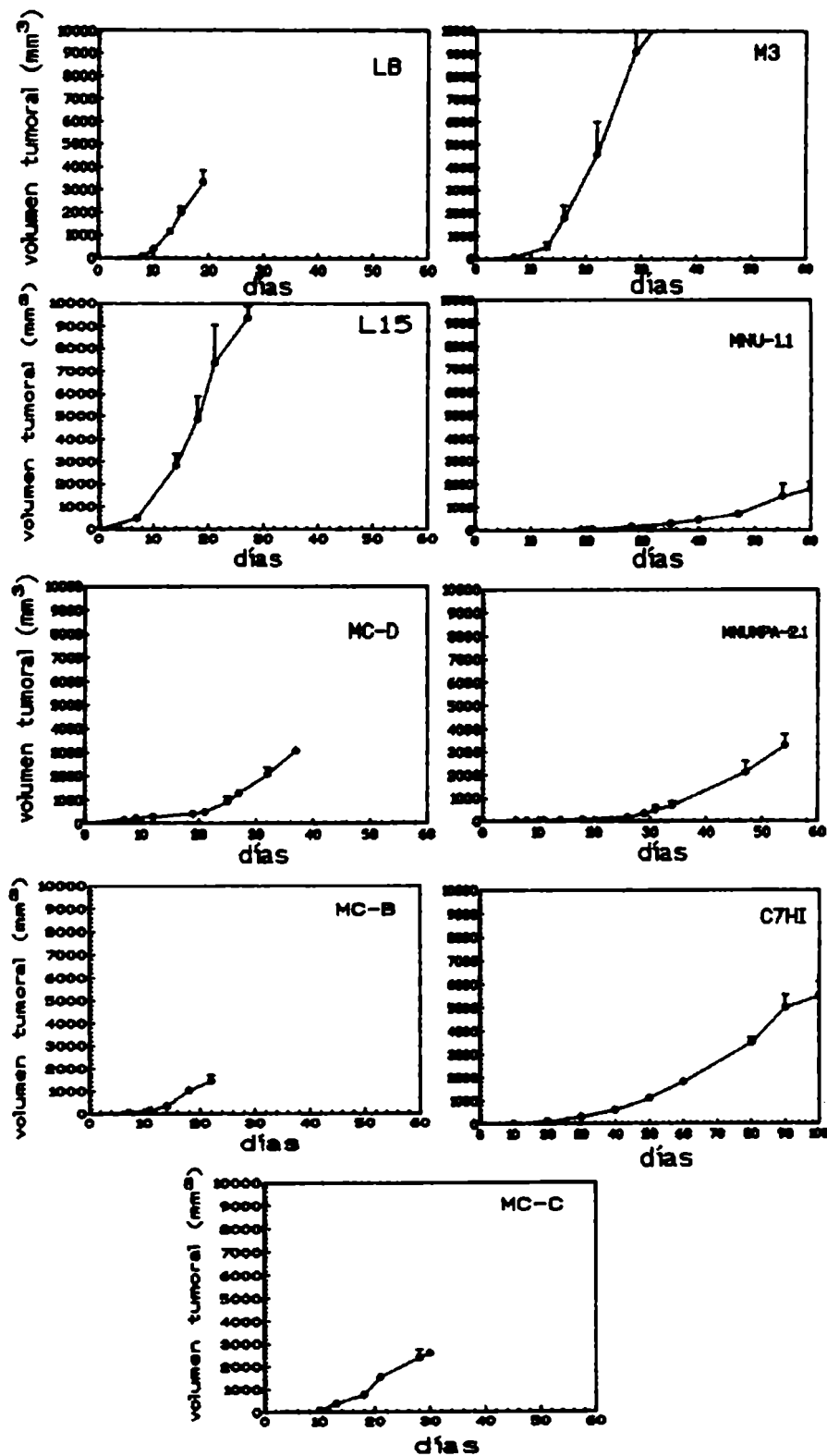


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de los nueve tumores murinos utilizados en este trabajo. Las células tumorales (5×10^5) fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones BALB/c.

Grado de inmunogenicidad

Se evaluó el grado de inmunogenicidad de estos tumores en ratones BALB/c.

Se utilizaron distintos ensayos de inmunización: implantación y extirpación tumoral, pretratamiento con células tumorales irradiadas y pretratamiento con dosis subletales. Dado que los resultados obtenidos por los distintos métodos fueron similares, se analizaron en conjunto. Se determinó la DT₅₀ (dosis tumoral₅₀), ésto es, la cantidad de células que es necesario inocular para que el tumor crezca en el 50% de los ratones inoculados, antes y después de la inmunización. Se calculó el grado de inmunogenicidad determinando cuántas veces había aumentado la DT₅₀ del tumor inoculado en una animal que había sido inmunizado vs la DT₅₀ del tumor inoculado en un ratón normal.

Los resultados se muestran en la **Tabla II**, donde se ordena a los tumores en grado decreciente de inmunogenicidad, desde el tumor más inmunogénico, el L15, al menos inmunogénico, el LB.

Tabla II. Immunogenicidad de nueve tumores murinos, expresada como el número de veces que aumenta la DT₅₀ del tumor en los ratones BALB/c inmunizados con respecto a los ratones BALB/c controles.

DT₅₀ (media ± ES)^a

<i>Tumores</i>	<i>Control</i>	<i>Immunizado</i>	<i>Cociente (immuniz/control)</i>
Leucemia L15	224 000 ± 55 000 (n ^b =52)	>25 000 000 ^c (n=47)	>111.61
Fibrosarcoma MC-D	54 500 ± 6 300 (n=45)	>2 690 000 ^c (n=14)	>49.36
Fibrosarcoma MC-C	50 900 ± 8 960 (n=48)	>2 240 000 ^c (n=27)	>44.01
Carcinoma de mama MNUPMPA-1.1	42 800 ± 11 600 (n=46)	409 000 ± 109 000 ^d (n=11)	9.56
Fibrosarcoma MC-B	42 825 ± 3 550 (n=69)	232 000 ± 169 000 ^d (n=36)	5.42
Carcinoma de mama MNU-2.1	45 600 ± 7 110 (n=42)	196 000 ± 47 700 ^d (n=11)	4.30
Carcinoma de mama M3	18 500 ± 4 900 (n=32)	43 300 ± 12 000 (n=27)	2.34
Carcinoma de mama C7HI	5 500 ± 800 (n=34)	6 167 ± 667 (n=22)	1.12
Leucemia LB	1 170 ± 110 (n=64)	1 110 ± 170 (n=75)	0.95

a: cantidad de células que es necesario inocular por vía s.c. para que el tumor crezca en el 50% de los ratones inoculados.

b: n=número de ratones

c: P<0.001; **d:** P<0.05 (test t-Student)

Resistencia concomitante generada por nueve tumores murinos en ratones BALB/c.

Se inocularon ratones BALB/c por vía s.c. en el flanco derecho con 5×10^5 células tumorales: **L15** (n=99), **MC-D** (n=106), **MC-C** (n=136), **MNUMPA-1.1** (n=61), **MC-B** (n=115), **MNU-2.1** (n=70), **M3** (n=80), **LB** (n=96) y **C7HI** (n=26). A partir de aquí, a distintos intervalos, se realizó un segundo inóculo con células del mismo tumor en el flanco contralateral. Este segundo inóculo se hizo con diferentes dosis de células (entre 10^3 y 2.5×10^7 células) para poder evaluar la intensidad de la RC mediante el cálculo de la "**Dosis Tumoral $_{50}$** " (**DT $_{50}$**) del tumor secundario, o sea la cantidad de células tumorales que es necesario inocular para que se desarrolle el tumor secundario en el 50% de los ratones desafiados. El grupo control recibió solamente este "segundo" inóculo tumoral en el flanco izquierdo y se utilizó un número de ratones (n) en un rango de 28 -para los tumores menos estudiados- hasta 204 -para los tumores que serán modelos a utilizar en esta tesis, el MC-C y el LB-.

Los resultados correspondientes a la totalidad de los tumores estudiados se muestran en la **Figura 2**.

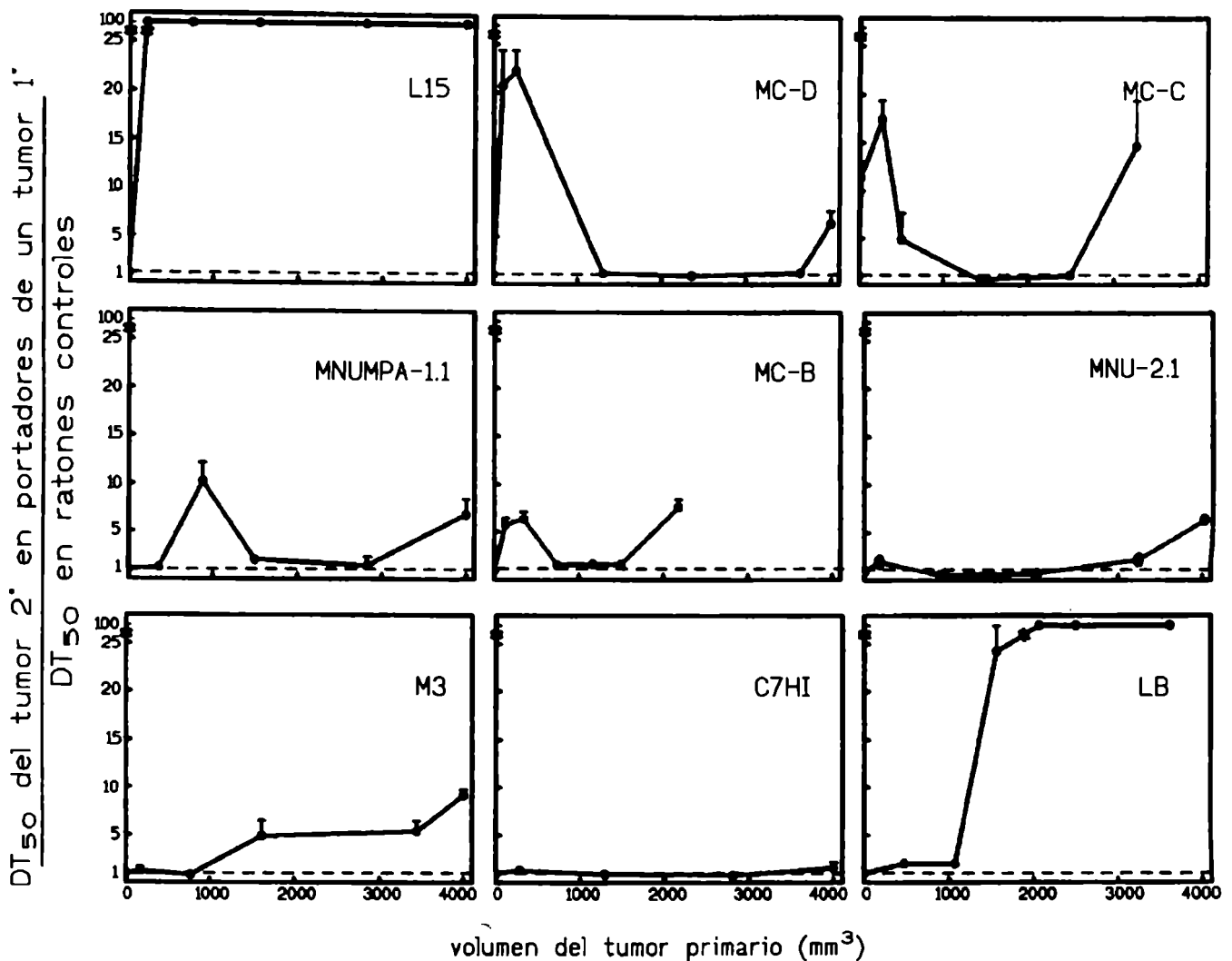


Figura 2. Resistencia concomitante (RC) generada por nueve tumores murinos en ratones BALB/c. La RC se expresa como el cociente entre la DT_{50} del tumor secundario en ratones portadores de un tumor primario dividido la DT_{50} en ratones controles (ordenadas). El título del grupo control es = 1 (- - -). En las abcisas se indica el volumen del tumor primario en el momento de realizar el segundo implante tumoral. Para el tumor LB, debido a su rápida cinética de crecimiento, los valores corresponden a la media entre el volumen del tumor primario al momento de realizar el segundo implante y el momento en que éste se hace palpable en los controles. Cada punto representa la media \pm ES de 2 a 6 experimentos. Por simplicidad los cocientes mayores o iguales a 100 se grafican como: 100. El primer pico de RC fue mayor que el control para: MC-D ($P < 0.01$), MC-C ($P < 0.05$), MNUMPA-1.1 ($P < 0.05$), MC-B ($P < 0.01$) y MNU-2.1 ($P < 0.05$). El segundo pico de RC fue mayor que el control para todos los tumores excepto el C7HI: MC-D ($P < 0.01$); MC-C, MNUMPA-1.1, MC-B, MNU-2.1 y M3 ($P < 0.05$) y LB ($P < 0.001$). El tumor L15 mostró RC a lo largo de todo su desarrollo. ($P < 0.001$) (test t- Student).

Como puede observarse en un análisis global, se detectaron dos picos máximos de resistencia concomitante que se manifestaron en distintas etapas del desarrollo del tumor primario:

A) La resistencia concomitante (RC) fue alta cuando el segundo inóculo se realizaba temprano en el crecimiento del tumor primario (cuando éste tenía un volumen menor de 500 mm^3). Comparando a los distintos tumores entre sí, se observó una correlación positiva entre la magnitud de este **primer pico de RC** y el grado de inmunogenicidad de los tumores estudiados, esto es, cuanto más inmunogénico era el tumor, mayor era la RC. Recíprocamente, cuando la inmunogenicidad era débil (tumor M3) o indetectable (LB y C7HI) el primer pico no se observaba (**Tabla III A**).

B) Con excepción del tumor L15 (para el cual la RC se mantuvo alta a lo largo de todo el desarrollo tumoral), en etapas intermedias del crecimiento del tumor primario ($500\text{-}1500 \text{ mm}^3$), no se detectó RC.

C) Llamativamente, se detectó nuevamente RC cuando el segundo desafío se realizaba en el momento en que el tumor primario era grande ($2500\text{-}4000 \text{ mm}^3$). La magnitud de este **segundo pico de RC**, a diferencia del primero, fue independiente de la inmunogenicidad del tumor (**Tabla III B**). Por ejemplo, se obtuvieron valores similares en el segundo pico de RC para los tumores L15 y LB, a pesar de las enormes diferencias en su capacidad de generar respuesta inmune. Por otro lado, el tumor C7HI fue el único incapaz de generar RC a lo largo de todo su desarrollo. Este tumor, similarmente a lo que ocurre con el tumor LB, no genera inmunogenicidad detectable y sin embargo ambos tumores poseen enormes diferencias en su capacidad de generar el segundo pico de RC.

Una observación interesante acerca del tumor C7HI es que, a diferencia de todos los demás tumores estudiados, es altamente metastásico, y es el único que no induce

RC, lo cual sugiere una correlación entre capacidad de generar RC e inhibición del desarrollo metastásico.

Tabla III A. Correlación entre el grado de inmunogenicidad del tumor y la intensidad del primer pico de resistencia concomitante.

<i>Tumor</i>	<i>Grado de inmunogenicidad (aumento de la DT₅₀ luego de la inmunización)</i>	<i>Intensidad del primer pico de RC (número de veces que aumenta la DT₅₀ del tumor secundario en portadores de un tumor primario pequeño con respecto al grupo control)</i>
L15	>111.61	>100
MC-D	>49.36	22.25
MC-C	>44.01	17.46
MNUMPA-1.1	9.56	10.00
MC-B	5.42	6.36
MNU-2.1	4.30	2.00
M3	2.34	2.50
C7HI	1.12	1.30
LB	0.95	2.02

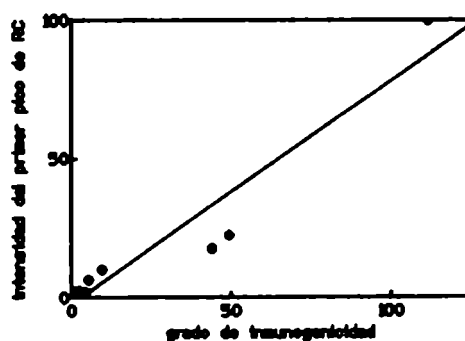


Figura 3. Correlación entre el grado de inmunogenicidad del tumor y la intensidad del primer pico de resistencia concomitante. Representación gráfica de los datos mostrados en la Tabla III A. Coeficiente de correlación (r): 0.9551; $P < 0.0001$

Tabla III B. Ausencia de correlación entre el grado de inmunogenicidad del tumor y la intensidad del segundo pico de resistencia concomitante.

<i>Tumor</i>	<i>Grado de inmunogenicidad (aumento en la DT₅₀ luego de la inmunización)</i>	<i>Intensidad del segundo pico de RC (aumento de la DT₅₀ del tumor secundario en presencia de un tumor primario grande con respecto al grupo control)</i>
L15	>111.61	>100
MC-D	>49.36	6.01
MC-C	>44.01	14.20
MNUMPA-1.1	9.56	6.81
MC-B	5.42	7.50
MNU-2.1	4.30	5.62
M3	2.34	8.20
C7HI	1.12	1.20
LB	0.95	>330.00

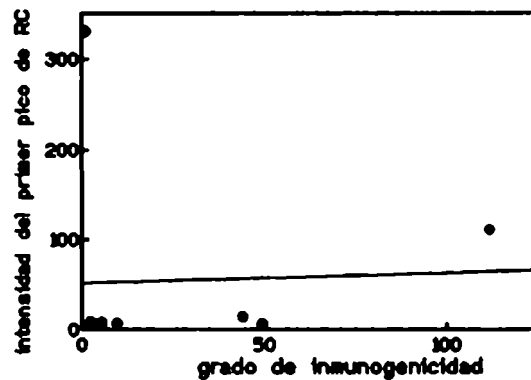


Figura 4. Ausencia de correlación entre el grado de inmunogenicidad del tumor y la intensidad del segundo pico de resistencia concomitante. Representación gráfica de los datos mostrados en la Tabla III B. Coeficiente de correlación de Spearman (r): 0.0112 (no significativo).

Rol del timo en el fenómeno de resistencia concomitante

Con el objeto de evaluar la participación del timo en el fenómeno de RC, se estudió la resistencia concomitante generada por los nueve tumores en ratones genéticamente atímicos (*nude*).

Como podemos observar en la **Figura 5**, para los 8 tumores inductores de RC (**L15 , MC-D, MC-C, MNUMPA-1.1, MC-B, MNU-2.1, M3 y LB**) (n=12-32 ratones por grupo) sólo se observó RC en ratones *nude* cuando el tumor primario era grande (>2000 mm³), correspondiente al **segundo pico de RC**.

Estos resultados nos permitieron concluir que:

1) El **primer pico de RC** (que se da en los tumores inmunogénicos) es dependiente del timo, ya que se manifiesta en ratones eutímicos pero no en ratones *nude*.

2) El **segundo pico de RC** -que no depende del grado de inmunogenicidad del tumor y se exhibió en todos los tumores estudiados, excepto el C7HI que no es inductor de RC- es independiente de la presencia del timo, dado que aparece tanto en ratones eutímicos como en ratones *nude*.

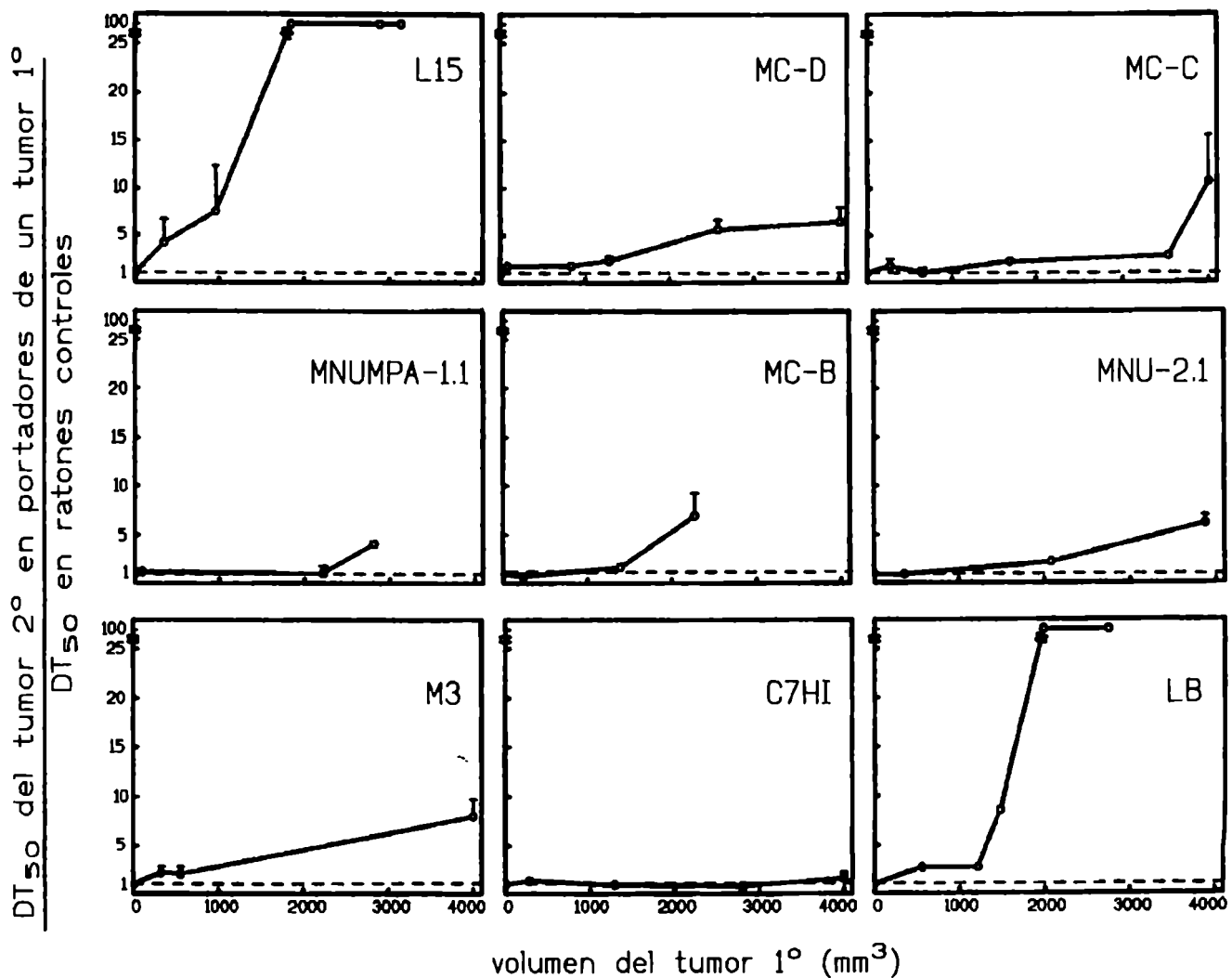


Figura 5. Resistencia concomitante (RC) generada por nueve tumores murinos en ratones *nude*. La RC se expresa como el cociente entre la DT_{50} del tumor secundario en ratones portadores de un tumor primario dividido la DT_{50} en ratones controles (ordenadas). En las abscisas se indica el volumen del tumor primario en el momento de realizar el segundo implante tumoral. Para el tumor LB, debido a su rápida cinética de crecimiento, los valores corresponden a la media entre el volumen del tumor primario al momento de realizar el segundo implante y el momento en que éste se hace palpable en los controles.

Cada punto representa la media de 2 a 4 experimentos. Por simplicidad los cocientes mayores o iguales a 100 se grafican como: 100. El "segundo pico de RC" fue mayor que el control para todos los tumores ($P < 0.05$, test t-Student) excepto el C7HI.

Estudio del grado de especificidad de la resistencia concomitante

Para estudiar la especificidad de este fenómeno, ratones BALB/c portadores del tumor MC-C, L15 (ambos fuertemente inmunogénicos), M3 (levemente inmunogénico) o LB (de inmunogenicidad no detectable) fueron inoculados en el flanco opuesto con células de un tumor distinto del primario (MC-B, LB o C7HI). Es importante aclarar que estos tumores no presentan inmunidad cruzada con los antes mencionados, evaluada por ensayos clásicos de implantación-extirpación.

Como se muestra en la **Tabla IV A**, los tumores MC-C y L15, en las primeras etapas de su desarrollo (primer pico de RC) fueron incapaces de inhibir un segundo implante tumoral realizado con células de otro tumor. Por el contrario, todos los tumores estudiados, una vez alcanzado cierto volumen (segundo pico de RC) (**Tabla IV B**) fueron capaces de inhibir implantes secundarios no relacionados.

Los resultados indican que el **primer pico de RC** (generado sólo por tumores inmunogénicos) es específico y por el contrario, el **segundo pico de RC** (común a tumores inmunogénicos y no inmunogénicos) tiene un componente inespecífico.

Tabla IV A. Especificidad del primer pico de resistencia concomitante.

Número de tomas del tumor secundario : total

<i>Tumor secundario</i> <i>Tumor primario</i>	<i>L15</i>	<i>MC-C</i>	<i>LB</i>	<i>MC-B</i>
<i>L15</i>	0:11*	—	9:10	—
<i>MC-C</i>	—	8:39*	12:14	6:6
<i>Control (sin tumor primario)</i>	15:24	124:168	17:18	10:10

Ratones portadores de un tumor primario fuertemente inmunogénico (L15 o MC-C) de pequeño volumen fueron desafiados en el flanco contralateral con 10^5 células L15, MC-C o MC-B o 5×10^4 células LB (*: $P < 0.005$; test X^2 comparando con al grupo control (sin tumor primario)).

Tabla IV B. Inespecificidad del segundo pico de resistencia concomitante.

Número de tomas del tumor secundario : total

<i>Tumor secundario</i> <i>Tumor primario</i>	<i>L15</i>	<i>MC-C</i>	<i>M3</i>	<i>LB</i>	<i>MC-B</i>	<i>C7HI</i>
<i>L15</i>	0:13***			0:6***		
<i>MC-C</i>		12:26***		7:15**	1:5**	
<i>M3</i>			8:16***	3:8*	2:6	
<i>LB</i>				0:18***		0:5*
<i>Sin tumor primario (control)</i>	15:24	124:168	29:30	65:79	125:136	5:5

Ratones portadores de un tumor primario de gran volumen fueron desafiados en el flanco contralateral con 10^5 células L15, MC-C, M3 y MC-B o 5×10^4 células LB. En el caso en que se utiliza el tumor C7HI (de crecimiento lento), éste se inocula 10 días antes que el tumor LB (de crecimiento rápido).

(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.005$, test X^2 con respecto al grupo control (sin tumor primario)).

Estudio de la capacidad del tumor secundario de reanudar su crecimiento al extirpar el tumor primario

Para estudiar si la inhibición del tumor secundario requería de la presencia continua del tumor primario, se extirpó el tumor primario MC-C a ratones que habían recibido un segundo implante tumoral cuando portaban un tumor primario de 200-500 mm³ o >2000 mm³ y que habían logrado rechazar el segundo implante. Luego de la extirpación, se observó que el segundo implante tumoral en ratones portadores de un tumor primario pequeño no fue capaz de retomar su crecimiento, mientras el tumor secundario inoculado en portadores de tumores grandes reanudó su crecimiento (**Tabla V**).

Estos resultados indican que el primer pico de RC no revierte al extirpar el tumor primario, mientras que el segundo pico de RC en cambio, es al menos en parte, reversible.

Tabla V. Estudio de la capacidad del tumor secundario de reanudar su crecimiento al extirpar el tumor primario.

<i>Grupos</i>	<i>Número de tomas tumorales / número de ratones inoculados</i>
Ratones portadores de un tumor MC-C 500 mm³	0:10
Ratones ex – portadores de un tumor MC-C 500 mm³	0:10
Ratones portadores de un tumor MC-C > 2000 mm³	0:6
Ratones ex – portadores de un tumor MC-C > 2000 mm³	6:6*
Ratones controles	12:12

Ratones BALB/c portadores de un tumor MC-C de 200-500 mm³ (n=10) o > 2000 mm³ (n=6) y ratones controles (n=12) recibieron un segundo implante tumoral con 5×10^5 células MC-C. Se midió la incidencia del tumor secundario y al cabo de 10 días se extirpó el tumor primario. Se realizó una simulación de esta operación en los ratones controles (SHAM). A partir de aquí se evaluó si el tumor secundario era capaz de retomar su crecimiento.

***: $P < 0.05$ (test X^2 , comparando el grupo al que se extirpó el tumor primario con el grupo portador de ese tumor)**

El conjunto de los resultados presentados en esta Primera Parte sugiere que a lo largo del desarrollo del tumor primario, se generan dos picos temporalmente separados de RC: El primer pico es exhibido sólo por los tumores inmunogénicos de pequeño volumen; en este punto la inhibición del tumor secundario es timo-dependiente, específica e irreversible. El segundo pico de RC es generado por tumores de gran volumen y es común a tumores inmunogénicos y no inmunogénicos, es timo-independiente, inespecífico y al menos en parte reversible.

Segunda parte: Estudio de las alteraciones que se producen en el tumor secundario**MC-C o LB inhibido por resistencia concomitante.****Examen histológico del tumor secundario MC-C y LB inhibido por RC.**

Tomando como modelos de estudio al tumor inmunogénico MC-C y al tumor de inmunogenicidad no detectable LB se llevó a cabo un examen microscópico del segundo implante tumoral inhibido por RC. En una primera fase se analizaron los siguientes parámetros: tamaño del implante tumoral secundario, aspecto de las células tumorales, grado de infiltración linfocitaria y grado de necrosis.

Para el caso del tumor MC-C se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se inocularon 18 ratones BALB/c con 5×10^5 células del tumor MC-C en el flanco derecho. A distintos tiempos a partir de aquí (12, 20 y 28 días, cuando el tumor tenía un volumen de $244.4 \pm 61.8 \text{ mm}^3$, $1418.6 \pm 68.6 \text{ mm}^3$ y $3797.8 \pm 487.3 \text{ mm}^3$ respectivamente; $n=6$ por grupo), se llevó a cabo un segundo inóculo igual al primero en el flanco izquierdo. El grupo control sólo recibió este segundo implante. Luego de 7 días (que es el momento en que empiezan a detectarse diferencias entre los grupos experimental y control) se realizaron los cortes de piel del sitio del segundo implante.

El examen histológico del segundo implante tumoral MC-C reveló un gran desarrollo del tumor MC-C en el grupo control (**Fotografía 1**), mientras que en los grupos experimentales, o sea en presencia de un tumor primario, se obtuvieron distintos resultados según el momento en que se había realizado el segundo inóculo:

A) En el grupo en que el desafío secundario se había realizado cuando el ratón portaba un tumor primario MC-C de 12 días de evolución (**primer pico de RC**) se

observó un implante tumoral secundario de muy pequeñas dimensiones. Este tumor presentó importantes cambios degenerativos caracterizados por una necrosis masiva (con pérdida de límites celulares y con aparición de depósitos de calcio) acompañada de infiltración linfocitaria localizada, siendo éstos, signos característicos de un rechazo inmunológico convencional, frecuentemente observados en las respuestas contra implantes alogeneicos (**Fotografía 2**).

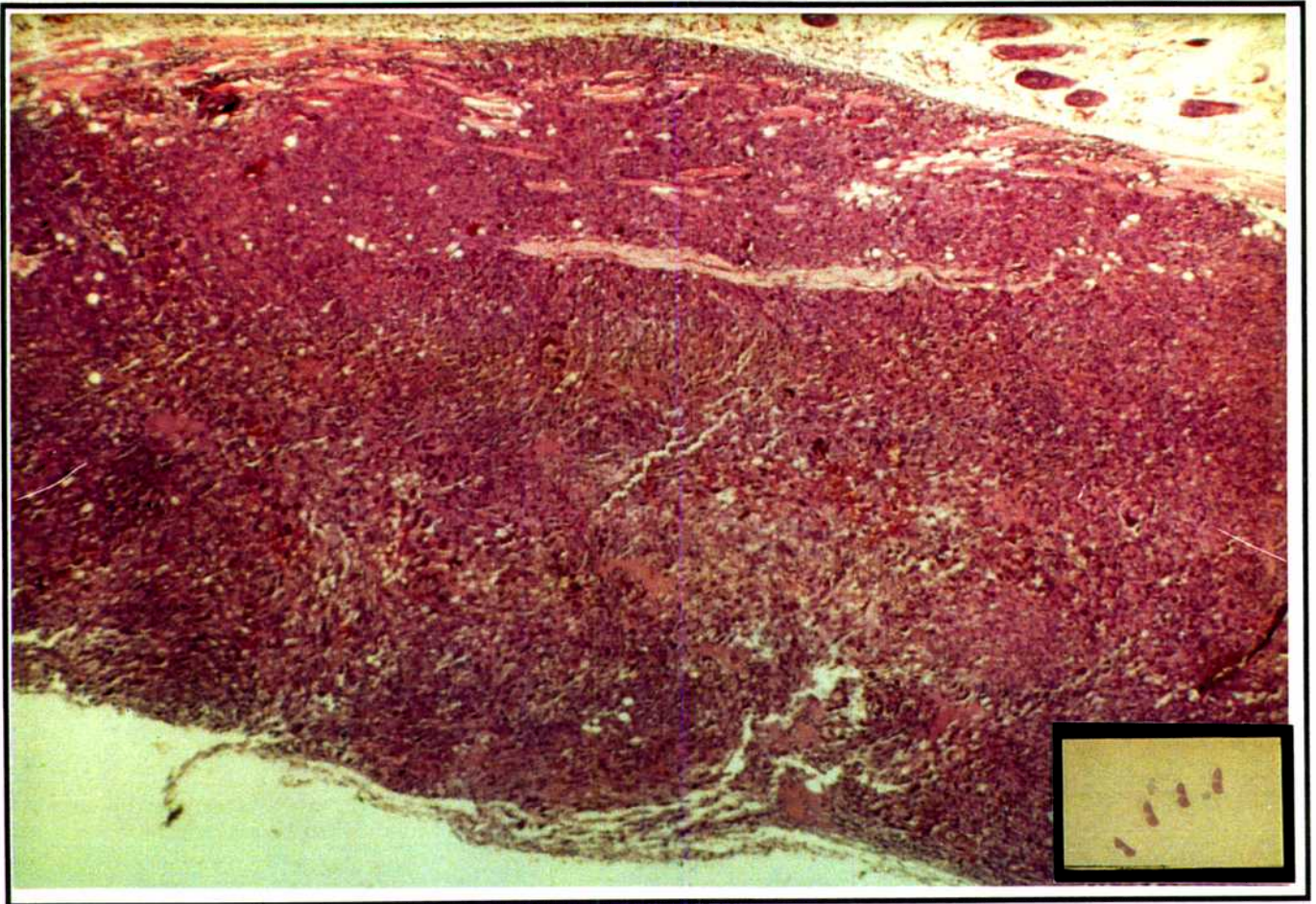
B) En el grupo que había recibido el segundo inóculo tumoral cuando portaba un tumor primario de 30 días (**segundo pico de RC**), el segundo implante tumoral fue inhibido. Sin embargo, a diferencia del primer pico de RC, no se observaron los signos descriptos para el grupo anterior: no hubo necrosis ni infiltración por células del huésped (**Fotografía 3**).

Cabe mencionar que en el grupo en que el tumor secundario se implantó cuando el tumor primario era de 20 días, y que no presentó inhibición de este tumor secundario (etapa en que, como se mostró anteriormente, la RC decae), el tumor secundario fue similar al del grupo control, en cuanto al tamaño del tumor y al aspecto de las células (**Fotografía 4**)

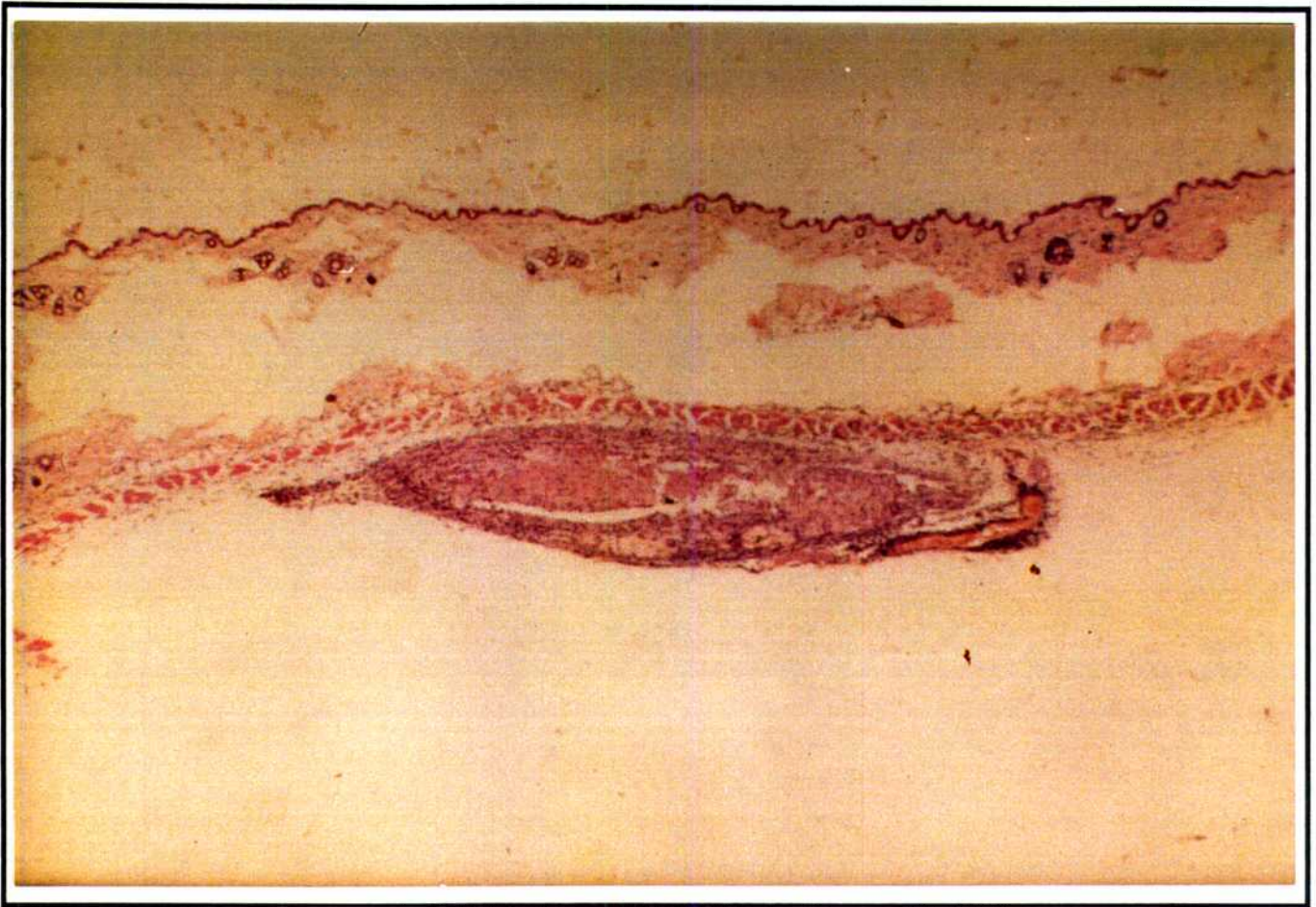
Como tumor no inmunogénico, se estudió al tumor LB. Este, como se mostró anteriormente, genera una fuerte RC cuando el tumor primario es grande (sólo se presenta el "segundo pico" de RC). A diferencia de lo observado con el grupo control, donde las células tumorales invaden la capa muscular y la dermis, el examen histológico del segundo implante del tumor LB (10^5 células, n=8 ratones) -en presencia de un tumor primario LB $>2000 \text{ mm}^3$ - se mantuvo delimitado y de pequeñas dimensiones, con células preservadas y sin signos de necrosis, todo lo cual es similar a lo descrito para el segundo pico de RC generada por el tumor MC-C (**Fotografía 5**).

En resumen, el examen histológico del segundo implante tumoral MC-C inhibido por RC mostró que el primer pico de RC fue acompañado de un importante infiltrado linfocitario localizado y una necrosis masiva, fenómenos que por el contrario estuvieron ausentes en el segundo pico de RC. Este segundo pico de RC presentó características similares a las observadas en el tumor secundario LB, de inmunogenicidad no detectable.

Dado que de los dos, el segundo pico de RC ha sido mucho menos estudiado y representa el componente de RC común a todos los tumores, independientemente de su inmunogenicidad, a partir de aquí, focalizaremos nuestro estudio sobre él.



Fotografía 1. Grupo control MC-C. Observación con bajo aumento (x 25) de un tumor MC-C de 7 días de evolución. Tinción: Hematoxilina & Eosina (H&E). Inset: visión macroscópica del preparado.



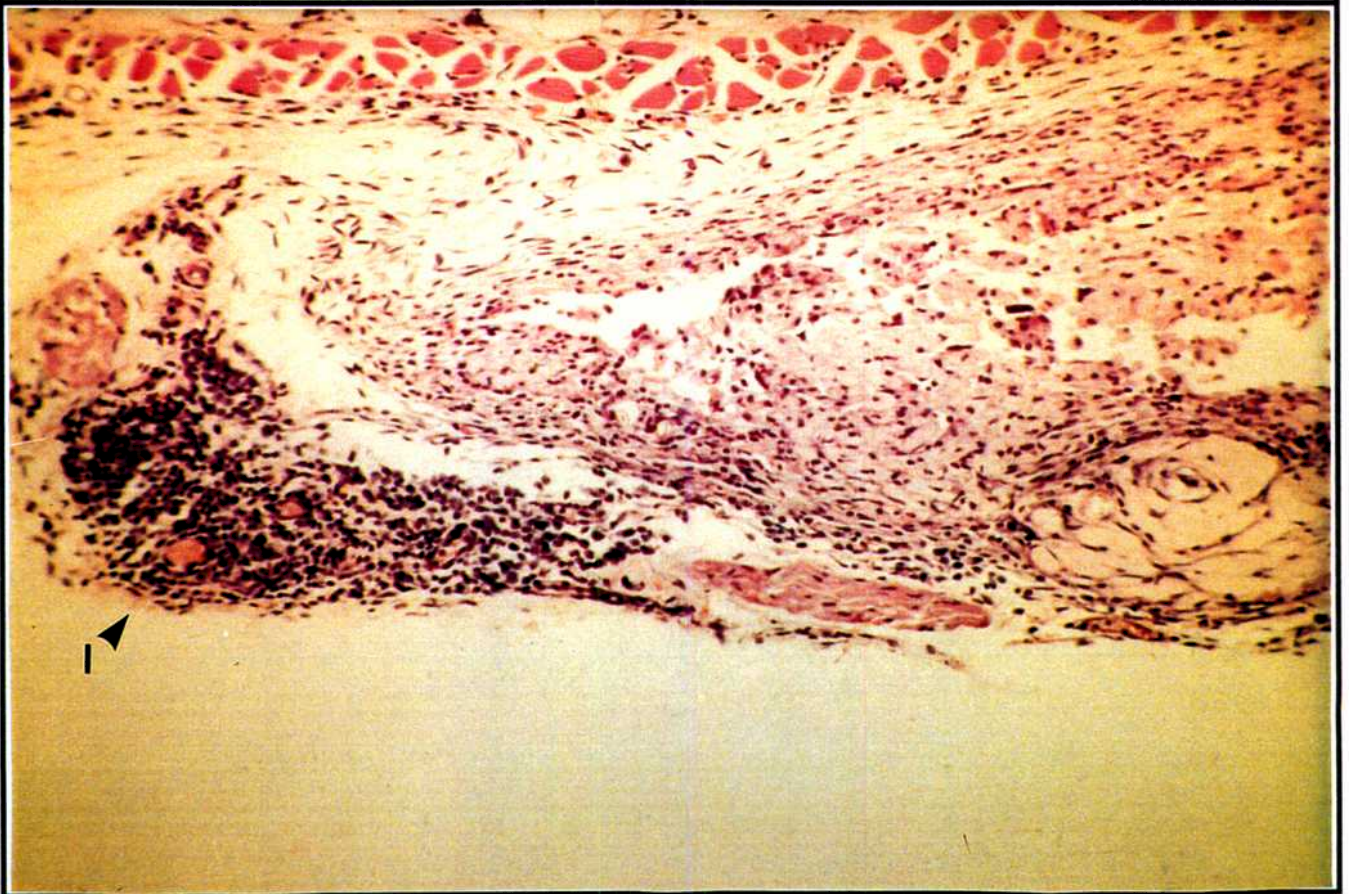
a

Fotografía 2. Resistencia concomitante inducida por un tumor primario MC-C de pequeño tamaño (Primer pico de RC). H&E. a) Observación con bajo aumento (x 25) de un tumor secundario MC-C de 7 días de evolución inoculado s.c. en el flanco izquierdo de un ratón BALB/c portador de un tumor primario MC-C de 200-400 mm³ en el flanco derecho. De arriba hacia abajo: epidermis, dermis, banda de fibras musculares, y debajo, el tumor. Nótese el alto grado de necrosis en el centro del tumor, con pérdida de los límites celulares y con menor tinción, y el importante infiltrado linfocitario.

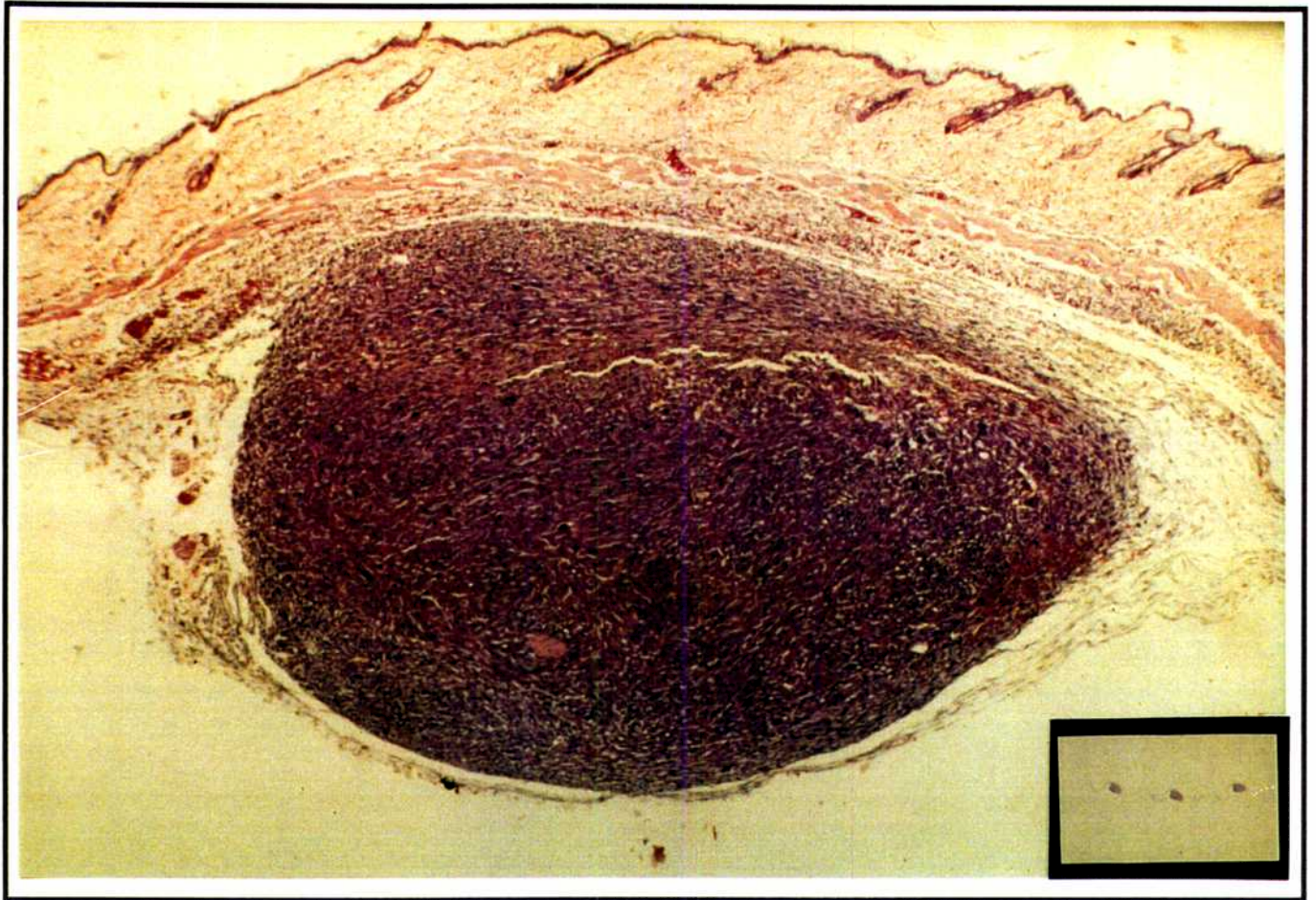
b



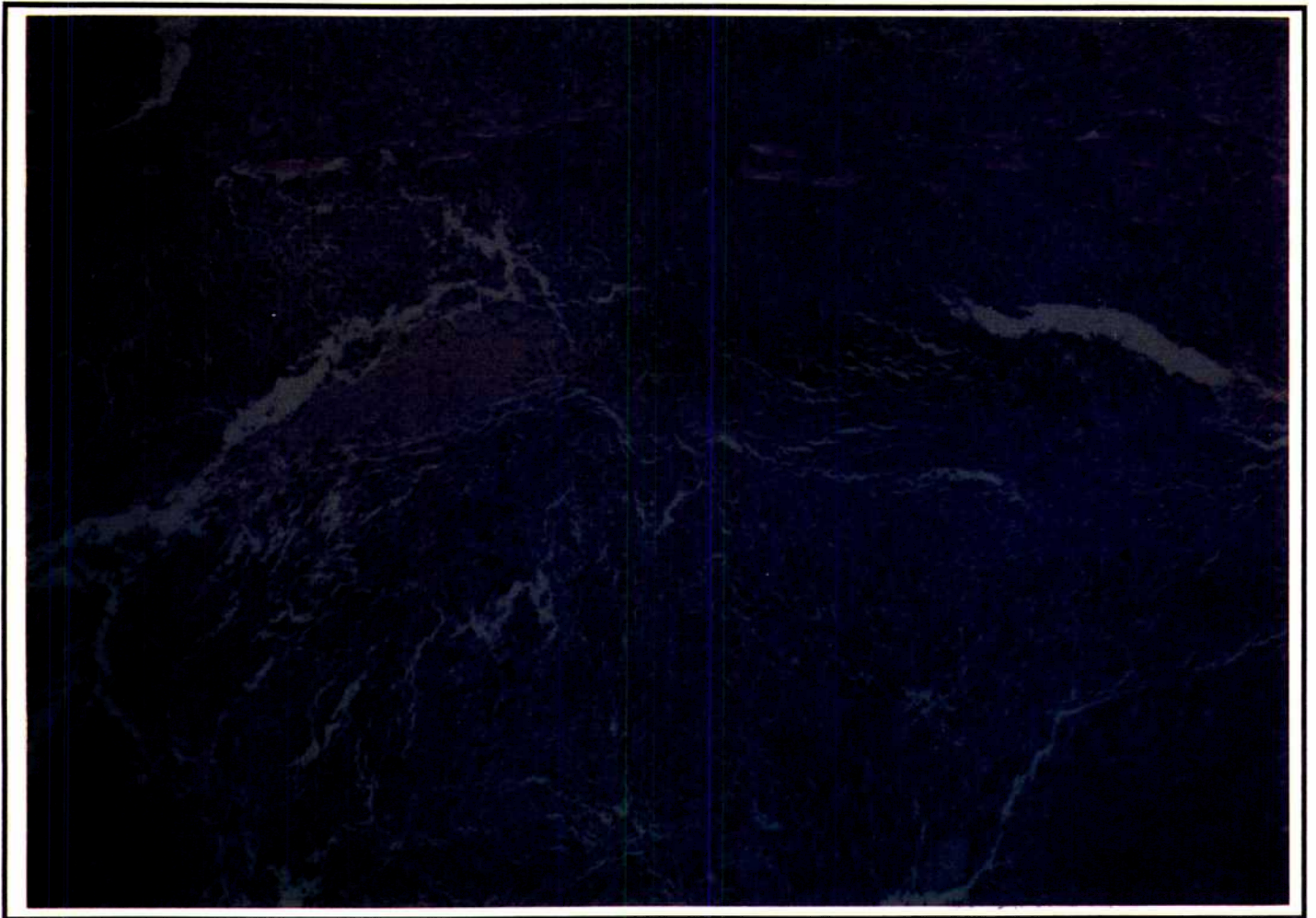
c



Observación con mayor aumento (x 125) del tumor secundario MC-C descrito en la fotografía anterior. **b)** Nótese la banda periférica de células tumorales conservadas y la zona central necrótica (N) y **c)** el infiltrado linfocitario (I).

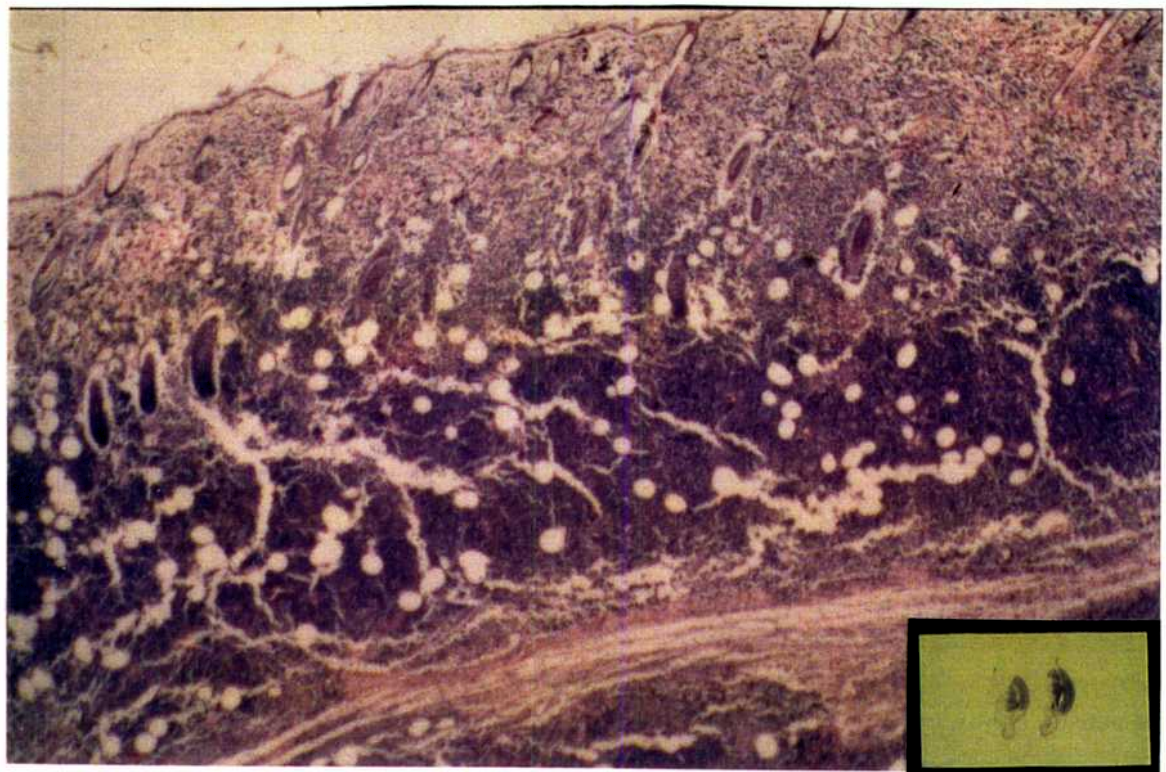


Fotografía 3. Resistencia concomitante generada por un tumor primario MC-C de gran tamaño (Segundo pico de RC). H&E. Observación con bajo aumento (x 25) de un tumor secundario MC-C de 7 días de evolución inoculado s.c. en el flanco izquierdo de un ratón BALB/c portador de un tumor MC-C de más de 2000 mm³. De arriba hacia abajo: epidermis, dermis, banda muscular y tumor. Se observa su tamaño tumoral disminuido con respecto al control y no se observan áreas de necrosis ni infiltrado linfocitario. Inset: visión macroscópica del preparado

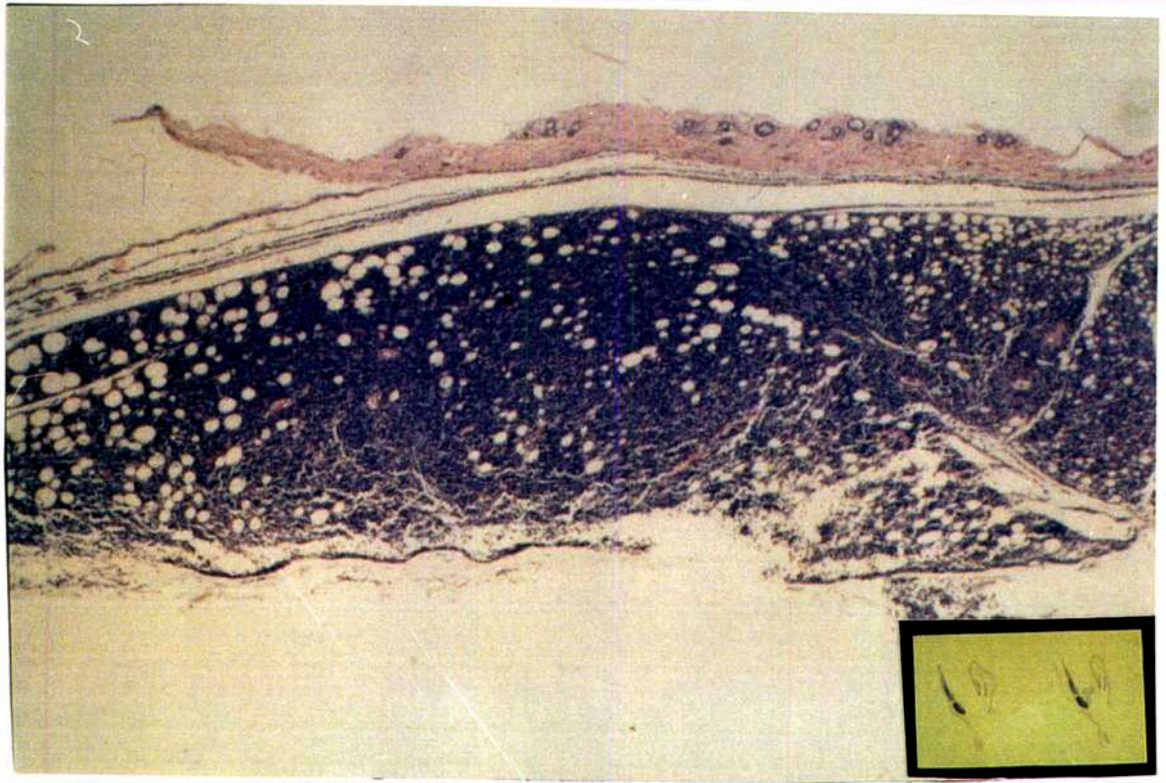


Fotografía 4. Tumor secundario MC-C en presencia de un tumor primario MC-C de 1000-1500 mm³. Observación a bajo aumento (x 25) de un tumor secundario MC-C de 7 días de evolución. H&E.

a



b



Fotografía 5. Resistencia concomitante generada por el tumor LB. H&E.

a) Grupo control. Observación (x 25) de un tumor LB de 7 días de evolución.

b) Grupo experimental. Observación (x 25) de un tumor secundario LB de 7 días de evolución inoculado en ratones BALB/c portadores de un tumor LB >2000 mm³.

Inset: visión macroscópica del preparado.

Estudio de los patrones de proliferación y muerte celular en el tumor secundario MC-C o LB inhibido por RC.

Con el objeto de determinar el tipo de inhibición a nivel de la célula tumoral, se estudiaron distintos parámetros de proliferación y muerte celular en los tumores secundarios MC-C o LB inhibidos por RC, analizando el segundo pico de RC (o sea en presencia de un tumor primario de gran volumen) descrito en secciones anteriores.

Para estudiar el grado de proliferación se realizó en primer término, un recuento de células en **mitosis** por campo de alto aumento sobre cortes histológicos del tumor secundario inhibido por RC. Asimismo, se estudió la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular o **PCNA**, que es un marcador de células en activa proliferación.

Por otro lado, se estudió el grado de muerte celular por apoptosis mediante el recuento de células en **apoptosis** por campo de alto aumento sobre los cortes del tumor secundario inhibido por RC. Se utilizó un criterio morfológico, tomando en cuenta las siguientes características: condensación del citoplasma con aumento de eosinofilia, condensación de la cromatina, marginalización de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Estos estudios fueron luego confirmados mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas específicas para detectar fragmentación del DNA, utilizando la enzima "deoxinucleotidil transferasa terminal" (TdT).

Se observó una disminución significativa en el número de mitosis por campo en el tumor secundario MC-C con respecto a su control (3.05 veces, $P < 0.005$) (**Figura 6 A**). En concordancia con este resultado, se detectó también una disminución significativa (2 veces, $P < 0.05$) en el número de células "PCNA positivas" por campo, en el segundo implante tumoral MC-C con respecto al grupo control (**Figura 6 B**).

Se detectó un incremento en el número de células en apoptosis por campo en el segundo implante tumoral MC-C (2.09 veces, $P < 0.05$) inhibido por RC (**Figura 6 C**).

Variaciones similares en estos parámetros de proliferación y muerte celular fueron encontradas en el tumor secundario LB inhibido por RC (**Figura 7 A, B y C**).

En las **Fotografías 6 a 9** se muestran algunos casos ilustrativos.

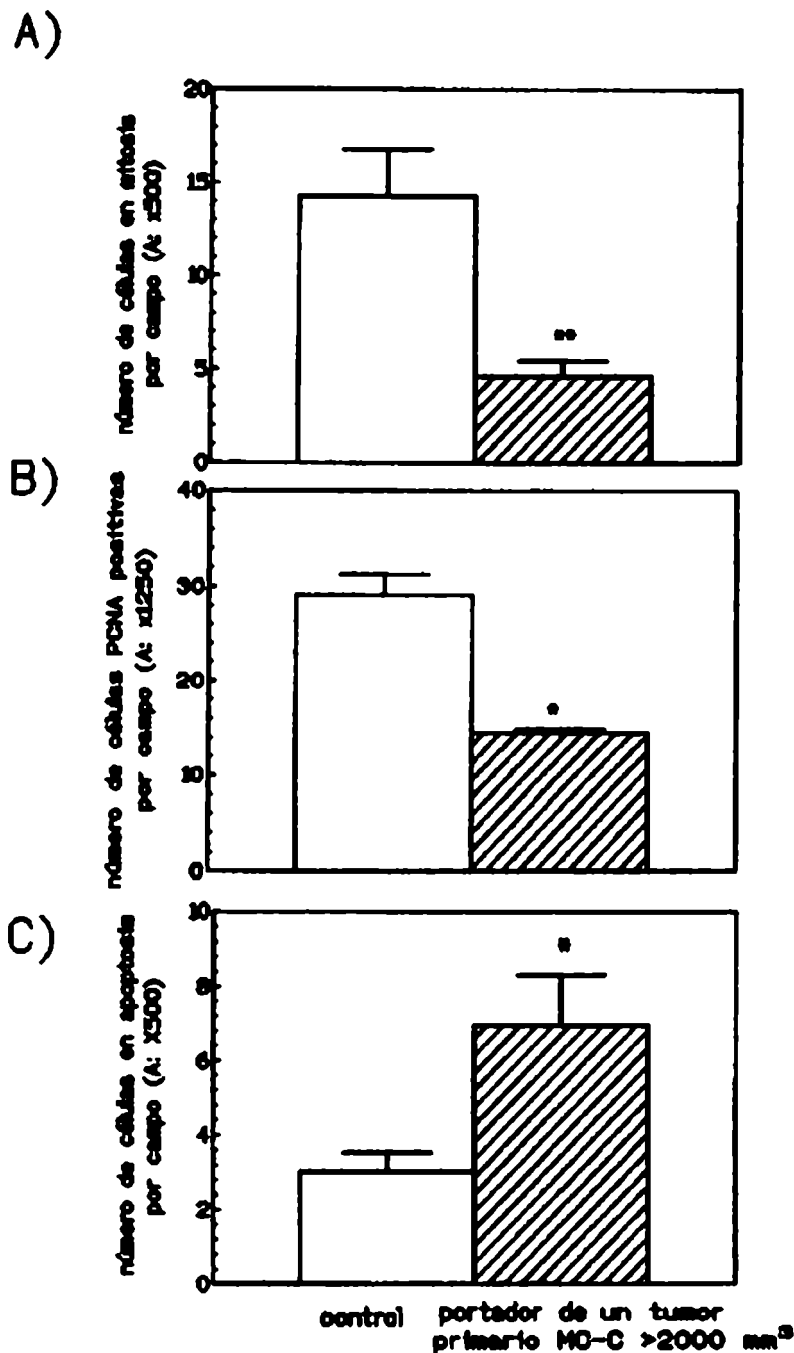
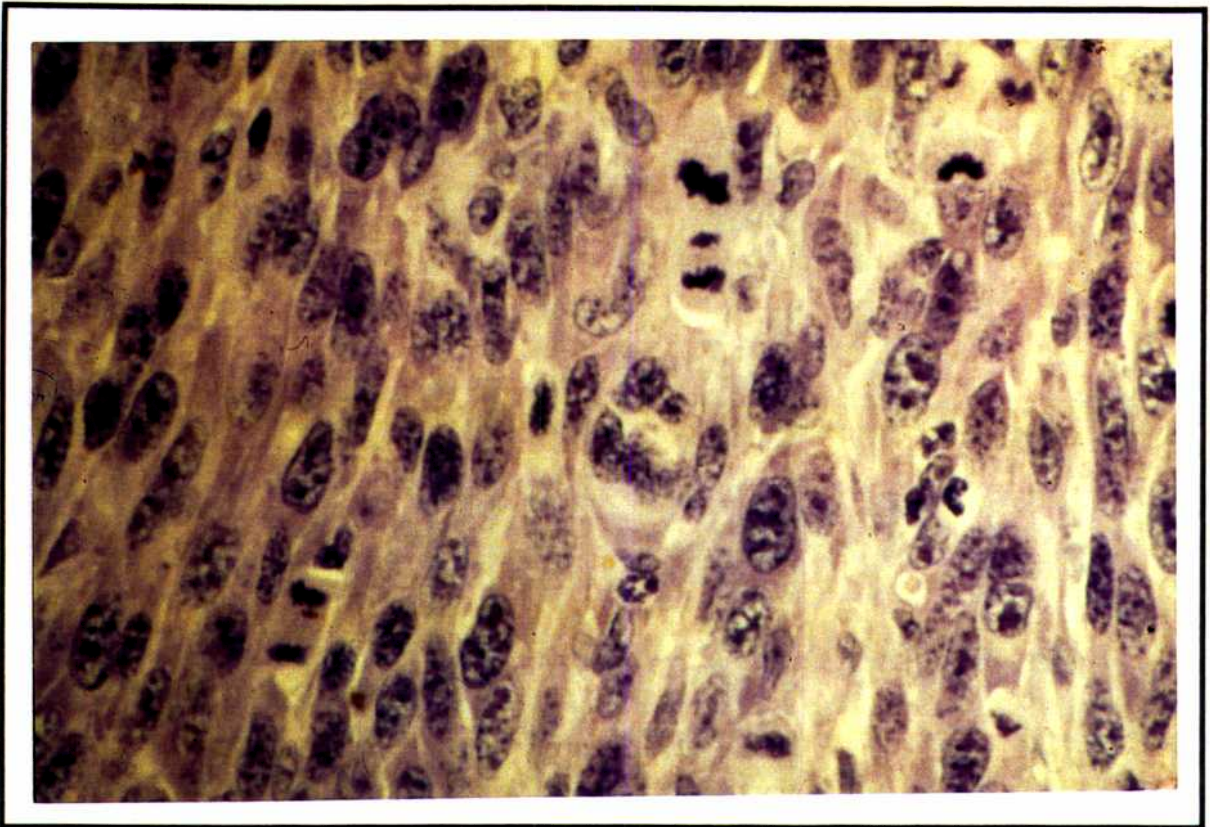


Figura 6. Disminución en el número de células proliferantes y aumento en el número de células en apoptosis, por campo microscópico, en el tumor secundario MC-C inhibido por la presencia de un tumor primario de gran volumen. a) Recuento de células en mitosis, b) detección del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y c) recuento de células en apoptosis. *: P < 0.05; **: P 0.005 (test t-Student); n=6 ratones por grupo; se analizaron 30 campos por corte histológico, con un ds < 15% dentro de cada muestra.



Figura 7. Disminución en el número de células proliferantes y aumento en el número de células en apoptosis por campo microscópico, en el tumor secundario LB inhibido por la presencia de un tumor primario de gran volumen. a) Recuento de células en mitosis, b) detección del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). y c) recuento de células en apoptosis. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.0001$ (test t-Student); $n=6$ ratones en el grupo experimental, $n=8$ ratones en el grupo control; se analizaron 30 campos por corte histológico, con un $ds < 15\%$ dentro de cada muestra.

a

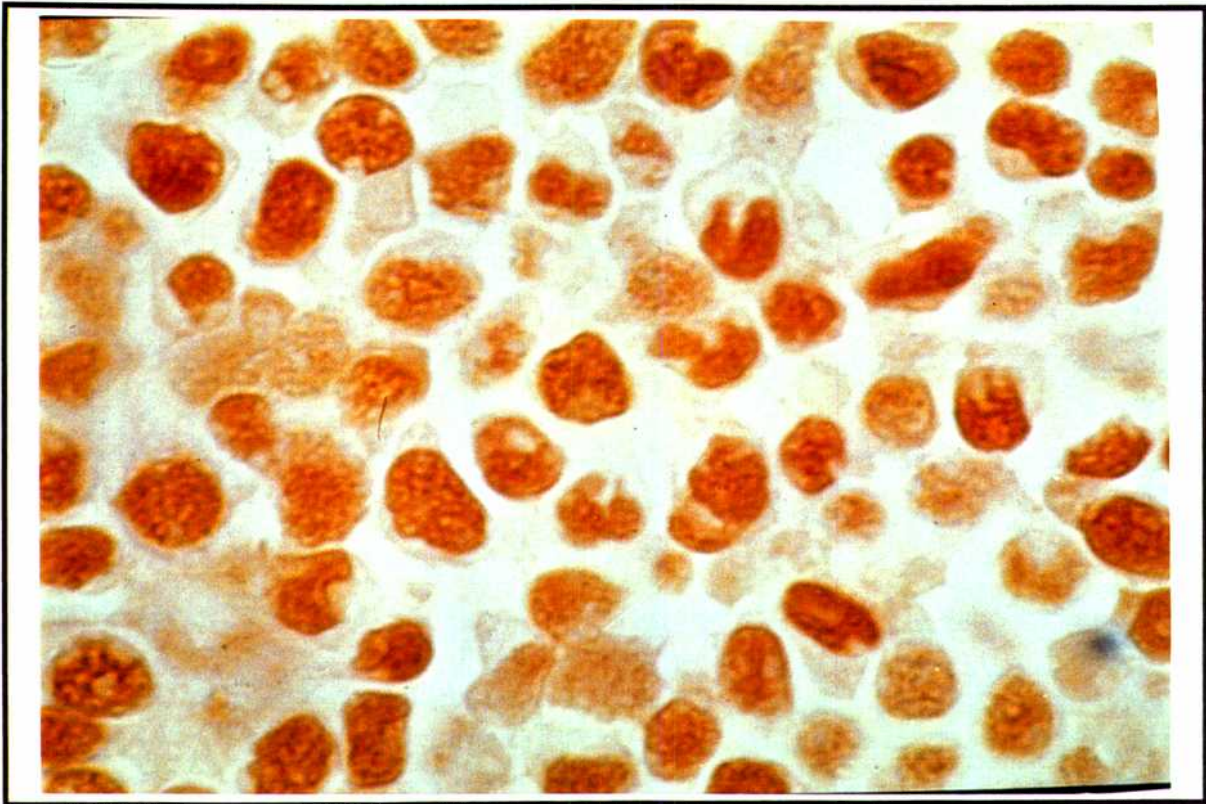


b



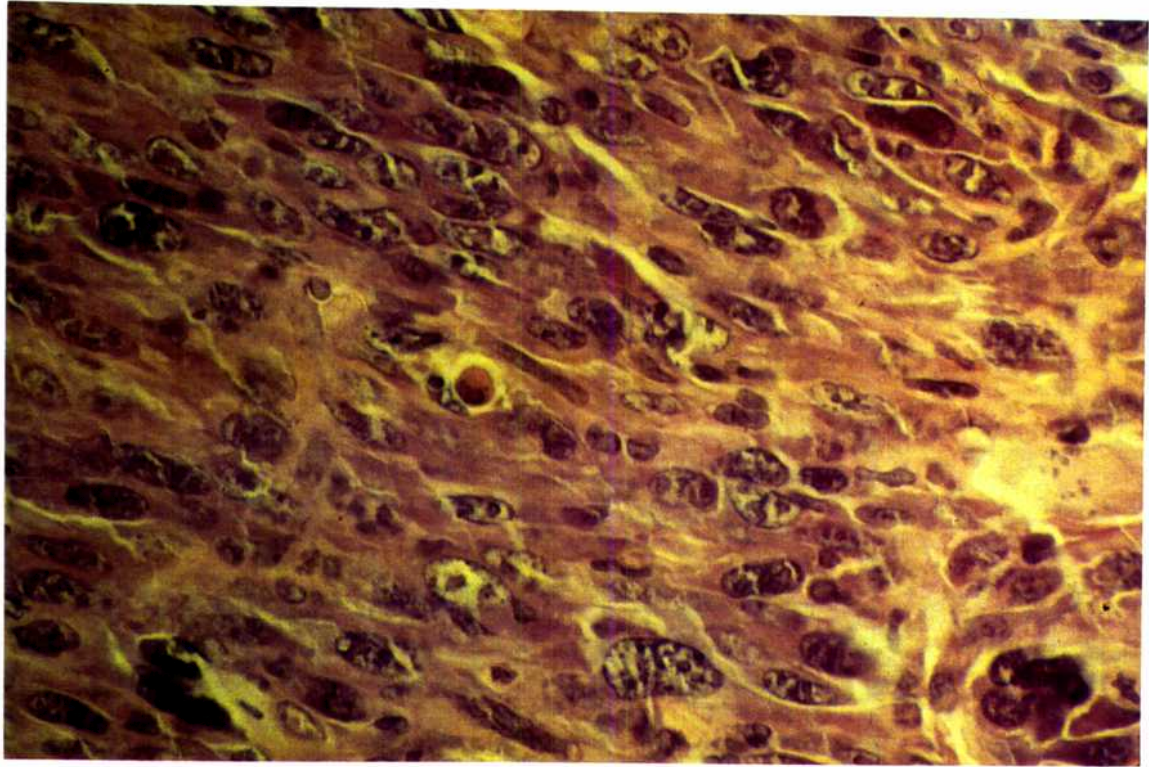
Fotografía 6. Tumor MC-C de 7 días de evolución inoculado en ratones BALB/c (grupo control). a) Tinción: H&E (A= x 500); b) marcación inmunohistoquímica para detección de apoptosis (A= x 500) (contrastado con hematoxilina).

c

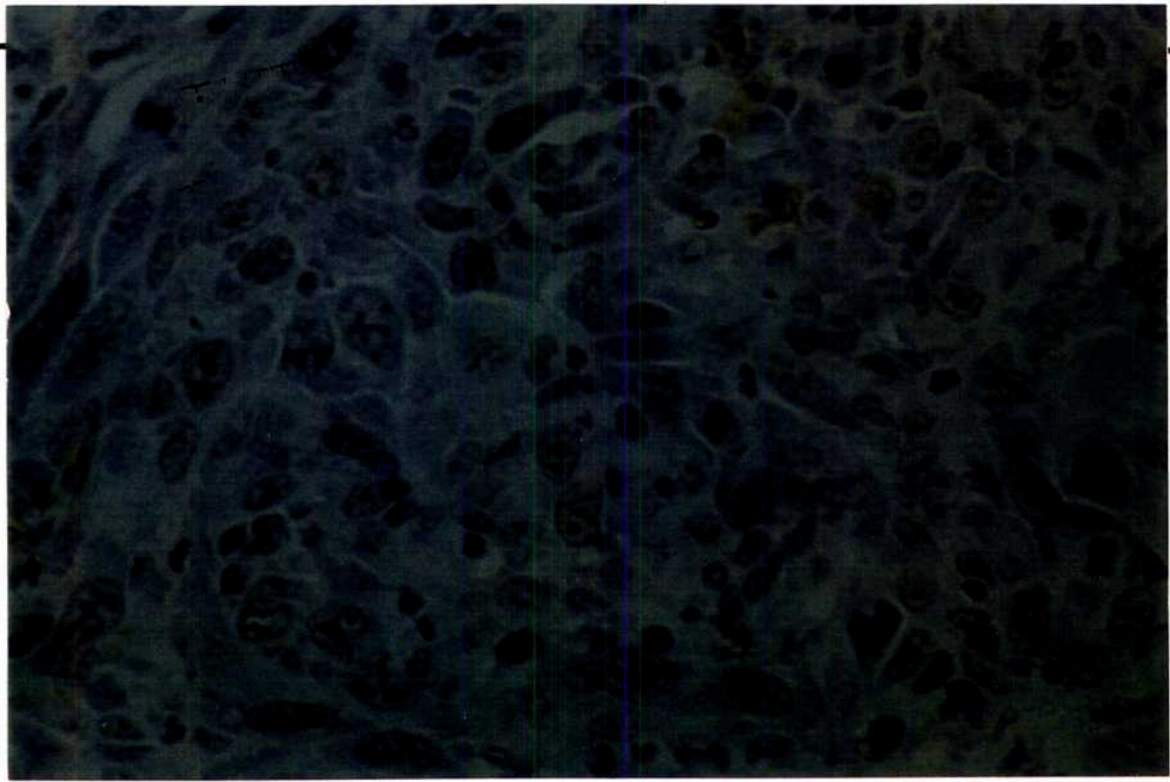


.c) marcación inmunohistoquímica para detección de PCNA (A: x 1250).

a

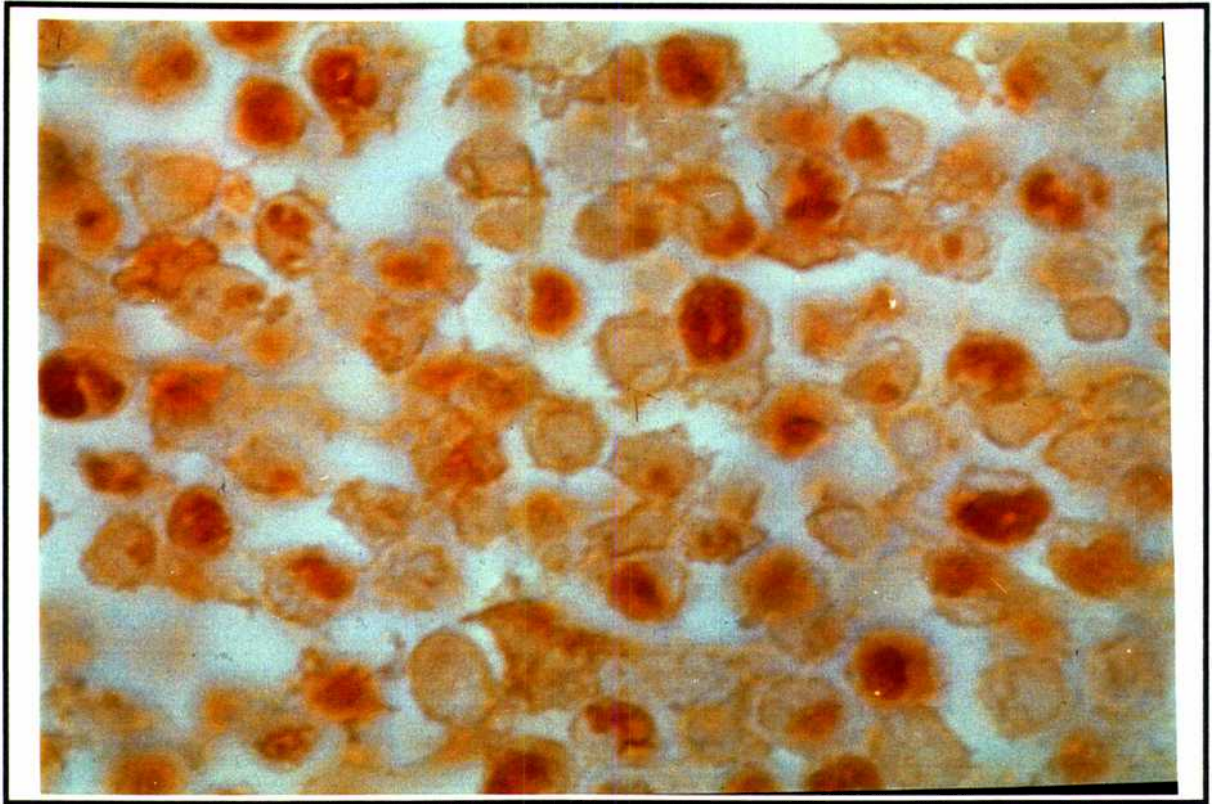


b



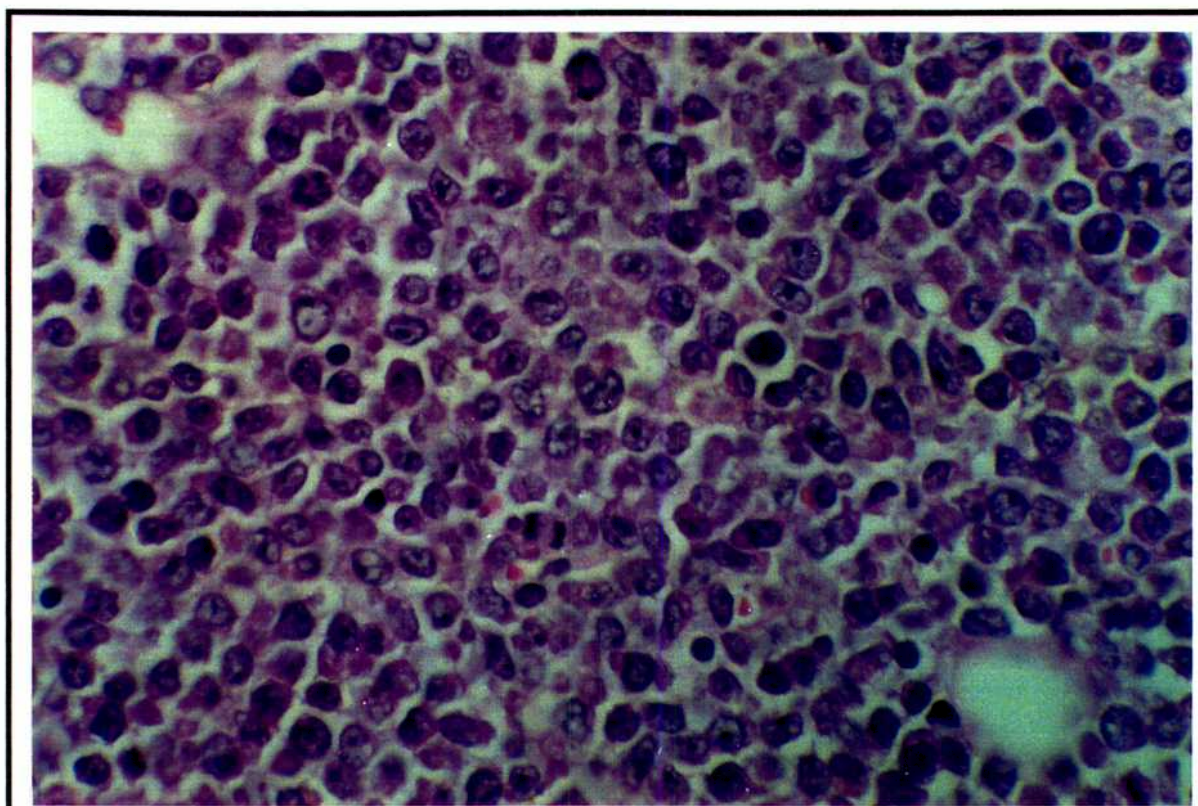
Fotografía 7. Tumor MC-C de 7 días de evolución inoculado en ratones BALB/c portadores de un tumor primario MC-C >2000 mm³ (grupo experimental). a) tinción: H&E (A= x 500); b) marcación inmunohistoquímica para detección de apoptosis (A= x 500).

c

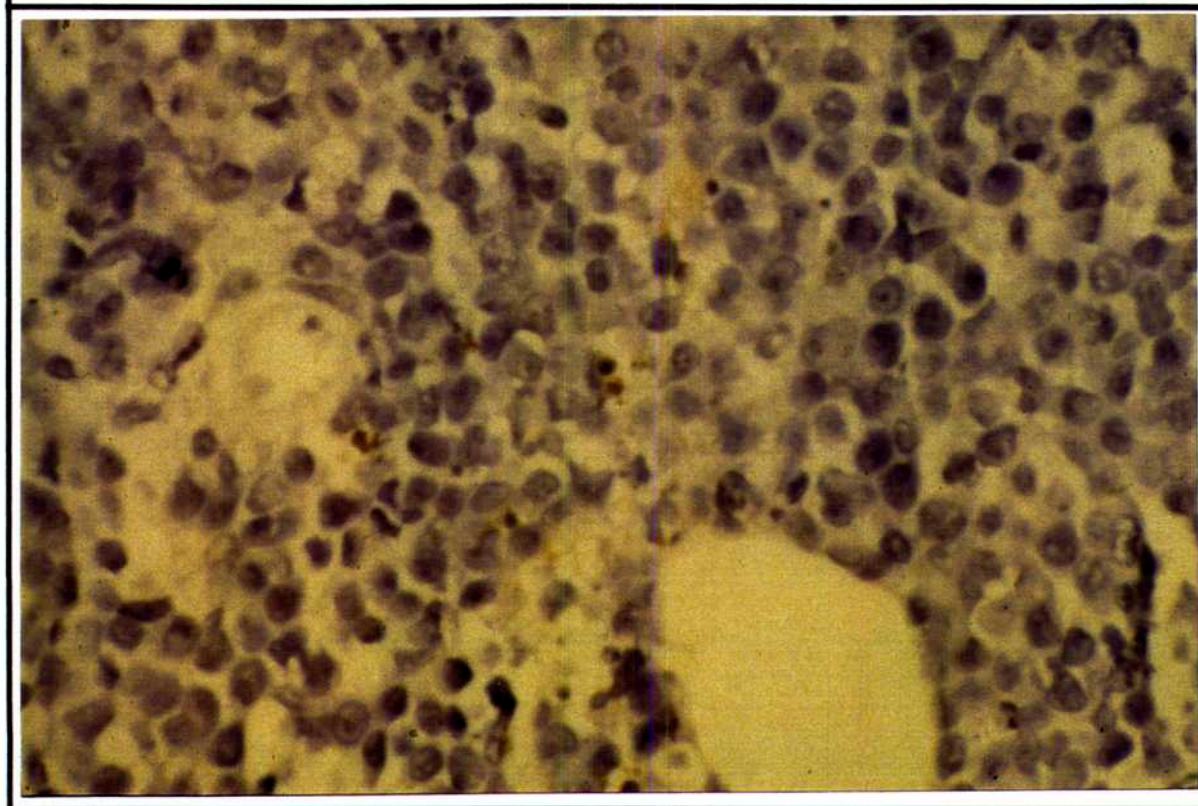


c) marcación inmunohistoquímica para detección de PCNA (A:= x 1250).

a

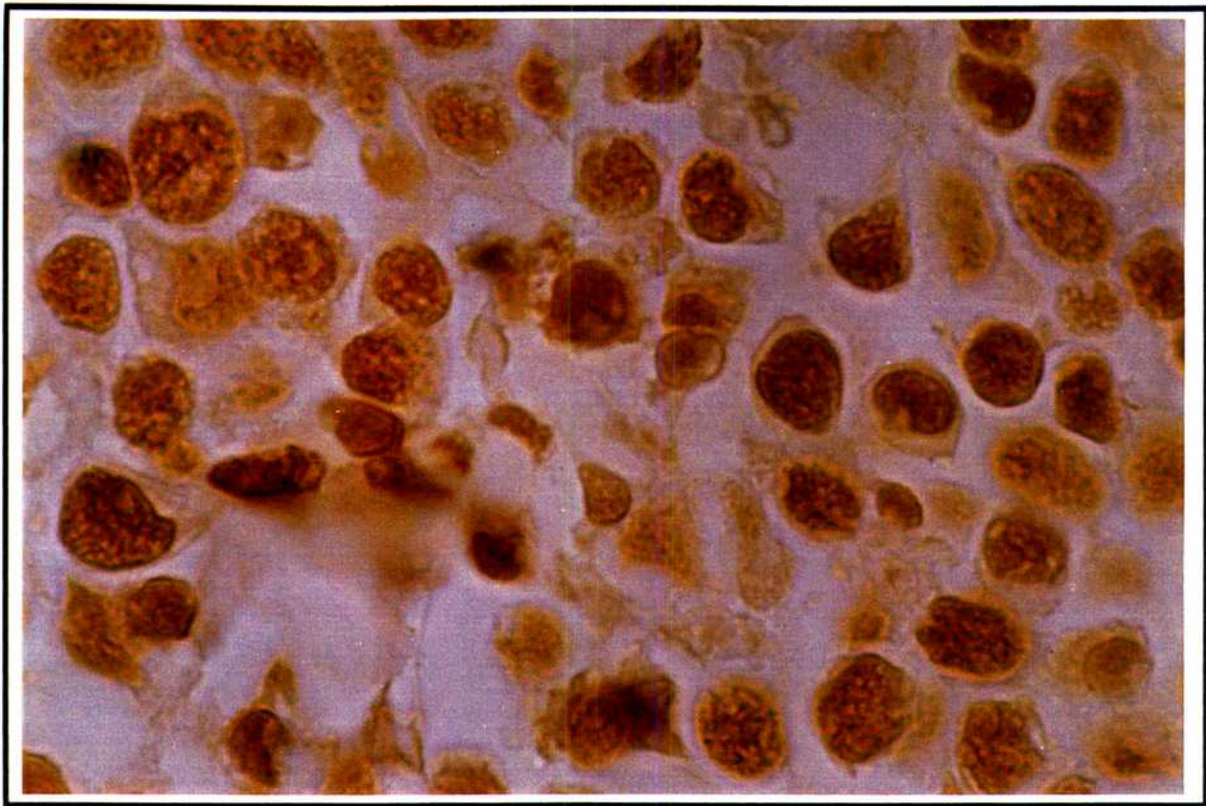


b

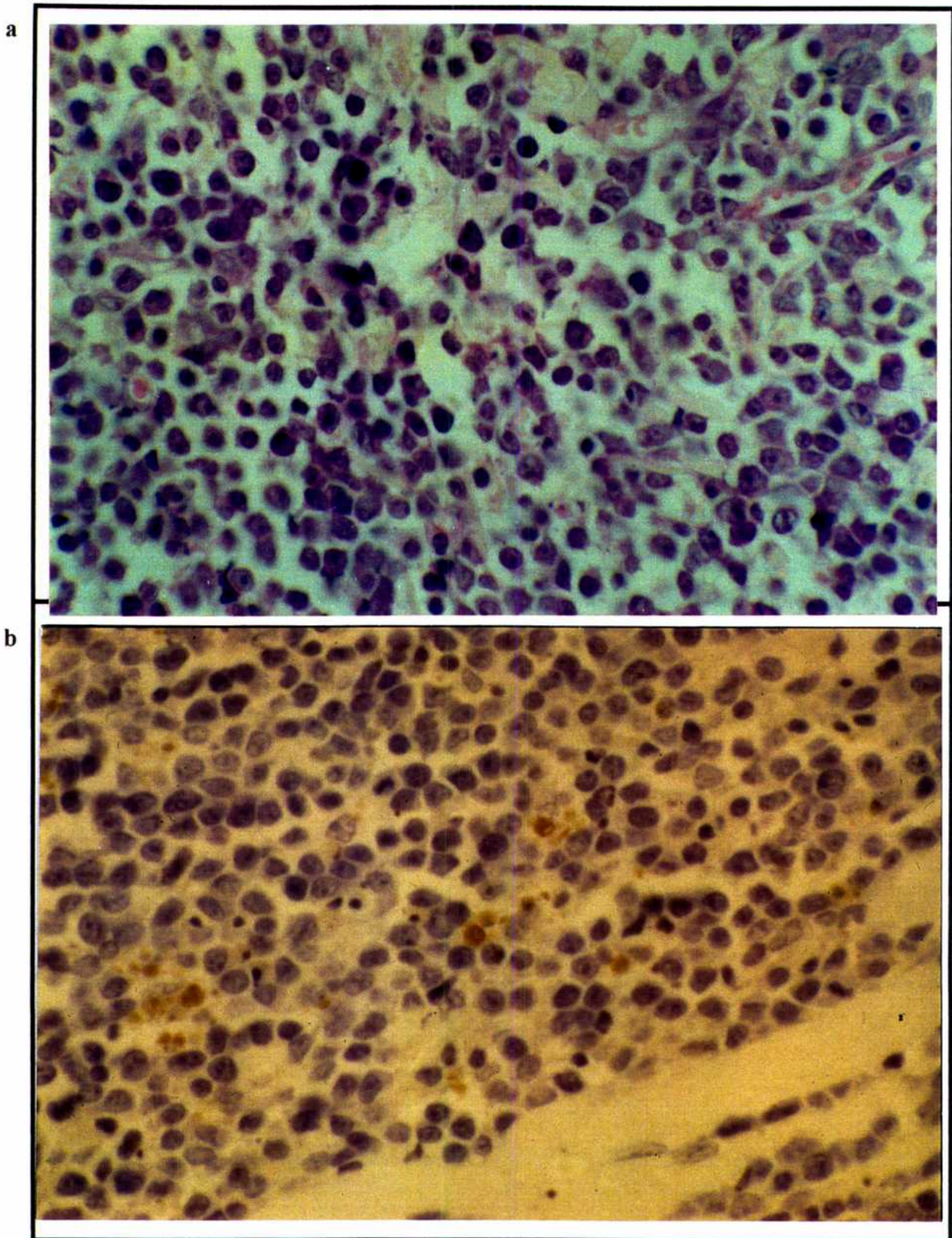


Fotografía 8. Tumor LB de 7 días de evolución inoculado en ratones BALB/c (grupo control). a) Tinción: H&E (A= x 500); b) marcación inmunohistoquímica para detección de apoptosis (A= x 500) (contrastada con hematoxilina).

c

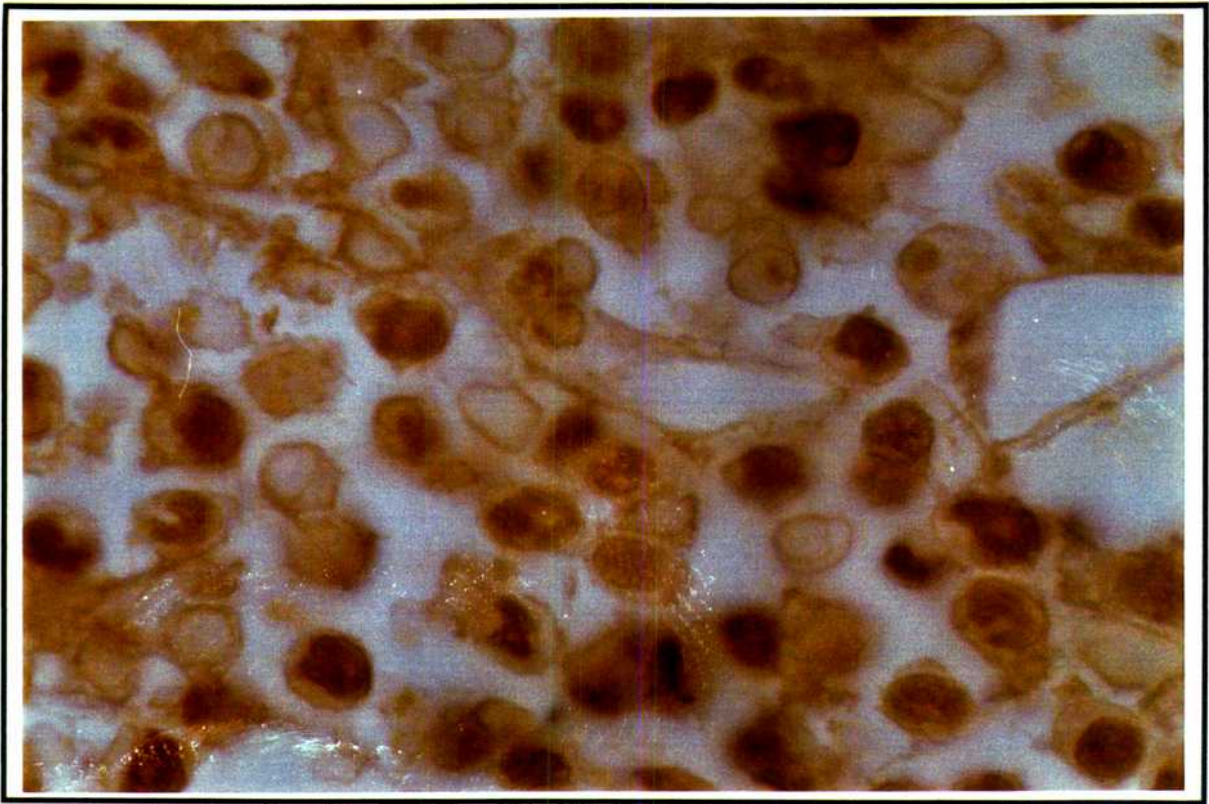


c) marcación inmunohistoquímica para detección de PCNA (A: x 1250).



Fotografía 9. Tumor secundario LB de 7 días de evolución inoculado en ratones BALB/c portadores de un tumor primario LB > 2000 mm³ (grupo experimental). a) Tinción: H&E (A= x 500); b) marcación inmunohistoquímica para detección de apoptosis (A= x 500) (contrastada con hematoxilina).

c



c) marcación inmunohistoquímica para detección de PCNA (A: x 1250).

El estudio de la inducción de apoptosis fue profundizado utilizando técnicas de **citofluorometría de flujo**. Para ello se eligió como modelo de estudio al tumor **LB**, ya que por su naturaleza linfoidea resulta más adecuado para el uso de esta metodología. Se obtuvieron células LB a partir del segundo implante tumoral subcutáneo cuyo crecimiento estaba restringido por la presencia de un tumor primario LB.

Como paso previo, para confirmar que las células obtenidas eran LB y no posibles contaminantes normales del tejido subcutáneo (fibroblastos, células epiteliales) se realizó una marcación de las células extraídas con anticuerpos dirigidos contra el marcador LFA-1 (1 (Lymphocyte-Function-Associated Antigen, cadena α), cuya expresión por parte de las células LB había sido demostrada previamente (122). Nuestros estudios revelaron que las células obtenidas expresaban este antígeno (**Figura 8**), con un patrón similar al descrito para células LB puras (122).

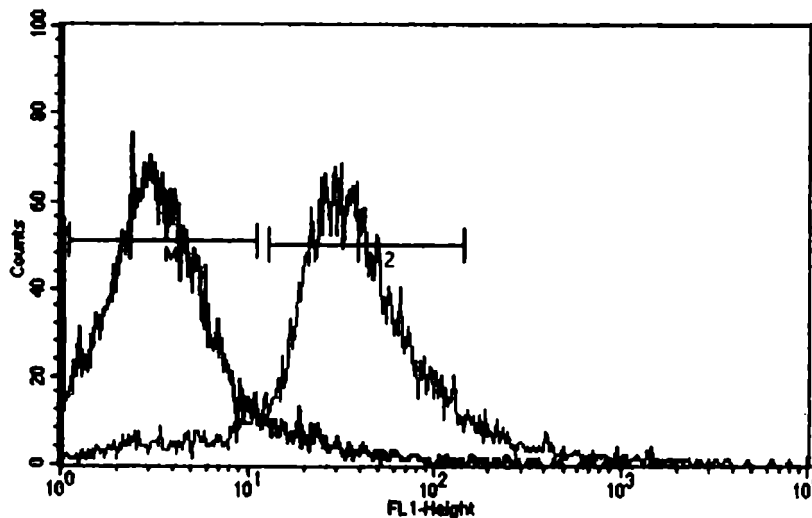


Figura 8. Perfil de fluorescencia de las células extraídas de un tumor subcutáneo LB marcadas con anticuerpos dirigidos contra el antígeno de superficie LFA-1. Las células LB (10^6) fueron resuspendidas en buffer e incubadas con anticuerpos monoclonales contra el antígeno de membrana LFA-1 (Lymphocyte-Function-Associated Antigen) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), lavadas y fijadas. La intensidad de fluorescencia fue analizada por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo, donde se observa que la población mayoritaria expresa el antígeno LFA-1. Histograma de la izquierda: autofluorescencia; histograma de la derecha: fluorescencia debido al binding del anticuerpo anti-LFA-1 conjugado a FITC.

A partir de aquí, se realizó la tinción de las células LB extraídas del tumor secundario inhibido por RC, con el fluorocromo ioduro de propidio y se analizaron los resultados mediante citofluorometría de flujo. A partir del perfil de DNA de las células analizadas, se estudió la aparición de un pico de contenido hipodiploide de DNA (sub-G₀) característico de la apoptosis.

El tumor secundario LB, cuyo desarrollo estaba inhibido por la presencia del tumor primario, mostró un significativo aumento de la población apoptótica comparado con el grupo control (Figuras 9 y 10).

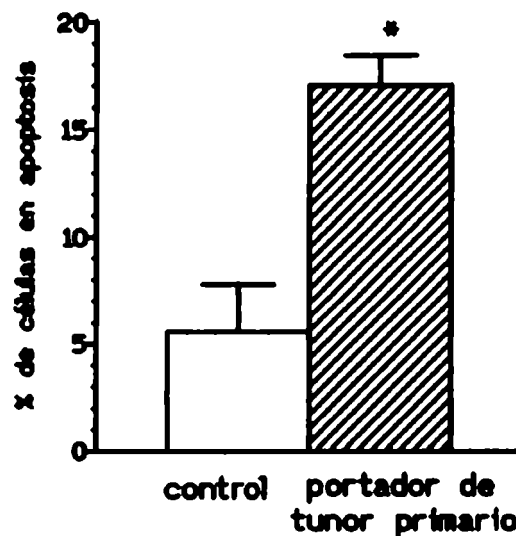


Figura 9. Inducción de apoptosis en el tumor secundario LB inhibido por RC, en ratones BALB/c. El % de células en apoptosis se calcula en base a los histogramas de número de células vs contenido de DNA por célula (FL-3 H) obtenidos por citofluorometría de flujo, en los cuales aparece un pico hipodiploide. Se grafica el promedio \pm ES de 12 ratones analizados. Se compara el número de células en apoptosis en el grupo experimental vs el grupo control mediante el test t-Student (*: $P < 0.01$).

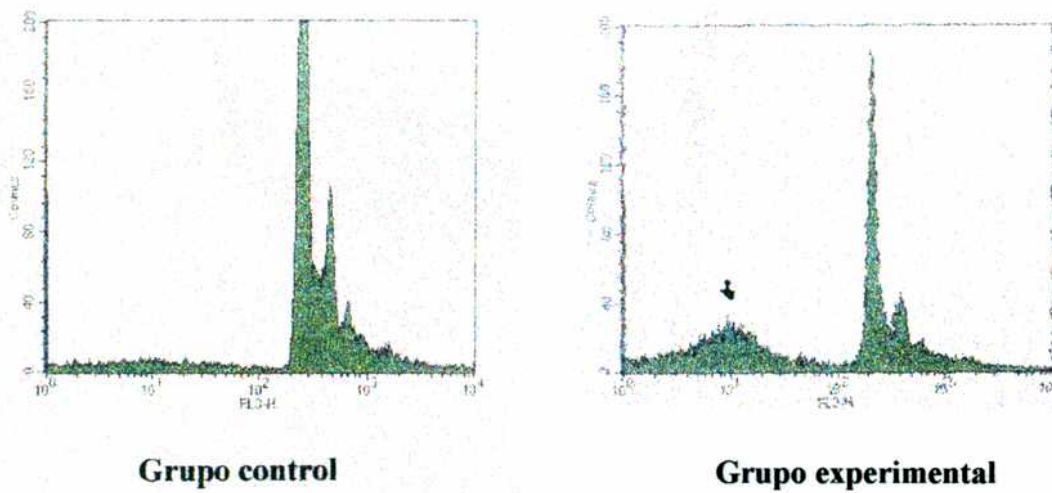


Figura 10. Inducción de apoptosis en el tumor secundario LB inhibido por RC, en ratones BALB/c. Se muestran los histogramas de la fluorescencia FL-3 H, donde la fluorescencia del yoduro de propidio representa el contenido de DNA por célula. La flecha indica el pico hipodiploide correspondiente a la población en apoptosis.

Inducción de alteraciones en la distribución en el ciclo celular.

Las células tumorales y normales se encuentran distribuidas en las distintas etapas del ciclo celular: fase S o de síntesis de DNA, fase M o de mitosis e interfases G_0 , G_1 y G_2 , siendo identificables en base a su contenido de DNA característico, utilizando un fluorocromo que tiñe el DNA.

Nos propusimos determinar si en el tumor secundario LB inhibido por RC se observaba algún cambio en la distribución de las células en las distintas etapas del ciclo celular debido a la presencia del tumor primario.

Para ello, una vez extraído el tumor secundario LB inhibido por RC, se realizó la tinción con yoduro de propidio (con o sin fijación previa de las células) y mediante citofluorometría de flujo y software apropiado, se analizó la población de células "vivas" o no apoptóticas y su distribución en las distintas fases del ciclo celular. Las distintas fases (o rangos) del ciclo celular (G_0 - G_1 , S y G_2 -M) se definieron en términos de las unidades de fluorescencia (yoduro de propidio) en las abcisas. Los porcentajes de células en cada una de estas fases se calcularon a partir de los histogramas elaborados de acuerdo con el contenido de DNA.

El tumor secundario LB inhibido por RC mostró disrupciones en el ciclo celular, de las cuales las más pronunciadas fueron el crecimiento de la fracción de células en fase S y la disminución de las fases G_2 -M y G_0 - G_1 (Tabla VI).

En la Figura 11 se pueden observar los perfiles de "contenido de DNA" del grupo experimental y control correspondientes a un experimento representativo.

Tabla VI. Alteraciones en la distribución en el ciclo celular en el tumor secundario LB inhibido por RC.

Fases del ciclo celular

	<i>G₀-G₁</i>	<i>S</i>	<i>G₂-M</i>
Tumor secundario inhibido por RC	66.7 ± 1.4 *	29.7** ± 0.6	3.5** ± 1.3
Tumor control	75.6 ± 3.9	10.9 ± 4.9	9.8 ± 1.1

Ratones BALB/c portadores de un tumor primario LB recibieron un segundo inóculo de células LB en el flanco opuesto; el grupo control no tiene tumor primario.

Los tumores secundarios fueron extraídos luego de 7 días y analizados.

Los porcentajes de células en cada fase fueron calculados en base a los histogramas de “contenido de DNA” (FL2-área) (ver Figura 11) utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson). Se muestran las medias ± ES de 3 experimentos; n= 12 ratones. Se compara el número de células en cada fase del ciclo celular en el grupo experimental vs el control mediante el test t-Student (*P< 0.05; **:P<0.005)

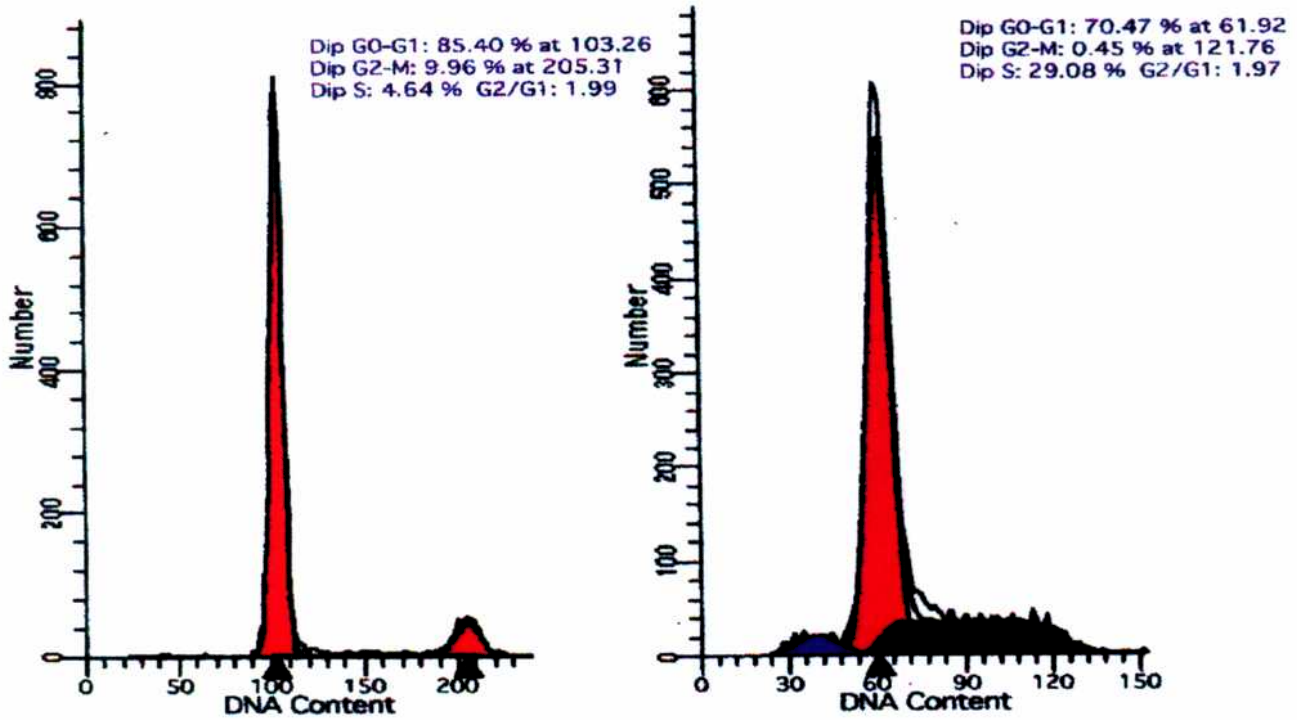


Figura 11. Perfil de fluorescencia en base al contenido de DNA de las células de un tumor secundario LB. Ratones BALB/c portadores de un tumor primario LB recibieron un segundo inóculo de células LB en el flanco opuesto (gráfico de la izquierda); el grupo control no tiene tumor primario (gráfico de la derecha). Los tumores secundarios fueron extraídos luego de 7 días y las células se tiñeron con yoduro de propidio. La intensidad de fluorescencia fue medida en un citómetro de flujo y las poblaciones de células en cada fase del ciclo celular fueron identificadas en base a su contenido de DNA (FL2-A) utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson). Se muestran los histogramas de FL2-A correspondientes a un experimento representativo.

El conjunto de los resultados presentados en esta Segunda Parte sugiere que: el primer pico de RC (que sólo es exhibido por los tumores inmunogénicos) está asociado a infiltración linfocitaria y alto grado de necrosis, signos de un rechazo inmunológico convencional.

el segundo pico de RC (común a tumores inmunogénicos y no inmunogénicos) no está asociado a un rechazo inmunológico convencional, observándose en el tumor secundario inhibido por RC, una disminución en el número de células proliferantes -en mitosis o positivas para el antígeno PCNA-, un aumento en el número de células en apoptosis y alteraciones en la distribución en el ciclo celular -aumento de la fracción S y disminución de la fracción G_2-M y G_0-G_1 ,-

Tercera parte: Mecanismos del huésped asociados a la resistencia concomitante.**Estudio de la respuesta inmune humoral y celular, y su participación en el fenómeno de RC**

Para el estudio del rol de la respuesta inmune antitumoral en el fenómeno de RC, se eligió como modelos a los tumores MC-C y L15, ambos muy inmunogénicos y al tumor LB, de inmunogenicidad no detectable.

Anticuerpos citotóxicos:

Se midió *in vitro* la actividad de anticuerpos citotóxicos en el suero de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C, L15 y LB, sobre las células del propio tumor marcadas con ^{51}Cr . El título de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento de cada suero se expresó en "unidades citóticas $_{50}$ " (UC_{50}) por ml, que es el factor de dilución del suero para el cual el % de lisis específica es de un 50%. Como se puede observar en la **Figura 14**, se pudo detectar actividad de anticuerpos citotóxicos en el suero de ratones BALB/c portadores de un tumor L15 y MC-C, cuando el tumor estaba en las primeras etapas de su crecimiento (título suero tumoral / título suero normal: 12.1 ± 7.6 para el tumor MC-C ($P < 0.05$); 220.3 ± 75.1 para el tumor L15 ($P < 0.005$). Esta actividad citotóxica decayó a volúmenes tumorales mayores, alcanzando los valores del suero normal.

Contrariamente a lo observado para los tumores MC-C y L15, no se detectó actividad de anticuerpos citotóxicos en el suero de ratones portadores del tumor LB a lo largo de todo su desarrollo.

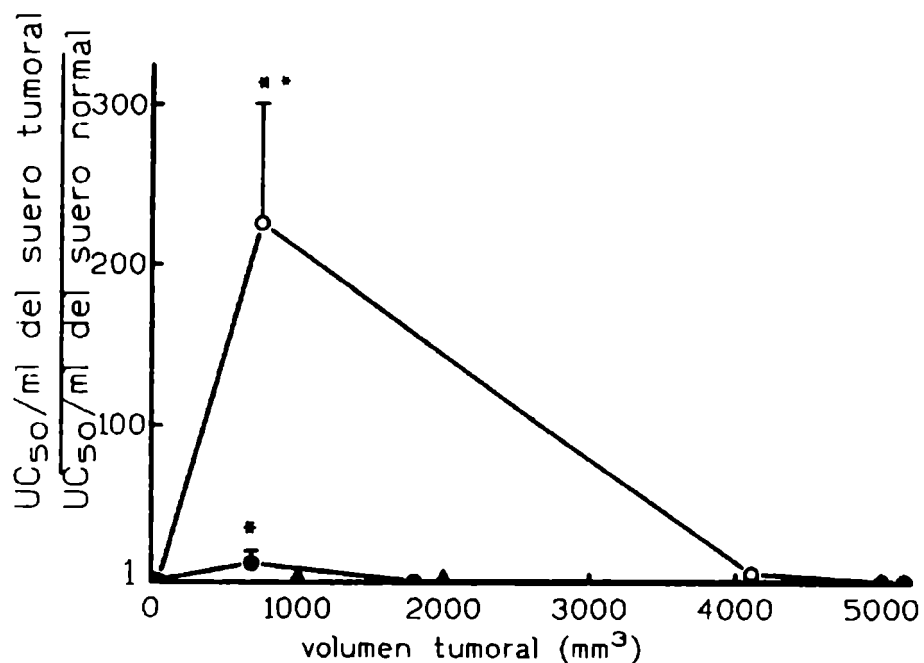


Figura 14. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos y complemento en suero de ratones BALB/c portadores del tumor L15 (—○—), MC-C (—●—) o LB (—▲—). El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo sobre las respectivas células tumorales marcadas con ⁵¹Cr. Se grafica la media \pm ES de 3 experimentos (n=6 ratones) para cada tumor. Título de anticuerpos citotóxicos en suero normal=1; *:P<0.05; **:P<0.005 (test t-Student).

Inmunidad mediada por células:

Se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*:

Ensayos *in vitro*: se midió la actividad citotóxica de los esplenocitos de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C, L15 o LB sobre las propias células tumorales marcadas con ^{51}Cr . Como podemos observar en la **Figura 15**, los esplenocitos de ratones portadores del tumor MC-C o L15 en las primeras etapas de su desarrollo, exhibieron citotoxicidad contra las células tumorales significativamente mayor que los esplenocitos normales. Luego, a medida que se incrementaba el volumen tumoral, la citotoxicidad decayó abruptamente para el tumor MC-C y progresivamente para el tumor L15 (en este último caso manteniéndose niveles detectables). Si bien los niveles de citotoxicidad fueron mucho mayores para el tumor L15 que para el MC-C, en ambos casos se observó un patrón similar según el cual la mayor respuesta citotóxica se dió en los primeros estadios del desarrollo del tumor, para luego decaer. Por el contrario, no se detectó actividad citotóxica de los esplenocitos de ratones portadores del tumor LB a lo largo de todo su crecimiento.

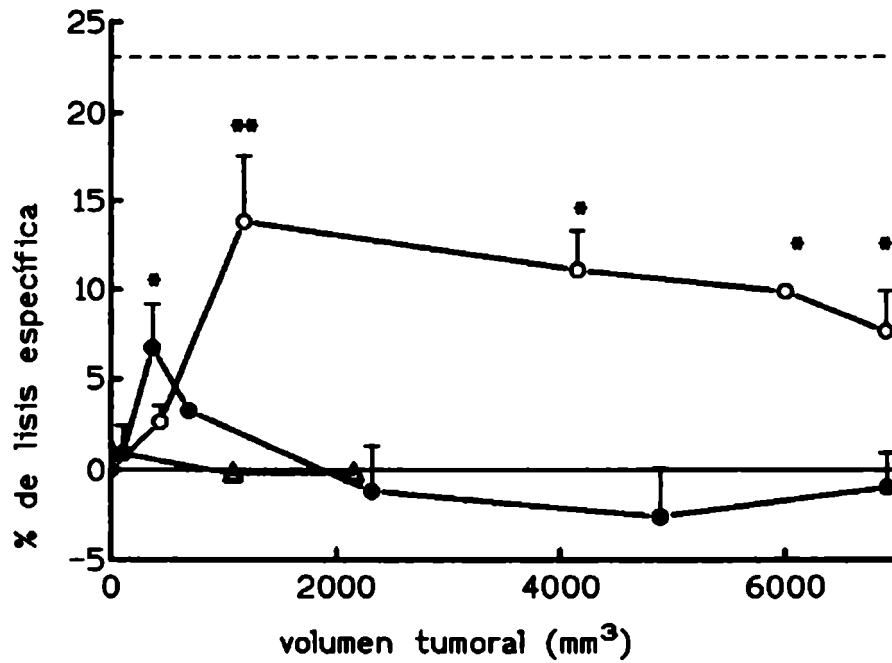


Figura 15. Actividad citotóxica de esplenocitos de ratones BALB/c portadores del tumor L15 (-○-), MC-C (-●-) o LB (-△-). Las células tumorales (target) fueron marcadas con ⁵¹Cr.; se grafica la media ± SE de 4 determinaciones; *: P<0.05; ** P<0.01 (test t-Student); - - - : esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados contra L15 (control positivo); —: esplenocitos normales

Ensayos *in vivo*:

1) Transferencia adoptiva: Se transfirieron 10^8 esplenocitos de ratones portadores del tumor MC-C por vía e.v. a ratones normales que luego recibieron un inóculo por vía s.c. de 5×10^5 células MC-C.

2) Test de Winn: Los ratones BALB/c recibieron un inóculo de células tumorales junto con esplenocitos de ratones portadores de tumor en una relación 100:1 por vía s.c. Este tipo de ensayo se llevó a cabo tanto para el tumor MC-C como para el tumor LB.

En el caso del tumor MC-C se logró transferir inmunidad al inocular esplenocitos de ratones portadores de un tumor MC-C de menos de 800 mm^3 , perdiéndose esta inmunidad a volúmenes mayores. Similarmente, cuando se inocularon conjuntamente esplenocitos de ratones portadores del tumor MC-C y células tumorales (test de Winn), sólo se detectó actividad antitumoral en los esplenocitos de portadores de tumores pequeños. Por el contrario, no se detectó inmunidad antitumoral en los esplenocitos de ratones portadores del tumor LB a lo largo de todo su crecimiento (Tablas VIII y IX).

Tabla VIII. Ensayos *in vivo* de inmunidad mediada por células. Transferencia adoptiva y test de Winn utilizando esplenocitos de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C.

<i>Origen de los esplenocitos</i>	<i>Incidencia de tomas tumorales</i>	
	<i>Transferencia adoptiva^a</i>	<i>Test de Winn^b</i>
Ratones normales	12:12	10:12
Ratones portadores de un tumor MC-C de 200-800 mm³	11:19*	1:6*
Ratones portadores de un tumor MC-C mayor de 3000 mm³	6:6	5:9

*: $P < 0.05$ (test X^2)

a: se inocularon 10^8 esplenocitos por vía e.v. seguido de la inoculación por vía s.c. con 5×10^5 células MC-C.

b: se inocularon conjuntamente los esplenocitos y las células del tumor MC-C por vía s.c.

Tabla IX . Ensayo *in vivo* de inmunidad mediada por células contra el tumor LB. Test de Winn.

<i>Origen de los esplenocitos</i>	<i>Incidencia de tomas tumorales^a</i>
Ratones normales	5:12
Ratones portadores de un tumor LB>2000mm³	7:12

a: Se inocularon conjuntamente 5×10^3 células del tumor LB y esplenocitos en una relación 100:1.

Actividad natural killer (NK):

Se midió la actividad NK de los esplenocitos de ratones BALB/c eutímicos y nude portadores del tumor MC-C, mediante un ensayo *in vitro* sobre células YAC-1 marcadas con ⁵¹Cr. En la **Figura 16** se muestra un experimento representativo de tres realizados. Como podemos observar, la actividad NK en los ratones BALB/c eutímicos portadores de tumor fue menor que en ratones normales, decreciendo esta actividad a medida que el volumen tumoral era mayor. Esto sugeriría que la actividad NK no jugaría un rol importante e indicaría que el segundo pico de resistencia concomitante, que, como vimos antes, es inespecífico, no sería atribuible a la actividad NK.

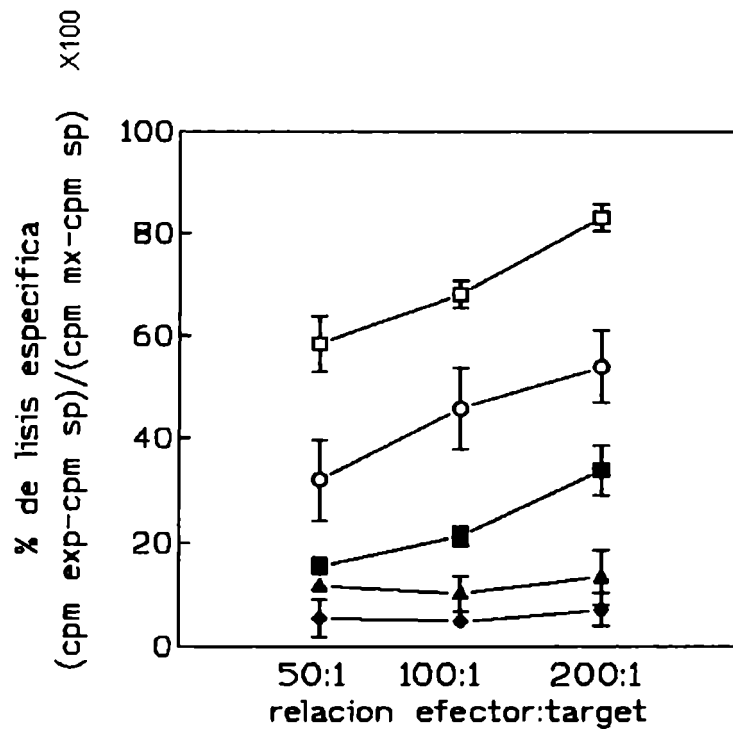


Figura 16. Actividad natural killer (NK) de esplenocitos de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C. El ensayo fue realizado sobre células de la línea YAC-1 marcadas con ⁵¹Cr.

(-○-): ratones normales; (-■-): ratones portadores de MC-C de 200-400 mm³; (-▲-): ratones portadores de MC-C de 1000-1200 mm³; (-◆-): ratones portadores de MC-C mayor de 2000 mm³; (-□-) : control positivo (ratones inoculados con poli-IC -Inosina Citosina-). Se muestra un experimento representativo.

Estos resultados en conjunto muestran que en el caso de los tumores inmunogénicos como el MC-C o L15, se genera una respuesta inmune contra el tumor mediada por efectores clásicos de la respuesta inmune antitumoral, ya sea celulares o humorales, que podrían estar involucrados en el fenómeno de RC sólo cuando el tumor primario es relativamente pequeño, ya que tales respuestas se ven disminuidas o suprimidas en etapas más avanzadas del desarrollo tumoral. En este punto, la respuesta inmune antitumoral está ausente y los tumores aún son capaces de inducir RC (segundo pico de RC). Paralelamente, hemos visto que el tumor LB (que sólo presenta este "segundo pico" de RC) es incapaz de inducir en el huésped, una respuesta inmune detectable.

Se investigó entonces, la participación de algunos mecanismos no inmunológicos en el segundo pico de RC:

Inhibición de la neovascularización en el tumor secundario MC-C o LB.

En nuestro laboratorio se había demostrado que la RC inducida por el tumor LB involucraría al menos en parte, una inhibición de la neovascularización (139). Nos preguntamos si esta inhibición también se producía en el caso del tumor MC-C. Para ello realizamos estudios *in vivo*, acompañados del examen histológico del sitio del segundo implante tumoral inhibido por la presencia del tumor primario MC-C > 2000mm³.

El crecimiento del tumor secundario comenzó a inhibirse significativamente a partir del día 10, precedido de una drástica, temprana y transitoria (entre los días 5 y 10) disminución en el número de vasos observables macroscópicamente que drenaban el tumor secundario (**Figura 17**). El examen histológico de la piel del sitio del inóculo tumoral confirmó esta observación (**Fotografía 10**) detectándose, al día 5, un menor número de vasos observables microscópicamente: 3.23 ± 0.11 en el portador de tumor primario vs 6.18 ± 0.11 en el control (media + ds; n= 4 ratones por grupo; 20 campos por corte; P<0.001, test t-Student).

Esto resultados indican que la inhibición de la angiogénesis podría estar involucrada en el segundo pico de RC, al menos en las etapas tempranas de la implantación tumoral.

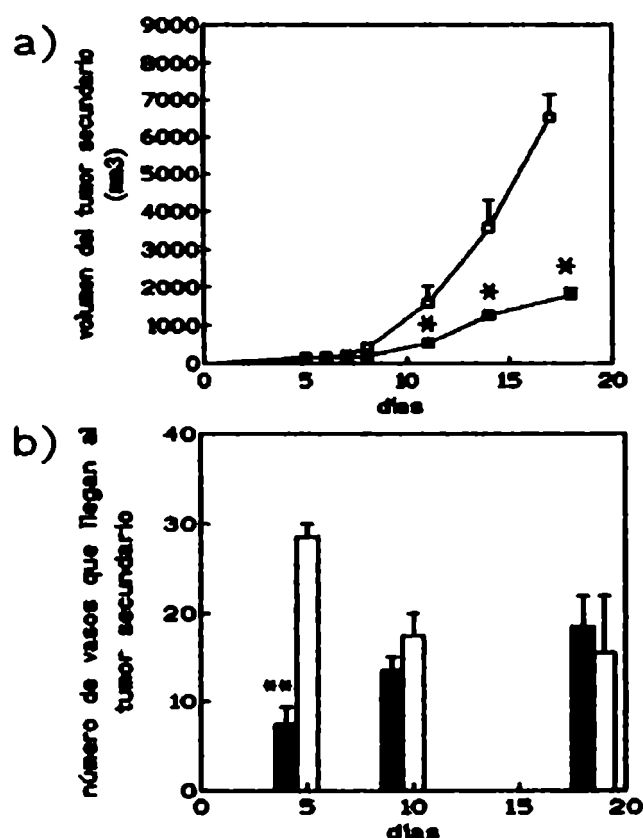
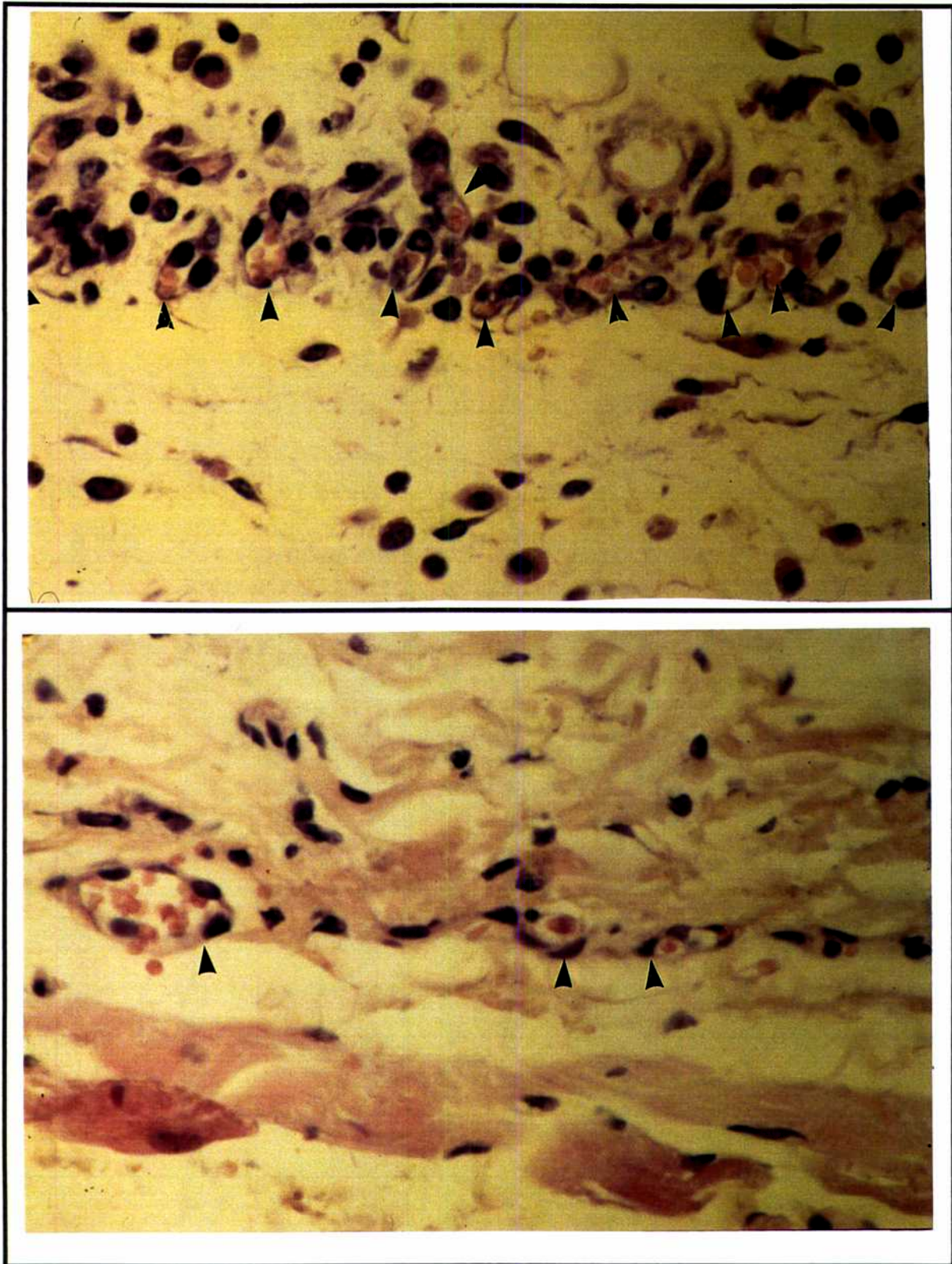


Figura 17. Inhibición de la angiogénesis en el segundo implante tumoral en ratones BALB/c portadores de un tumor primario MC-C mayor de 2000 mm³. Se inocularon s.c 12 ratones BALB/c con 10⁶ células del tumor MC-C. Luego de 24 días (volumen tumoral >2000 mm³) se realizó un segundo implante tumoral en el flanco opuesto. Los ratones del grupo control (n= 12) sólo recibieron este "segundo" implante. Se examinó el desarrollo del tumor secundario y paralelamente algunos ratones fueron sacrificados (días 5, 10 y 18) y la piel circundante al implante tumoral secundario fue observada bajo lupa (A= x 10), realizando un recuento de los vasos que drenaban el mismo. Se muestran las curvas de crecimiento del tumor secundario (a) y el número de vasos que drenan el tumor secundario observado bajo lupa (magnificación= x10) (b). Los símbolos llenos corresponden al grupo experimental (con tumor primario) y los vacíos al control (sin tumor primario). *:P<0.05, **: P<0.005 (test-Student)



Fotografía 10. Disminución en la densidad de vasos sanguíneos en el sitio del segundo implante tumoral MC-C inhibido por RC en ratones portadores de un tumor primario MC-C de más de 2000 mm³. Se inocularon ratones BALB/c normales (arriba) o portadores del tumor primario MC-C (abajo) con células MC-C en el flanco opuesto y 5 días después, los ratones fueron sacrificados y la piel del sitio del segundo implante tumoral fue fijada, procesada y teñida con Hematoxilina & Eosina (A= x 500).

Factores solubles antitumorales: estudio del efecto del suero de ratones BALB/c portadores de tumor sobre la proliferación *in vitro* de las células tumorales.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se había demostrado que los sueros de ratones portadores de tumores de inmunogenicidad no detectable ejercían una acción inhibitoria directa sobre la proliferación *in vitro* de las células tumorales, que era directamente proporcional a la intensidad de la RC *in vivo*. Esta actividad inhibitoria *in vitro* no involucra anticuerpos ni complemento sino factores de bajo peso molecular (73).

Para extender este estudio no sólo a otros tumores no inmunogénicos sino a tumores con distintos grados de inmunogenicidad, uno de los objetivos de esta Tesis fue estudiar cuál era el efecto de los sueros de ratones BALB/c portadores de los nueve tumores estudiados: L15, MC-D, MC-C, MNUMPA-1.1, MC-B, MNU-2.1, M3, C7HI y LB sobre la incorporación de (³H)timidina por las respectivas células tumorales en cultivo.

En la **Figura 18** se muestran los títulos de actividad inhibitoria de los sueros, expresados como el cociente entre las unidades inhibitorias₅₀ (UI₅₀) del suero tumoral y las UI₅₀ del suero normal, donde cada punto representa la media \pm ES de 2 a 12 experimentos por tumor.

Como podemos apreciar, se observó una acción inhibitoria de la incorporación de (³H)timidina *in vitro*, en el suero de los ratones portadores de todos los tumores de gran volumen estudiados, excepto el C7HI, que no genera RC.

En la **Tabla X** se muestran los datos (cuentas por minuto incorporadas por las células tumorales) de un experimento representativo realizado con el tumor MC-C y otro con el tumor LB.

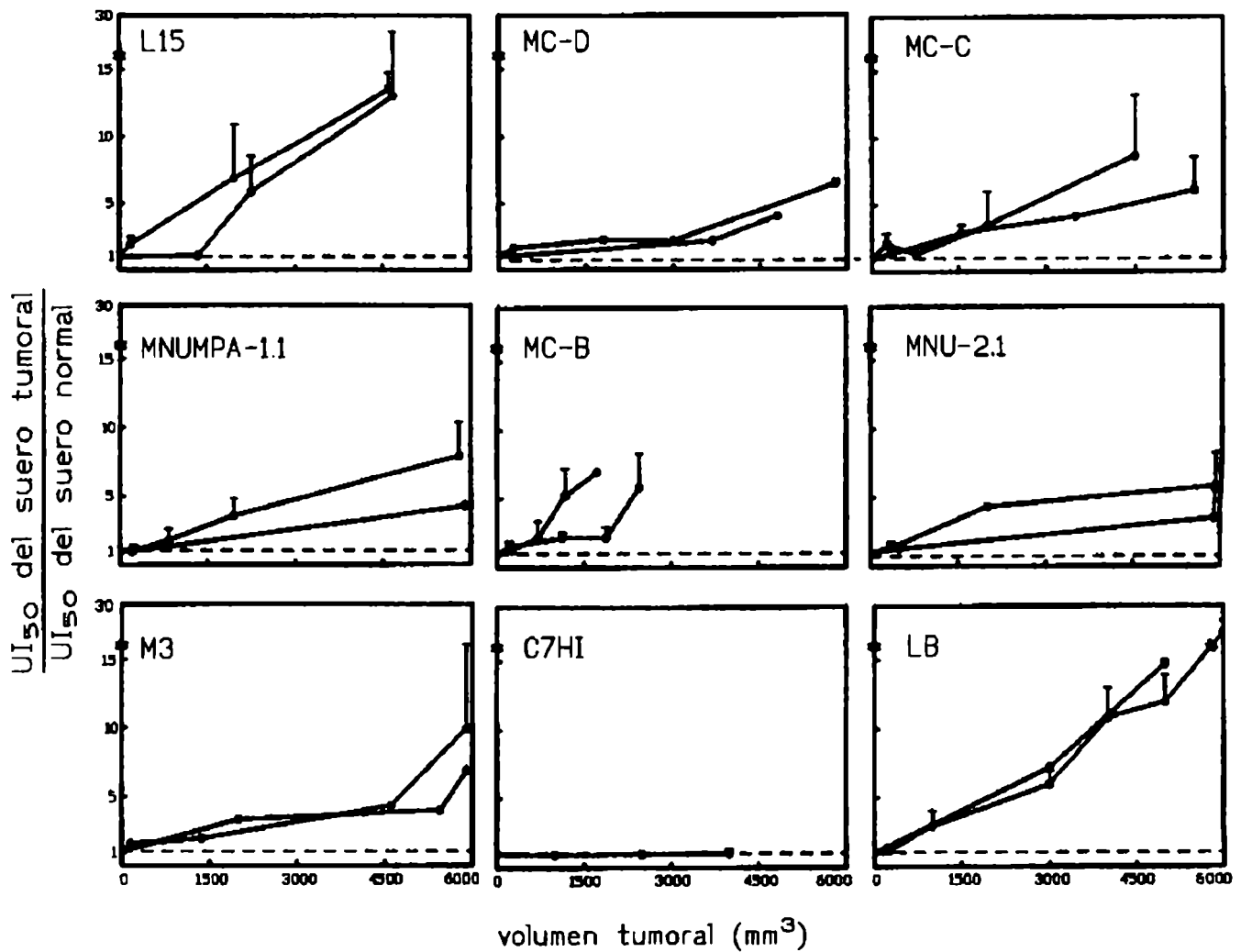


Figura 18. Actividad inhibitoria de la proliferación *in vitro* presente en el suero de ratones BALB/c, eutímicos (-●-) o nude (-○-) portadores de tumor. Se define el título de actividad inhibitoria como la recíproca de la dilución de suero que produce un 50% de inhibición de la incorporación de (3H)timidina con respecto a las células con medio de cultivo y expresado en "unidades inhibitorias del crecimiento 50 por ml" (UI_{50}/ml). La intensidad de la actividad inhibitoria es expresada como el cociente entre las UI_{50}/ml del suero tumoral y las UI_{50}/ml del suero normal. Cada punto representa la media \pm ES de 2-12 experimentos. Esta actividad inhibitoria fue significativa para los tumores L15 ($P < 0.01$, $n = 33$ ratones utilizados), MC-D ($P < 0.01$, $n = 24$), MC-C ($P < 0.05$, $n = 123$), MNUMPA-1.1 ($P < 0.05$, $n = 42$), MC-B ($P < 0.01$, $n = 168$), MNU-2.1 ($P < 0.01$, $n = 35$), M3 ($P < 0.01$, $n = 27$) y LB ($P < 0.001$, $n = 120$) (test t-Student, comparando con el efecto del suero normal). La actividad inhibitoria fue independiente de la presencia del tumor secundario. Los sueros de ratones BALB/c inmunizados contra el tumor MC-C o L15 exhibieron valores similares al suero normal.

Tabla X. a) Efecto del suero de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C, sobre la proliferación *in vitro* de las células MC-C.

(³H)timidina incorporada por las células MC-C (cpm ± ds)^a

<i>Dilución final de suero</i>	<i>Grupo 1^b</i>	<i>Grupo 2^c</i>	<i>Grupo 3^d</i>	<i>suero normal</i>
1/2	40 662 ± 1467*	31 937 ± 3678**	7 063 ± 1038***	60 879 ± 4 669
1/4	70 967 ± 5694	58 224 ± 898**	22 992 ± 579***	87 899 ± 9713
1/8	96 300 ± 14540	67 782 ± 12293*	41 756 ± 6375**	95 120 ± 11020
1/16	94 070 ± 11244	79 436 ± 10143	61 820 ± 6065*	102 803 ± 15872
UI ₅₀ /ml	32.4	51.5	159.3	20.4
Cociente	1.6	2.5	7.8	1

a: Cada valor es la media ± d.s. de mediciones hechas por triplicado (*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001; test t-Student entre las cpm obtenidas con cada suero de ratones portadores de MC-C y con suero normal)

b. Suero de ratones portadores de un tumor MC-C de 100-500 mm³.

c. Suero de ratones portadores de un tumor MC-C de 3000-3500 mm³.

d. Suero de ratones portadores de un tumor MC-C de 5000-5500 mm³.

cpm incorporadas por las células MC-C con medio de cultivo = 123 458 ± 10939.

b) Efecto del suero de ratones BALB/c portadores del tumor LB, sobre la proliferación *in vitro* de las células LB.

(³H)timidina incorporada por las células LB (cpm ± ds)^a

<i>Dilución final de suero</i>	<i>suero LB</i>	<i>suero normal</i>
1/2	300 ± 10 ***	9 418 ± 483
1/4	998 ± 115 ***	13 105 ± 1 697
1/8	2 186 ± 106 *	22 075 ± 6 442
1/16	2 523 ± 494 **	26 744 ± 1 153
1/32	5 975 ± 1 259 **	29 330 ± 7 126
1/64	8 542 ± 627 *	33 450 ± 4 012
UI ₅₀ /ml	> 640	65.5
Cociente	> 9.7	1

a: Cada valor es la media ± d.s. de mediciones hechas por triplicado o cuadruplicado. (*: P<0.01, **: P<0.005, *: P<0.001; test t-Student entre las cpm obtenidas con suero de ratones portadores de LB y con suero normal)**

b. Suero de ratones portadores de un tumor LB de 16 días (2000-3000 mm³) cpm incorporadas por las células LB con medio de cultivo = 38 940 ± 3 150

Caracterización funcional de la actividad inhibitoria sérica:

a) Correlación con el volumen tumoral: la actividad sérica inhibitoria fue directamente proporcional al volumen tumoral para todos los tumores ensayados (test de correlación de Spearman, $P < 0.05$).

b) Correlación con la intensidad del segundo pico de RC: Comparando a los tumores entre sí, se observó que la actividad sérica inhibitoria fue directamente proporcional a la intensidad del **segundo pico de RC** ($P < 0.02$, test de correlación de Spearman) (comparar **Figuras 2 y 18**). En efecto, los tumores que en las últimas etapas de su crecimiento generaban una fuerte RC fueron los que presentaron mayor actividad inhibitoria en el suero. Los ratones portadores del tumor LB generaron, en etapas avanzadas de su crecimiento, mayor RC que todos los tumores estudiados y a su vez mostraron la máxima capacidad inhibitoria en el suero. Recíprocamente, los ratones portadores del tumor C7HI no generaron el segundo pico de RC y correlativamente, no exhibieron actividad inhibitoria en el suero.

c) Ausencia de correlación con el grado de inmunidad antitumoral y con el pico de actividad de anticuerpos citotóxicos : La intensidad de esta actividad inhibitoria encontrada en el suero de ratones portadores de tumor no correlacionó con el grado de inmunogenicidad de cada tumor (ver Figura 18 y Tabla II), obteniéndose los máximos niveles de actividad inhibitoria para el tumor LB, el cual no exhibió inmunogenicidad detectable. Por otro lado, el suero de ratones inmunizados contra los tumor L15 o MC-C (pero no portadores de tumor) no exhibieron actividad inhibitoria *in vitro*, obteniéndose valores similares a los ratones normales. Por último, no se observó

correlación entre los niveles de actividad inhibitoria y el pico de actividad de anticuerpos citotóxicos (el cual, en los casos en que se presenta, por ejemplo en los portadores del tumor L15, lo hizo en las primeras etapas del crecimiento tumoral). Tomando como ejemplo al tumor LB se observó que la alta actividad inhibitoria de la incorporación de (³H)timidina presente en el suero contrastó con la ausencia de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento evaluada por ensayos de liberación de ⁵¹Cr en el mismo suero (ver Figuras 14 y 18).

d) Rol del timo: Se ensayó el efecto de los sueros de ratones genéticamente atímicos (*nude*) portadores de tumor sobre las células tumorales *in vitro*. Esto fue realizado para la totalidad de los nueve tumores estudiados: L15, MC-D, MC-C, MNUMPA-1.1, MC-B, MNU-2.1, M3, C7HI y LB. En todos los casos, la actividad inhibitoria del suero de ratones *nude* portadores de tumor fue similar a la observada en ratones eutímicos, sugiriendo que el timo no ejercería un rol importante sobre esta actividad (**Figura 18**).

e) Reversibilidad: Para determinar si el efecto inhibitorio de los sueros de portadores de tumor sobre la incorporación de (³H)timidina por las células tumorales *in vitro* era un fenómeno reversible, se realizaron ensayos en los cuales las células LB fueron incubadas con suero LB, suero normal o medio de cultivo por 18 hs, al cabo de lo cual fueron contadas, lavadas y luego de equilibrar sus concentraciones, cultivadas en presencia de medio de cultivo y (³H)timidina por otras 18 hs. Se observó que las células inhibidas recuperaron su capacidad de proliferar, tratándose entonces, de un fenómeno al menos parcialmente reversible (**Figura 19**).

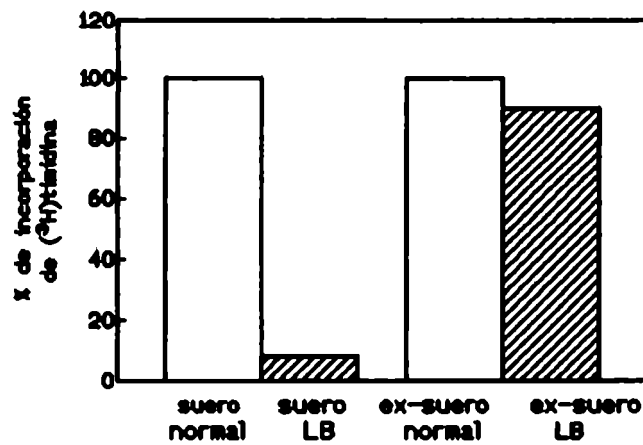


Figura 19. Reversibilidad de la actividad inhibitoria presente en el suero de ratones BALB/c portadores de LB. Se incubaron 2×10^5 células LB con una dilución 1:8 de: suero LB, suero normal o medio de cultivo. La mitad de los wells recibió ³H)timidina y la otra mitad no. Luego de 18 hs, las células fueron contadas, lavadas y luego de equilibrar sus concentraciones fueron cultivadas en presencia de medio de cultivo por otras 18 hs. (% de incorporación de ³H)timidina= cpm incorporadas con suero LB / cpm incorporadas con suero normal x 100). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

f) Transferencia de actividad inhibitoria y de la capacidad de restringir el crecimiento de un segundo implante tumoral mediante la unión en parabiosis:

En experiencias previas habíamos intentado transferir resistencia concomitante a un ratón normal por medio de la inoculación periódica por vía intraperitoneal o endovenosa de suero proveniente de un ratón portador de tumor (73). Sin embargo, no se logró transferirla, probablemente por la rápida metabolización y/o degradación de los factores que median esta actividad inhibitoria o por el rápido reclutamiento de dichos factores por parte de receptores presentes en el organismo.

En este trabajo se estudió la transferencia de resistencia concomitante desde un ratón portador del tumor MC-C o LB a un ratón normal, utilizando la técnica de **unión en parabiosis**.

Como podemos observar en la **Tabla XII**, los ratones normales que fueron unidos en parabiosis a ratones portadores de un tumor MC-C o LB de 2000-2500 mm³ fueron capaces de inhibir significativamente el crecimiento de un implante tumoral MC-C o LB respectivamente.

Esta transferencia de la capacidad de inhibir un tumor secundario correlacionó con la aparición de actividad inhibitoria (medida *in vitro*) en el suero del ratón "normal" de la pareja, cuyo título creció de 38.5 ± 1.4 UI₅₀/ml a 83.4 ± 13.6 UI₅₀/ml (P<0.05) para el tumor MC-C y de 45.2 ± 5.1 a 315.6 ± 21.8 UI₅₀/ml (P<0.001) para el tumor LB.

Por otra parte, cuando los miembros de las parejas se separaron, el tumor que permanecía inhibido comenzó a crecer, paralelamente con la desaparición de la actividad inhibitoria en el suero de ese ratón.

Tabla XII. Transferencia de RC contra el tumor MC-C o LB por unión en parabiosis de un ratón normal con un portador de un tumor primario MC-C o LB.

<i>Parejas de ratones</i>	<i>Incidencia de tomas del tumor secundario</i>
Portador de tumor MC-C + normal	2:8*
Normal + normal	8:9
Portador de LB + normal	0:5*
Normal + normal	5:5

***: $P < 0.05$ (test de X^2). Ratones portadores de un tumor MC-C o LB en el flanco derecho, se unieron quirúrgicamente a nivel del peritoneo y de la piel, con ratones normales. El grupo control estuvo formado por parejas de ratones, ambos normales, unidos en parabiosis, de modo de imitar el trauma quirúrgico. Para evaluar si se transfería RC desde el ratón portador de tumor al ratón normal, se llevó a cabo luego de 10 días de establecida la unión (cuando el tumor tenía un volumen de 2000-2500 mm³) un inóculo de células MC-C (5×10^5) o LB (5×10^4) en el ratón "normal" de cada pareja (en el flanco izquierdo) y se evaluó su crecimiento.**

Todas estas observaciones establecen por un lado una fuerte correlación entre la actividad inhibitoria in vitro presente en el suero de ratones portadores de un tumor de gran volumen y la RC observada in vivo, y por otro lado muestran importantes analogías entre los tumores inmunogénicos (como el MC-C) y los de inmunogenicidad no detectable (como el LB) cuando éstos alcanzan determinado volumen (segundo pico de RC). Por otro lado muestran que un individuo no portador de tumor y que no presenta los signos de enfermedad (caquexia, etc) propios del cáncer, puede exhibir una actividad inhibitoria antitumoral en el suero, que por lo tanto sería separable de los factores que se asocian con el deterioro de un organismo afectado por un cáncer avanzado.

g) Efecto de la extirpación del tumor primario sobre la actividad sérica inhibitoria.

En este punto, estudiamos si la actividad inhibitoria sérica presente en ratones portadores del tumor MC-C o LB dependía de la presencia-en estos mismos ratones- del tumor en crecimiento. Como podemos observar en la **Figura 20**, la actividad inhibitoria presente en el suero de ratones portadores de MC-C se conservó aún 5 días después de haber sido extirpado el tumor, para luego decaer alcanzando valores comparables a los ratones controles. Esta disminución de la actividad sérica inhibitoria *in vitro* fue acompañada por una caída de la RC generada por el tumor MC-C. En efecto, los ratones ex-portadores del tumor MC-C mostraron una disminución de su capacidad de inhibir un segundo implante de células MC-C, realizado 7 días luego de la extirpación.

Cuando este mismo experimento se llevó a cabo con el tumor **LB**, se observó una caída más brusca de la actividad inhibitoria al extirpar el tumor primario, partiendo de valores de 223.2 ± 59.2 UI₅₀/ml (7 veces mayor que el suero normal) y alcanzando valores similares a los del suero normal (32.1 ± 5.6 UI₅₀/ml) a las 48 hs luego de la extirpación tumoral (n=3 experimentos).

Por lo tanto, la actividad inhibitoria exhibida en el suero de ratones portadores del tumor MC-C o LB de gran volumen, requiere de la presencia del tumor primario.

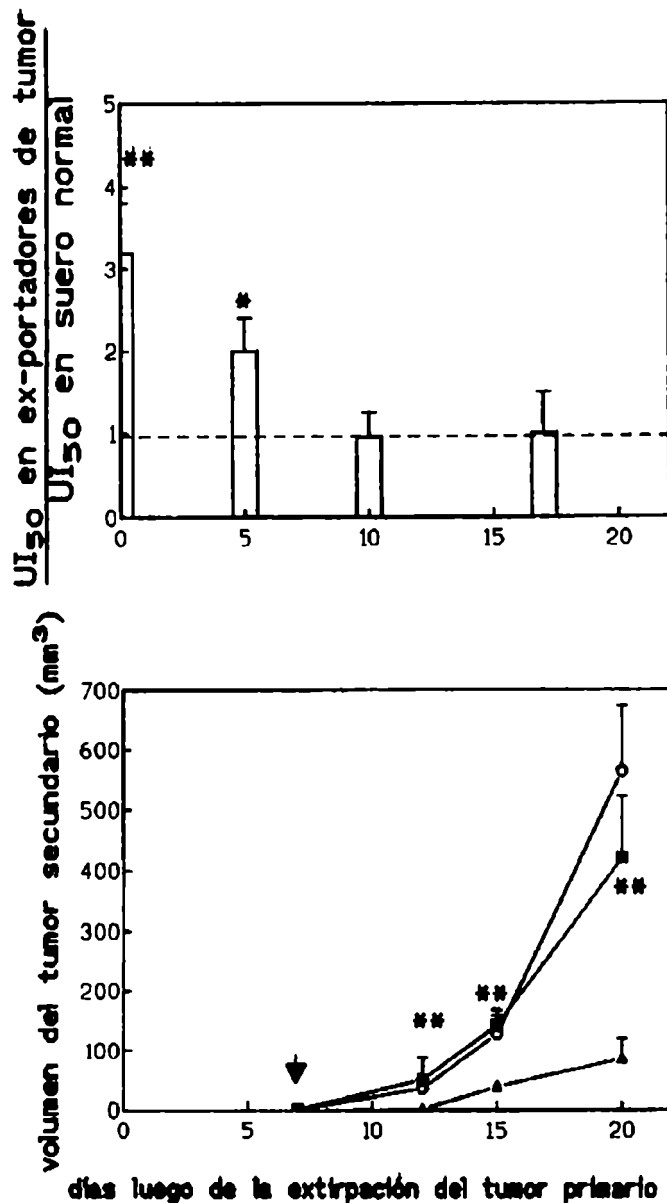


Figura 20. Caída de la actividad inhibitoria sérica y abolición de la capacidad de generar RC, al extirpar el tumor primario. Se inoculó el tumor MC-C en 12 ratones y luego de 30d (volumen tumoral= 2500-4000 mm³), se los dividió en dos grupos: al primero (n=6) se le extirpó el tumor y al segundo (n=6) se lo dejó intacto. El grupo control estuvo constituido por ratones normales que sufrieron una imitación de la operación (SHAM) (n=7). **Gráfico superior:** La actividad inhibitoria sérica fue medida sobre las células MC-C *in vitro* cuando el tumor estaba todavía presente (día 0) y a los 5, 10 y 17d posteriores a la extirpación del tumor. Línea punteada: suero normal. Cada barra representa la media \pm ES de 6 determinaciones. **Gráfico inferior:** Crecimiento de un segundo implante tumoral MC-C realizado 7 días después de la extirpación tumoral (flecha) (5×10^5 células).

■ : ratones a los que se les extirpó el tumor primario, ▲ : ratones portadores del tumor primario, ○ : ratones controles. * : P<0.05; ** : P<0.001 (test t-Student)

Efecto de los sobrenadantes de cultivo de las células tumorales: Se estudió el efecto de los sobrenadantes de cultivos de células MC-C sobre la proliferación *in vitro* de estas células. Para ello, nos propusimos establecer cultivos primarios de células tumorales y una vez alcanzada la etapa de subconfluencia, recolectar sobrenadantes de los mismos y determinar la presencia de actividad inhibitoria antitumoral.

En el caso del tumor MC-C, se utilizaron como control, sobrenadantes obtenidos en iguales condiciones pero provenientes de cultivos de fibroblastos normales embrionarios. Los experimentos realizados muestran una disminución significativa de la incorporación de (³H)timidina en presencia de sobrenadantes de células MC-C (Tabla XI). Esta actividad inhibitoria recuperada en el sobrenadante desapareció a las 48 hs de cultivo.

En el caso del tumor LB, no se lograron las condiciones de cultivo óptimas para obtener un estado proliferativo a tiempos prolongados, por lo cual ésto no pudo ser testeado adecuadamente.

Tabla XI. Efecto de los sobrenadantes de cultivo de células MC-C, sobre la incorporación de (³H)timidina por las células MC-C.

<i>cpm (media ± d.s.)</i>		
<i>Fuente de sobrenadante</i>	<i>Sobrenadante de 24hs</i>	<i>Medio de cultivo</i>
MC-C	71833 ± 7043*	
fibroblastos normales	93988 ± 1450	98277 ± 3293

Las células MC-C fueron cultivadas en presencia de sobrenadantes obtenidos de cultivos de MC-C o fibroblastos normales o en presencia de medio de cultivo y su proliferación fue determinada por sextuplicado mediante un ensayo de incorporación de (³H)timidina. Se muestra la media ± d.s. de 3 experimentos realizados. *: P<0.05 (test t-Student, realizado entre el efecto del sobrenadante del tumor MC-C y el sobrenadante de fibroblastos normales).

h) Mecanismos a nivel de la célula tumoral, de la actividad inhibitoria presente en el suero de portadores de tumor

Nos propusimos determinar los eventos a nivel de la célula tumoral, asociados a la acción de los factores inhibitorios *in vitro* presentes en el suero de ratones portadores de tumor, teniendo en cuenta los efectos que se habían observado *in vivo* asociados al segundo pico de RC. Estudiamos el rol de la apoptosis y la distribución en el ciclo celular asociadas a la inhibición de las células del tumor LB tratadas con suero de ratones BALB/c portadores de este tumor.

Estudio de la inducción de apoptosis mediante citofluorometría de flujo y mediante microscopía de fluorescencia.

Las células del tumor LB, extraídas de un tumor creciendo en forma ascítica, fueron incubadas durante 7 horas con distintas concentraciones de suero LB o suero normal, previamente deplementados. Luego se realizó la tinción del DNA con yoduro de propidio y, mediante técnicas de citofluorometría de flujo, se llevó a cabo el análisis de la población representada en un pico con contenido **hipodiploide** de DNA (sub-G₀) o apoptótica. Correlacionando con lo observado en el modelo *in vivo*, las células LB cultivadas *in vitro* con distintas diluciones de suero LB mostraron un marcado crecimiento en la población apoptótica con respecto a las mismas células tratadas con suero normal, como se aprecia en la **Tabla XIV** y **Figura 21**.

Tabla XIV. Apoptosis en células LB incubadas *in vitro* con distintas diluciones de suero LB o suero normal.

Suero	Dilución	% de células con contenido hipodiploide de DNA (apoptóticas)
Suero LB	1:2	25.49 ± 5.49*
	1:4	21.60 ± 5.31*
	1:8	22.03 ± 8.13*
	1:16	6.22 ± 1.12
	1:32	7.12 ± 2.09
Suero normal	1:2	11.14 ± 2.64
	1:4	11.13 ± 2.32
	1:8	11.74 ± 3.22
	1:16	5.84 ± 1.04
	1:32	4.14 ± 0.83

Se muestra la media ± ES de 12 experimentos. Las células LB fueron incubadas *in vitro* con distintas diluciones de suero LB o suero normal en un ensayo de 7 horas y marcadas con yoduro de propidio. Las células incubadas con medio de cultivo presentaron un 5.98 ± 2.57 % de apoptosis. (*: P<0.01; test t-Student comparando suero LB con suero normal).

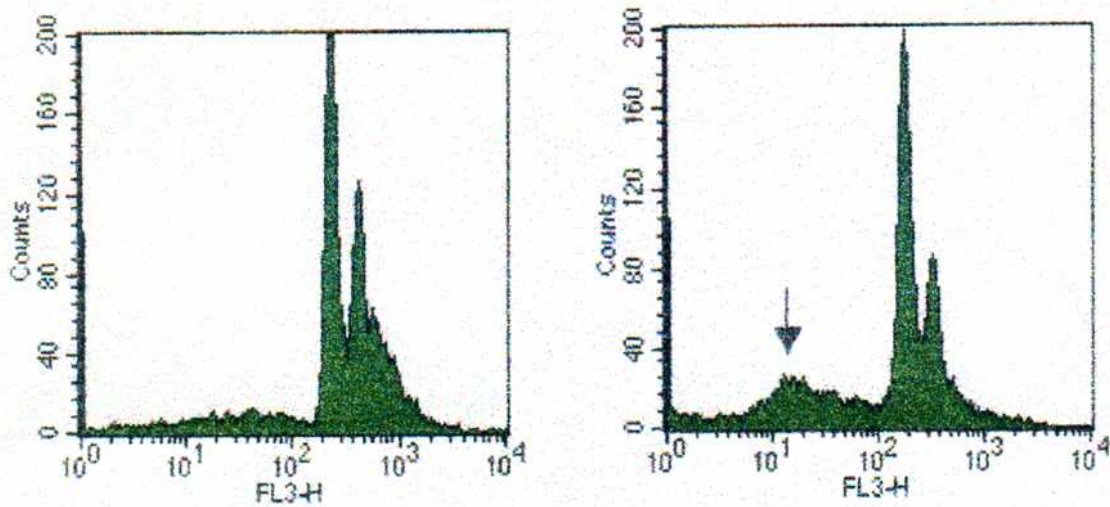
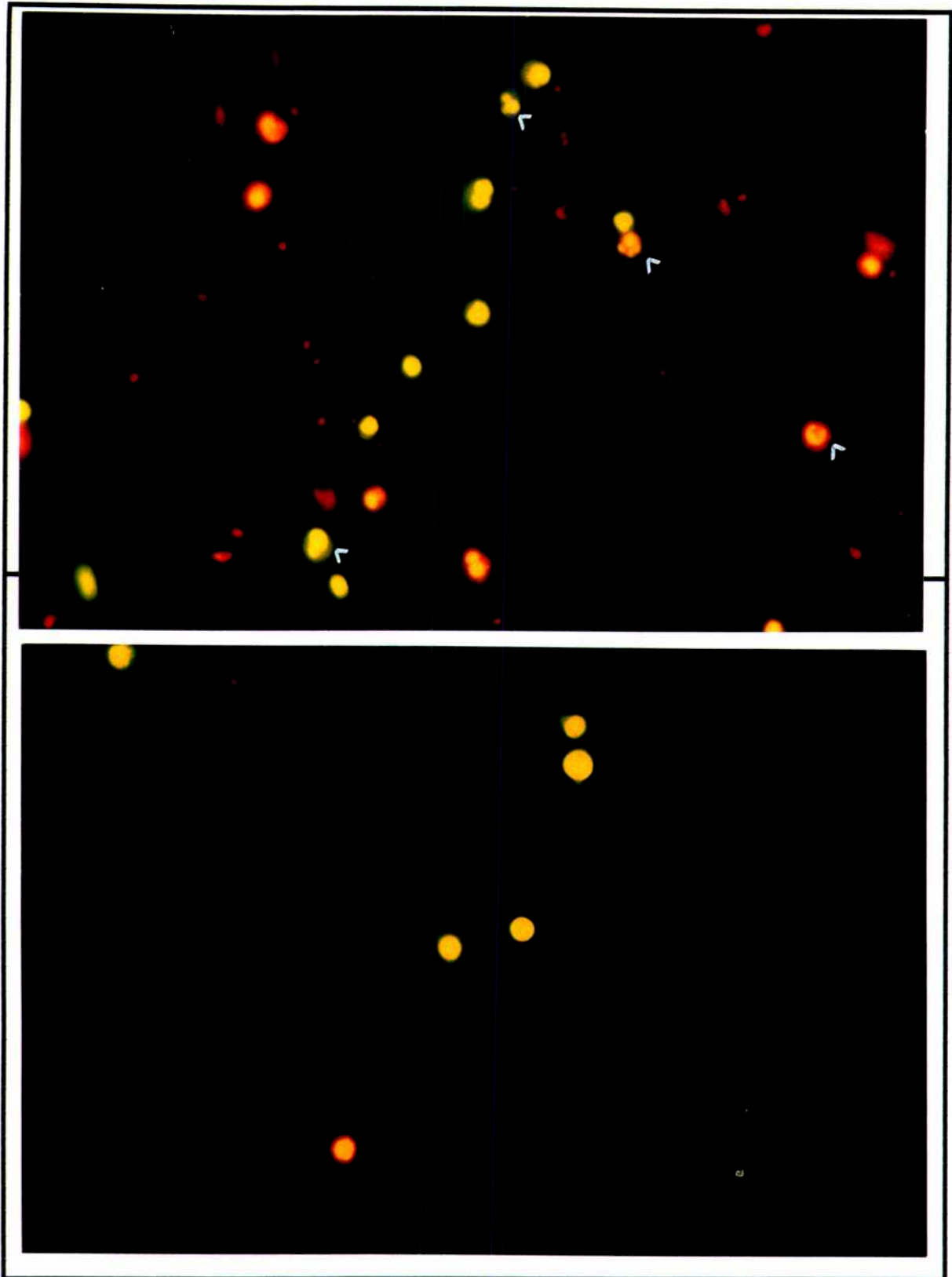


Figura 21. Apoptosis en células LB incubadas *in vitro* con suero de ratones BALB/c controles (izquierda) o portadores de LB (derecha) y analizadas mediante técnicas citofluorométricas. Se muestran los histogramas de FL3-H, que indica el contenido de DNA, correspondientes a un experimento representativo. Obsérvese el pico con contenido hipodiploide de DNA (izquierda del diagrama). Dilución de suero: 1/8.

La inducción de apoptosis por tratamiento de las células LB con suero de portadores de este tumor fue confirmada cualitativamente mediante visualización de las mismas por microscopía de fluorescencia luego de teñirlas con naranja de acridina-bromuro de etidio, observándose la condensación de la cromatina y la aparición de cuerpos apoptóticos (**Fotografía 11**).



Fotografía 11. Inducción de apoptosis en células LB tratadas con suero LB. Las células fueron incubadas *in vitro* con suero LB (arriba) o suero normal (abajo) durante 7 hs. Las células se tiñeron con [naranja de acridina-bromuro de etidio] y se visualizaron bajo microscopio de fluorescencia, observándose la cromatina condensada y núcleos fragmentados en las células tratadas con suero LB (flechas).

Efectos del suero LB sobre la distribución en el ciclo celular de las células LB:

Se evaluó si el suero de ratones portadores del tumor LB era capaz de generar *in vitro* alteraciones en la distribución en el ciclo celular de las células LB. En este sentido, se observó una redistribución de las células LB en las distintas fases del ciclo celular, caracterizada por un incremento en la fracción de células en fase S y una disminución en el porcentaje de células en las fases G₂M y G₀-G₁ con respecto a las células incubadas con iguales diluciones de suero normal. Los cambios observados se muestran en la **Tabla XV** y **Figura 22**. Alteraciones citocinéticas similares habían sido encontradas en los experimentos *in vivo*, en el tumor secundario LB inhibido por RC.

Tabla XV. Alteraciones en la distribución en el ciclo celular en las células LB incubadas *in vitro* con distintas diluciones de suero LB o suero normal.

Suero	Dilución	Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular		
		G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Suero LB	1:2	65.57 ± 3.64*	30.16 ± 4.07*	5.46 ± 1.63*
	1:4	63.97 ± 3.73	28.93 ± 4.41*	7.33 ± 1.73*
	1:8	60.74 ± 4.45	32.76 ± 4.40*	5.56 ± 1.77
suero normal	1:2	68.22 ± 3.16	24.30 ± 3.74	9.41 ± 1.69
	1:4	66.35 ± 2.77	22.67 ± 2.30	10.99 ± 1.16
	1:8	71.06 ± 5.06	22.90 ± 5.57	6.63 ± 1.43
Medio de cultivo (RPMI)		70.29 ± 2.38	20.69 ± 1.99	9.18 ± 1.27

Los valores se expresan como promedios ± ES correspondientes a 9 experimentos. Las células del tumor LB fueron incubadas *in vitro* con diferentes diluciones de suero LB o suero normal en un ensayo de 7 horas y marcadas con yoduro de propidio. Se comparan los valores obtenidos para el suero LB con respecto al suero normal mediante el test t-Student apareando experimento por experimento (*:P<0.05). Los porcentajes de células en cada fase fueron calculados en base a los histogramas de FL2-área utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson).

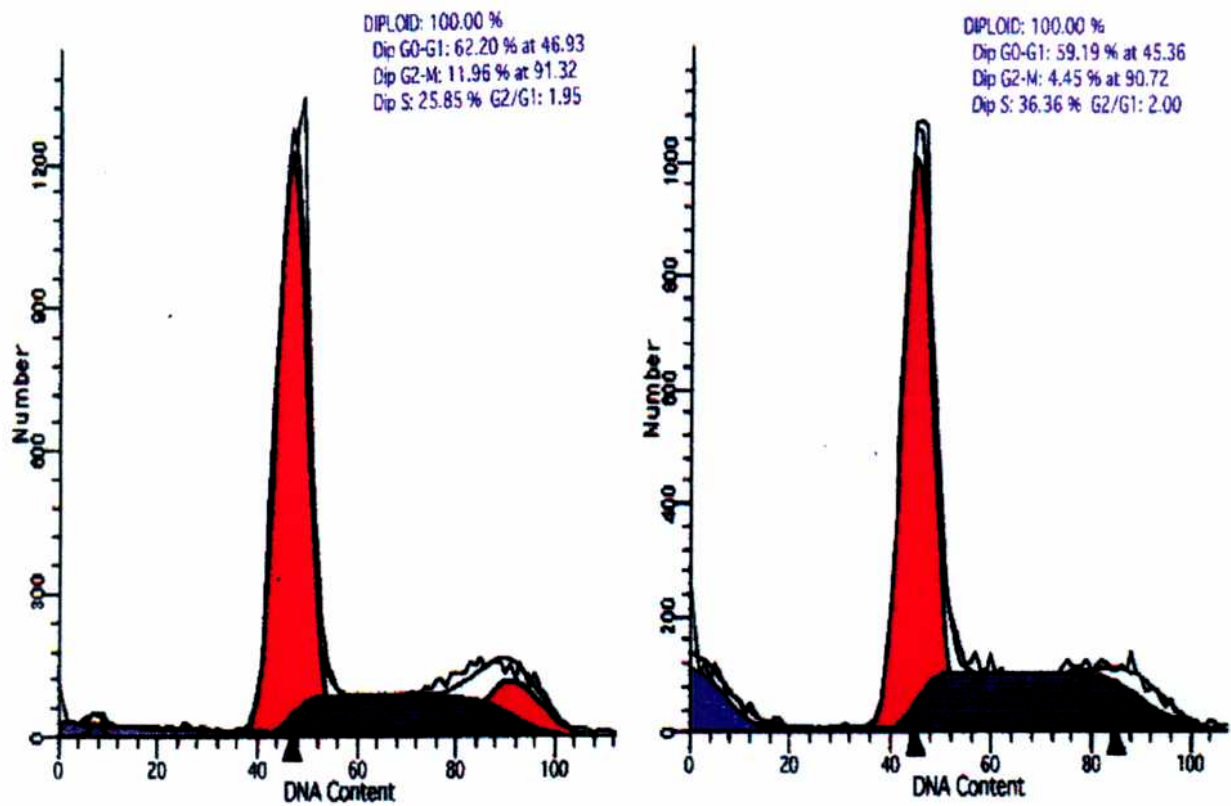


Figura 22. Perfil de fluorescencia en base al contenido de DNA de las células tumorales LB tratadas *in vitro* con suero de ratones BALB/c normales (izquierda) o portadores del tumor LB (derecha). Las poblaciones de células en cada fase del ciclo celular fueron identificadas en base a su contenido de DNA (FL2-A) utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson. Se muestra un experimento representativo (media \pm ds; *:P<0.05. test t-Student) (dilución de suero: 1:4).

Inespecificidad : Se estudió si el efecto inhibitorio de los sueros de portadores de tumor era un fenómeno específico. Los sueros de ratones portadores de un tumor MC-C >2000 mm³ fueron capaces de inhibir no sólo a las células MC-C sino también a las células de un tumor no relacionado, el tumor LB. El título de actividad inhibitoria del suero MC-C fue: a) sobre células MC-C= 202.9 ± 12.1 UI₅₀/ml (media \pm ES de 3 experimentos), que fue 4.4 veces mayor que el título del suero normal ($P < 0.01$) y b) sobre células LB= 161.7 ± 33.7 UI₅₀/ml (media \pm ES de 3 experimentos) que fue 3.1 veces mayor que el título del suero normal ($P < 0.05$). Un grado de inespecificidad análogo se había observado *in vivo*: como se describió en secciones anteriores, ratones portadores de un tumor primario MC-C grande fueron capaces de inhibir el crecimiento de un tumor secundario LB (ver **Tabla IV b**).

Recíprocamente, la acción inhibitoria del suero LB también resultó ser inespecífica ya que se manifestó no sólo contra las células LB sino también contra otras células tumorales, como por ejemplo el tumor C7HI (**Figura 23 a**).

Luego se estudió el efecto del suero LB sobre algunos tipos de células normales, observándose un efecto inhibitorio sobre células de endotelio vascular humanas (HUVEC), sobre fibroblastos murinos embrionarios, sobre timocitos murinos normales y sobre linfocitos murinos normales provenientes de ganglio cuando éstos eran previamente estimulados con concanavalina A (Con A), aunque el efecto observado sobre todos ellos fue menor que sobre las propias células LB (**Figura 23 a**).

Asimismo, la capacidad del suero LB de inducir apoptosis se manifestó sobre células del tumor C7HI y sobre timocitos normales murinos, aunque siempre con menor intensidad que sobre las propias células LB, no observándose niveles significativos en los linfocitos provenientes de ganglio (**Figura 23 b**).

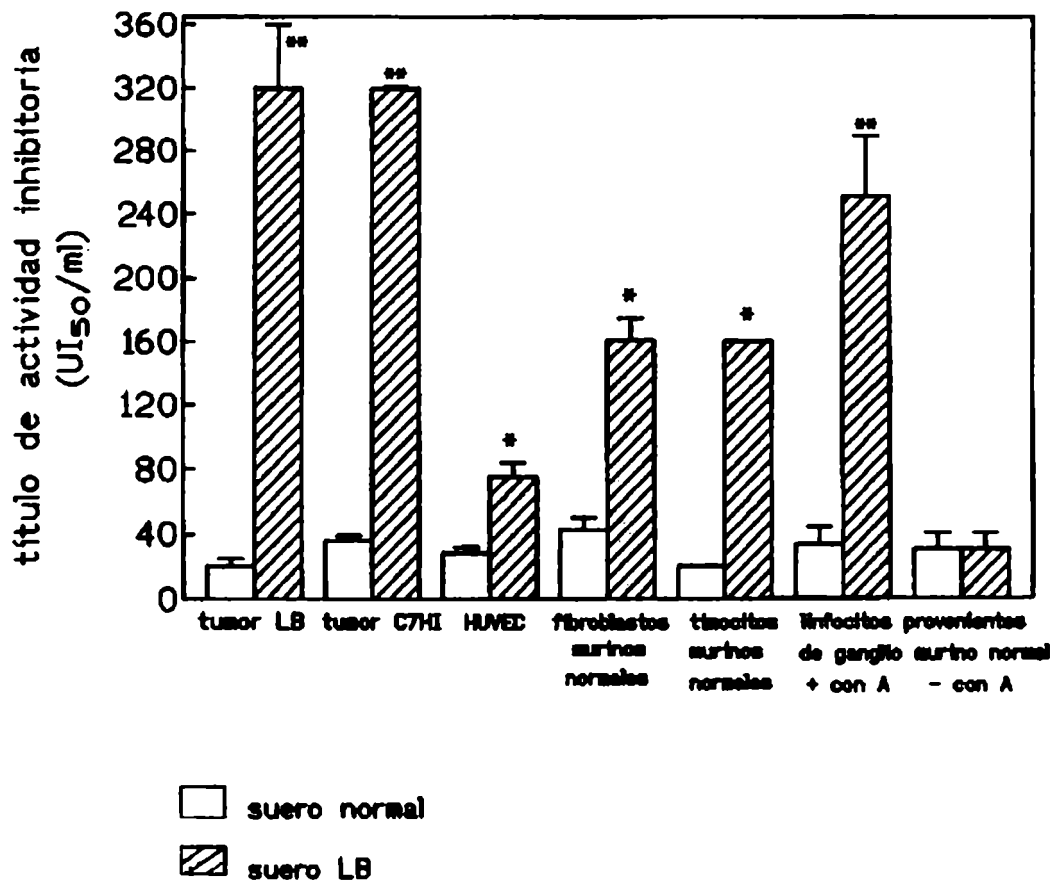
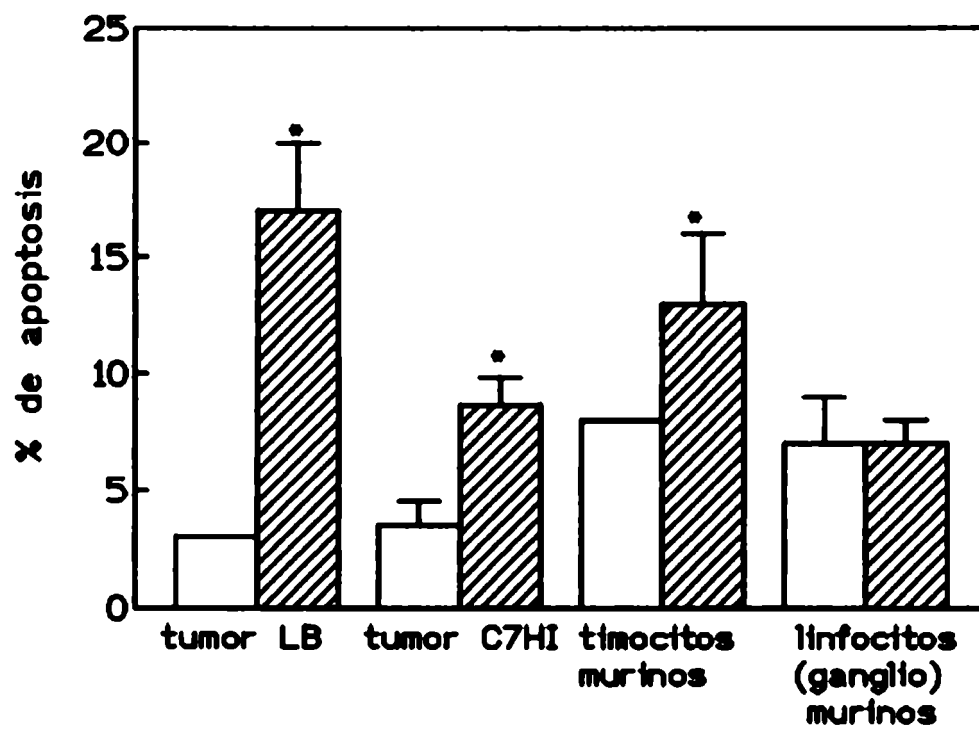


Figura 23. Inespecificidad de la actividad inhibitoria ejercida por el suero de ratones portadores del tumor LB.

a) El ensayo de incorporación de (³H)timidna se realizó sobre células tumorales LB (n=4 experimentos) y C7HI (n=5) o sobre distintos tipos de células normales: células de endotelio vascular humano (HUVEC) (n=2), fibroblastos murinos embrionarios (n=2), timocitos murinos normales (n=3), linfocitos murinos normales extraídos de ganglio previamente estimulados (n=4) o no (n=3) con concanavalina A (Con A) 1 mg/ml durante 48 hs. (*: P<0.05; **:P<0.005 (test t-Student)).



b) Los % de apoptosis sobre células tumorales LB (n=4 experimentos) y C7HI (n= 2) o sobre timocitos normales (n=3) se calcularon mediante citofluorometría de flujo (*: $P > 0.05$, test t-Student). Se muestran los resultados correspondientes a la dilución 1/4.

Caracterización parcial de los factores séricos antitumorales asociados a la actividad antiproliferativa y de inducción de alteraciones en el ciclo celular y apoptosis.

Como primer paso para caracterizar estas actividades, nos preguntamos si factores antitumorales conocidos tales como el Factor de Necrosis Tumoral α , interferones, el óxido nítrico y los glucocorticoides jugaban un rol importante en la actividad inhibitoria *in vitro* encontrada en el suero de los ratones portadores de tumor.

a). Dosaje de algunos factores antitumorales conocidos.

Dosaje de Factor de Necrosis tumoral α (TNF α) en suero de ratones portadores del tumor MC-C o LB.

El estudio del TNF α nos pareció importante dada su acción antitumoral y su rol como inductor de apoptosis sobre las células tumorales. Se dosó TNF α en suero de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C o LB de gran volumen ($>2000 \text{ mm}^3$) utilizando un ensayo biológico de citotoxicidad sobre células de la línea L929. No se encontraron niveles detectables de actividad TNF α en el suero de ratones portadores del tumor MC-C ni LB de gran volumen, con niveles similares a los del suero normal y a los controles (medio de cultivo), estimándose una concentración $< 0.005 \text{ ng/ml}$, calculado mediante curva de calibración) (Figura 24). Si bien no se observó el efecto lítico característico de la acción del TNF α , se detectó cierto efecto citopático con

alteración en la forma celular en las células L929 por lo cual nos preguntamos si este último efecto tenía alguna relación con el TNF α . Estudiamos entonces el efecto de la preincubación de los sueros murinos con anticuerpos anti-TNF α sobre esta actividad. Los anticuerpos anti-TNF α no lograron revertir este efecto citopático. Por otro lado, y bajo la posibilidad de que existiera cierta actividad TNF α no detectable por este ensayo pero que sí se manifestara sobre las células LB, se probó si la actividad inductora de apoptosis podía ser revertida por el pretratamiento del suero LB con anticuerpos anti-TNF α . En este sentido, la preincubación con anticuerpos anti-TNF α no logró revertir la actividad apoptótica del suero LB (**Figura 24**).

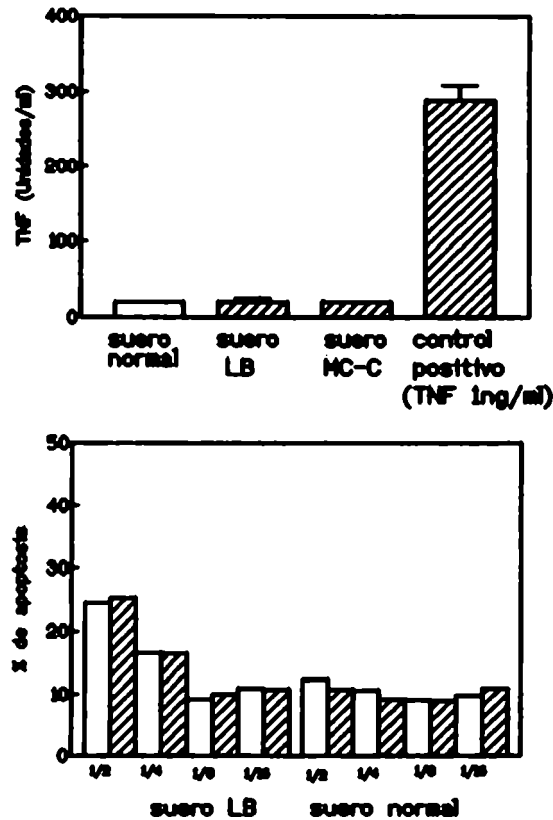


Figura 24. Dosaje de TNF α en suero de ratones BALB/c portadores de un tumor LB o MC-C >2000mm³ o normales y estudio de su rol en la capacidad de inducir apoptosis del suero LB. *Gráfico superior:* El dosaje de TNF α en suero de ratones portadores del tumor MC-C o LB se realizó mediante un ensayo biológico de citotoxicidad sobre las células L929, medido colorimétricamente (n=4 sueros por grupo). Se define una Unidad de actividad TNF α como la recíproca de la dilución de suero capaz de producir un 50% de lisis que el control (medio de cultivo). Se muestra la media \pm d.s.(n=4). Se realizó una curva de calibración, utilizando TNF α r en concentraciones desde 4 hasta 1000 pg/ml, en diluciones seriadas $\frac{1}{2}$, usada como control positivo del ensayo. *Gráfico inferior:* La capacidad de inducir apoptosis del suero LB sobre las células LB se estudió mediante tinción con yoduro de propidio y técnicas de citofluorometría de flujo, en presencia o ausencia de anticuerpos anti-TNF α (30° a 37°c). Se muestra un experimento representativo de tres realizados (barras vacías: sin anticuerpo; barras llenas: con anticuerpos anti- TNF α).

Dosaje de nitritos (NO₂⁻): Se dosó NO₂⁻ en el suero de ratones BALB/c portadores del tumor MC-C o LB (de más de 2000 mm³) por el método de la enzima nitrato reductasa. Los niveles de NO₂⁻ determinados en el suero de los ratones portadores de tumor no difirieron de los correspondientes a los ratones normales. En efecto, la concentración de NO₂⁻ estimada mediante curva de calibración fue de: 2.75 ± 1.5 μM, 5.37 ± 1.9 μM y 4.0 ± 1.7 μM para ratones portadores de LB, MC-C o normales respectivamente (media ± d.s.; n= 4 ratones por grupo).

Dosaje de corticosterona y rol de las glándulas adrenales: Se estudió el efecto de la adrenalectomía sobre la actividad inhibitoria presente en el suero de los ratones portadores de tumor y correlativamente, se determinaron los niveles de corticosterona en los mismos. La adrenalectomía no produjo alteraciones en los niveles de actividad inhibitoria presente en el suero de ratones portadores del tumor LB o MC-C, tanto en la actividad inhibitoria de la incorporación de (³H)timidina como en la capacidad de inducir apoptosis, no observándose correlación entre éstos y los niveles de corticosterona dosados por RIA (**Figura 25**).

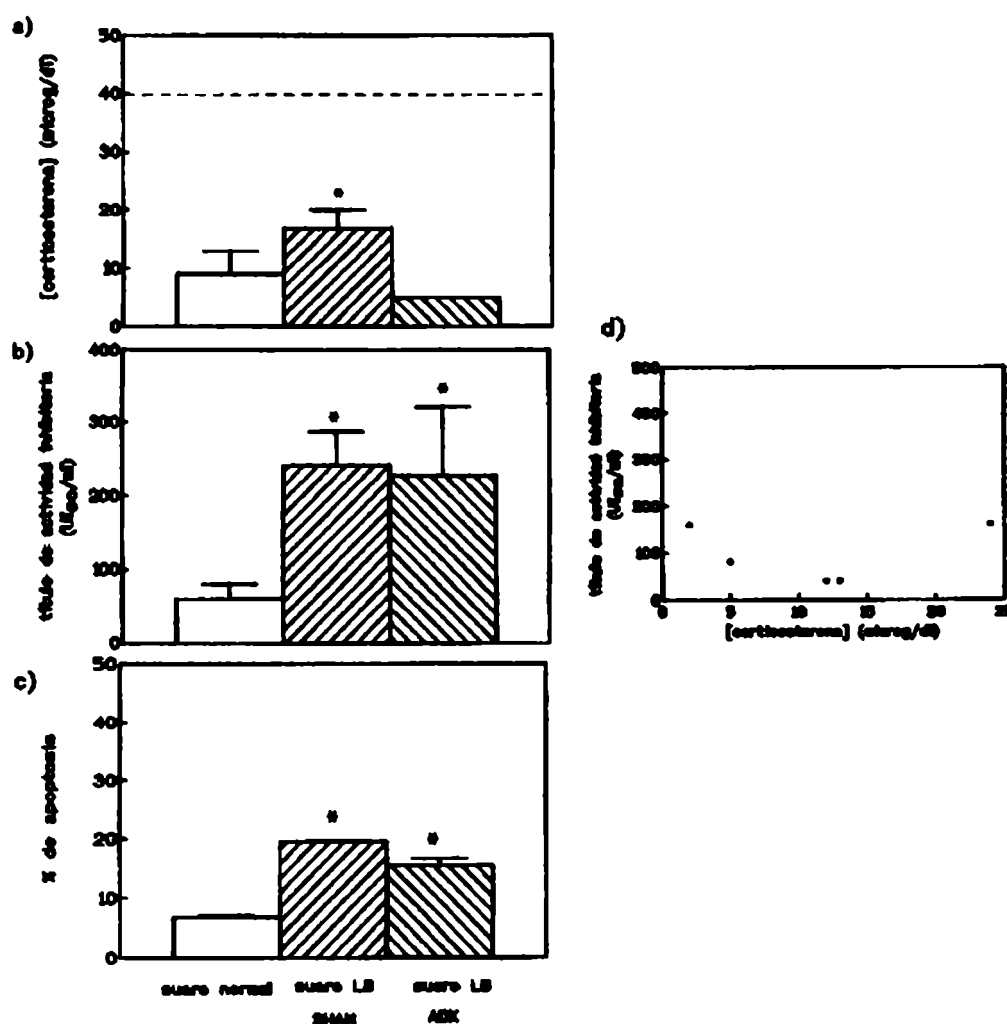


Figura 25. Dosaje de corticosterona y efecto de la adrenalectomía sobre la actividad inhibitoria presente en el suero de ratones portadores de tumor. Los ratones fueron adrenalectomizados o se les realizó una simulación de la operación (SHAM) y luego de 8 días recibieron un inóculo con 10^5 células LB. Se extrajo el suero luego de 15 días, cuando el tumor LB tenía 3000-4000 mm³ y se midió a) el nivel de corticosterona mediante radioinmunoensayo (RIA), b) la actividad inhibitoria sobre las células LB, mediante un ensayo de incorporación de (³H)timidina y c) el capacidad de inducir apoptosis sobre las células LB, mediante tinción con iodoro de propidio. No se observó correlación entre los niveles de actividad inhibitoria antitumoral y los niveles de corticosterona (d). Se muestran las medias \pm ES (n=4); *: P<0.05 (test t-Student), comparando con suero normal. -----: control positivo (suero de ratones BALB/c sometidos a condiciones de stress)

Posibles implicancias de la angiostatina y la endostatina en nuestro sistema: La angiostatina (38 kD) y la endostatina (20 kD) son dos polipéptidos endógenos aislados recientemente que tienen la capacidad de inhibir específicamente la proliferación de las células endoteliales (64,65). Asociada a esta capacidad, las dos moléculas poseen una potente actividad antiangiogénica y, administradas a ratones portadores de varios tumores (murinos y humanos) exhibieron una fuerte acción antitumoral (35,64,65).

En este trabajo nos interesó estudiar si la angiostatina y la endostatina participaban de alguna forma en nuestro sistema, si bien habíamos observado importantes diferencias entre la actividad inhibitoria que nosotros hallábamos en el suero de ratones portadores de tumor -la actividad que aquí describimos es capaz de inhibir *in vitro* en forma directa a las células tumorales- y la atribuída a esas moléculas, que no producen inhibición de la proliferación tumoral *in vitro*. Para ello, se ensayó el efecto de la fracción de alto peso molecular (> 12.5 kD) del suero de ratones portadores del tumor LB sobre la proliferación *in vitro* de células endoteliales (HUVEC), principales componentes de los vasos, no observándose efecto inhibitorio de la misma comparando con las provenientes de suero normal, sugiriendo que la angiostatina, la endostatina y/o otras moléculas séricas de alto peso molecular con actividad antiangiogénica) no estarían involucrada en forma directa en nuestro sistema (Figura 26)

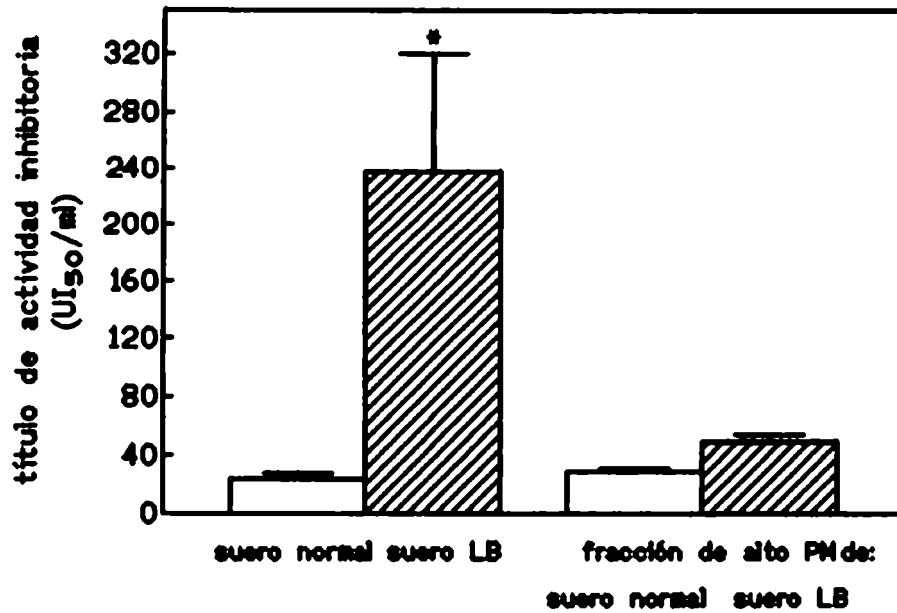


Figura 26. Efecto de los sueros de ratones portadores del tumor LB y normales y de las fracciones de alto peso molecular de los mismos, sobre la proliferación *in vitro* de células endoteliales HUVEC, medida por incorporación de (³H)timidina. *:P<0.005 (test t-Student), n= 2-4 determinaciones por grupo.

Estos resultados sugieren que factores conocidos tales como TNF α , glucocorticoides, óxido nítrico, angiostatina y endostatina no serían los efectores de la actividad antitumoral hallada en el suero de ratones portadores del tumor MC-C o LB.

b) Caracterización parcial de los factores presentes en el suero de ratones portadores de tumores inmunogénicos y no inmunogénicos, que median la actividad antitumoral *in vitro*.

En nuestro grupo de trabajo habíamos demostrado que el suero de ratones portadores del tumor no inmunogénico LB exhibía una acción inhibitoria de la proliferación *in vitro* de las células tumorales. Dicha actividad estaba mediada por factores de bajo peso molecular dado que era capaz de dializar a través de una membrana de 12 500 Daltons (D) de punto de corte. Asimismo, estudios de cromatografía en columnas de Sephadex G25 y G15, HPLC (“cromatografía líquida de alta performance”) y espectrometría de masa demostraron que se trataba un factor o factores con un peso molecular aproximado de 1000 D. Si bien su estructura definitiva no es conocida aún, estudios enzimáticos sugieren que podría tratarse de un péptido, aunque el análisis de composición aminoacídica sólo determinó la presencia de tirosina en niveles apreciables (140-141).

Uno de los objetivos de esta Tesis fue establecer si existían similitudes entre el tipo de actividad inhibitoria asociada a los tumores de inmunogenicidad no detectable y la correspondiente a los tumores inmunogénicos. Por otro lado, dado que describimos aquí nuevas actividades del suero tumoral sobre las células tumorales *in vitro* (inducción de alteraciones citocinéticas y apoptosis) nos propusimos determinar qué tipo de factores mediaban tales actividades.

En esta Tesis hemos llevado a cabo la caracterización parcial en paralelo de la actividad antiproliferativa e inductora de alteraciones en el ciclo celular y de apoptosis, hallada en el suero de ratones portadores de tumores de inmunogenicidad no detectable

(como es el caso del LB) e inmunogénicos (utilizando como modelo el tumor MC-C) de gran volumen. El estudio de las mismas mostró las siguientes características comunes:

Resistencia al calor: La actividad inhibitoria presente en el suero de ratones portadores del tumor MC-C o LB no fue alterada por el tratamiento a 56°C por 30 min.

Resistencia al congelamiento y descongelamiento: El suero no perdió actividad inhibitoria después de ser sometido a dos o tres rondas de congelación y descongelación.

Estabilidad a 4°C: La actividad inhibitoria no se vio alterada por almacenamiento del suero a 4°C durante al menos 3 días.

Diálisis y cromatografía en columnas de Sephadex G-15: Se sometió a diálisis al suero de ratones BALB/c portadores de un tumor MC-C o LB >2000 mm³ o normales, utilizando una membrana con un punto de corte de 12500 D. Luego de la diálisis, se midió la actividad inhibitoria en ambas fracciones (de bajo y de alto peso molecular) y se realizó una cromatografía en columna de Sephadex G-15 con las fracciones activas.

La actividad antitumoral *in vitro* del suero de portadores de tumor fue recuperada en la fracción dializable, indicando que estaría mediada por factor(es) de bajo peso molecular (<12500 D). Al analizar las fracciones de bajo peso molecular, encontramos que aquellas que exhibieron la máxima actividad antiproliferativa fueron a su vez las que presentaron los mayores niveles de actividad apoptótica e inductora de alteraciones en el ciclo celular. Por otro lado, al analizar la fracción de alto peso molecular, observamos que no hubo diferencias entre los sueros normales y tumorales, aunque los % de apoptosis inducidos por ambos fue alto, probablemente debido a artificios de la técnica. La actividad inhibitoria de la incorporación de (³H)timidina presente en el suero LB o MC-C fue recuperada en la columna cromatográfica en un

pico de alta actividad (fracciones 44 a 47), correspondientes a un PM de aproximadamente 1000 D, determinado por comparación con marcadores conocidos. Al analizar cada una de las fracciones recuperadas de la columna en cuanto a su capacidad de inducir alteraciones en el ciclo celular y apoptosis, se observó que las fracciones de mayor actividad antiproliferativa fueron las que presentaron mayores niveles de las otras actividades (**Tablas XV a XVII y Figura 28**).

Los resultados de esta primera caracterización sugieren que los factores séricos con acción antitumoral *in vitro* serían del mismo tipo, tanto para tumores inmunogénicos (el MC-C) como no inmunogénicos (el LB) y tendrían un peso molecular cercano a 1000 D. Por otro lado, estas mismas fracciones serían responsable de los distintos efectos observados: efecto antiproliferativo, alteraciones en el ciclo celular y apoptosis.

Tabla XV. Efecto de la diálisis sobre la actividad inhibitoria de la proliferación sobre las células tumorales *in vitro*, presente en el suero de ratones BALB/c portadores del tumor LB o MC-C de gran volumen.

Título de actividad inhibitoria de la incorporación de (³H)timidina (UI₅₀/ml) (media ± ES)

<i>Suero o fracción</i>	<i>Suero LB^a</i>	<i>Suero normal^a</i>	<i>Suero MC-C^b</i>	<i>Suero normal^b</i>
Completo	427.0 ± 62.9**	43.3 ± 7.00	176.89 ± 24.2*	48.8 ± 8.5
Dializado (alto PM)	<20	<20	<20	25.2 ± 8.5
Dializable (bajo PM)	259.4 ± 18.5**	23.2 ± 8.5	161.72 ± 18.2*	40.6 ± 17.8

La actividad antiproliferativa fue medida mediante el ensayo de incorporación de (³H)timidina. *: P<0.01; **:P<0.0001, test t-Student comparando con suero normal

n= 6 experimentos para el tumor LB y 3 experimentos para el tumor MC-C.

a: sobre células LB en cultivo;

b: sobre células MC-C en cultivo

Tabla XVI. Efecto de la diálisis sobre la actividad inductora de apoptosis presente en el suero de ratones BALB/c portadores del tumor LB o MC-C de gran volumen.

**% de células en apoptosis (media \pm ES)
(n= 3 experimentos)**

<i>Dilución</i>	<i>Suero LB</i>			<i>Suero Normal</i>		
	1:2	1:4	1:8	1:2	1:4	1:8
Completo	33.05\pm5.41 **	36.48 \pm 8.76 *	28.92 \pm 7.46 *	16.61 \pm 5.51	15.9 \pm 5.35	15.72 \pm 5.49
Dializado (alto PM)	30.87 \pm 11.04	29.62 \pm 10.53	31.35 \pm 7.07	25.23 \pm 2.18	27.19 \pm 2.61	25.87 \pm 2.83
Dializable (bajo PM)	51.73 \pm 13.17 **	46.04 \pm 8.05 *	34.78 \pm 1.63	20.39 \pm 3.41	18.16 \pm 9.61	27.7 \pm 5.09

(células con medio de cultivo= 12.08 \pm 3.61% de apoptosis)

Las células del tumor LB fueron incubadas *in vitro* con las fracciones obtenidas de diálisis del suero LB o suero normal, en un ensayo de 7 horas y teñidas con yoduro de propidio. Las células en apoptosis se identifican por su contenido hipodiploide de DNA. Se utilizó software apropiado (CellQuest, Becton Dickinson).

** : P<0.005; * : P<0.05 (test t de Student apareado, comparando el número de células en apoptosis en las fracciones de suero LB y suero normal)

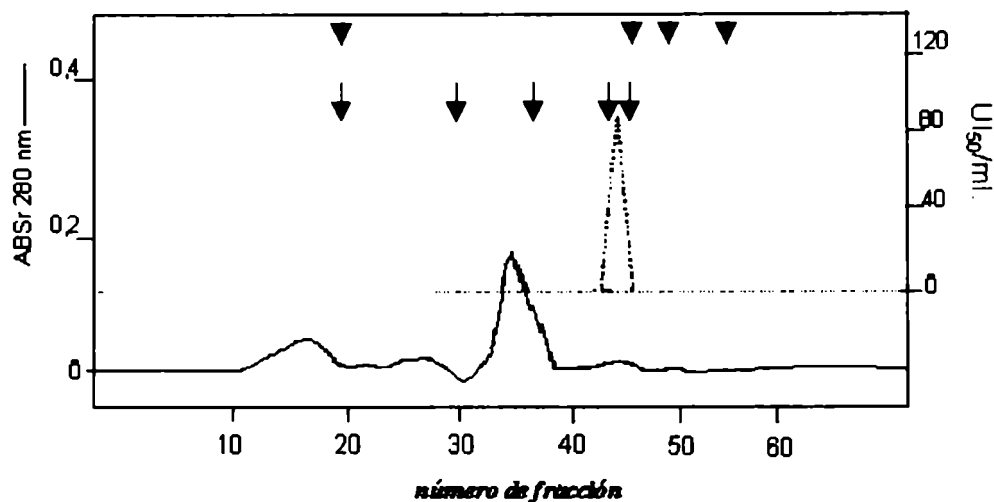


Figura 28. Perfil de elución de una columna de Sephadex G-15 sembrada con suero de ratones portadores del tumor LB de 2000 a 4000 mm³. Se muestra un perfil de elución característico de una columna cromatográfica Sephadex G-15 sembrada con el producto liofilizado de la fracción dializable obtenida a partir del suero LB. Se grafica en el eje de las ordenadas de la izquierda, la absorbancia medida a 280 nm y en el eje de las ordenadas de la derecha, la intensidad de la actividad inhibitoria antitumoral evaluada mediante incorporación de (³H)timidna por las células LB y expresada en UI₅₀/ml.

▼ :: marcadores de peso molecular; ↓ : fracciones que serán utilizadas en la tabla siguiente.

Tabla XVII. Actividad inductora de apoptosis y de alteraciones en el ciclo celular de las mismas fracciones obtenidas en la cromatografía en columna Sephadex G-15 graficada en la figura anterior.

% de células en cada fase del ciclo celular

Número de Fracción	G₀-G₁	S	G₂-M	% de células en apoptosis
19-20	65.1	26.2	8.9	10.0
28-29	66.2	23.0	10.8	10.2
33-34	67.8	22.3	9.8	11.0
44-45 ^a	55.5	38.4	8.1	33.0
46-47 ^a	49.0	43.2	7.8	32.0
Medio de cultivo	68.3	21.5	12.1	4

Las células del tumor LB fueron incubadas *in vitro* con las fracciones obtenidas de la columna G-15 a partir de la fracción dializable del suero LB, en un ensayo de 7 horas y teñidas con Ioduro de Propidio. Los porcentajes de células en cada fase fueron calculados en base a los histogramas de FL2-A utilizando software apropiado (ModFit LT, Becton Dickinson). Se muestra la media de cada grupo correspondiente a un experimento representativo. Los d.s. fueron en todos los casos $\leq 12\%$ de la media.

a: fracciones que habían exhibido actividad inhibitoria en el ensayo de incorporación de (³H)timidina.

Curso temporal de los distintos efectos exhibidos por fracciones de bajo peso molecular del suero LB sobre las células LB *in vitro*

Nos propusimos describir cómo se relacionaban las distintas actividades exhibidas por los factores séricos de bajo peso molecular presentes en el suero LB *in vitro* -inhibición de la incorporación de (³H)timidina, inducción de alteraciones en la distribución en el ciclo celular e inducción de apoptosis-. Para ello, se estudió la cinética de cada una de ellas en el tiempo, midiendo cada una de ellas antes (tiempo 0) o 2 y 5 hs después de incubar las células LB con la fracción de bajo peso molecular (obtenida por diálisis) de suero LB o suero normal.

El patrón observado fue el siguiente (**Figura 29**):

a) durante las primeras 2 horas, se observó una drástica disminución de la incorporación de (³H)timidina; tal inhibición no sería consecuencia de la muerte por apoptosis ya que no se exhibieron niveles significativos de la misma en este período.

b) entre las 2 y 5 horas de incubación, se observaron cambios en la distribución en el ciclo celular, con un aumento de la fase S y disminución de las fases G₀-G₁ y G₂-M. Dichas alteraciones estuvieron acompañadas de la inducción de apoptosis.

Estos resultados sugieren que las células LB sufren un temprano detenimiento de su proliferación o "arresto" evidenciado por una menor incorporación de nucleótidos, mostrando luego cambios en la distribución en el ciclo celular y apoptosis.

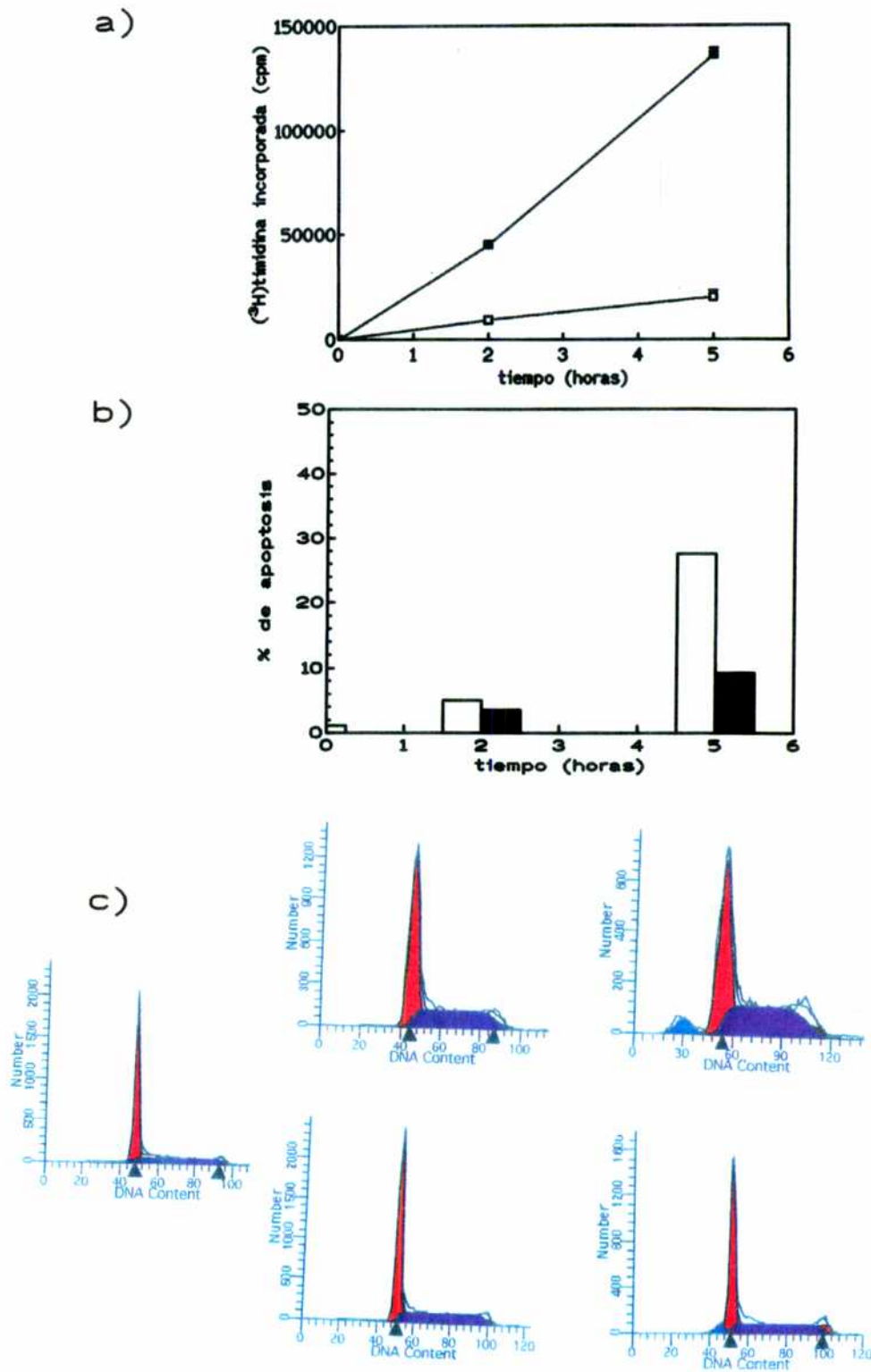


Figura 29. Curso temporal de los distintos efectos exhibidos por el suero LB (fracción de bajo peso molecular) sobre las células LB *in vitro*. a) Inhibición de la incorporación de (³H)timidina (símbolos llenos: suero LB, símbolos vacíos: suero normal); b) Inducción de apoptosis (barras vacías: suero LB, barras llenas: suero normal) y c) Inducción de alteraciones en la distribución en el ciclo celular (arriba: suero LB, abajo: suero normal).

El conjunto de los resultados de esta Tercera Parte sugiere que los mecanismos del huésped asociados al primer pico de RC serían distintos de los que operan en el segundo pico de RC. El primer pico de RC está asociado con una respuesta inmune convencional mediada por células y/o anticuerpos. El segundo pico de RC -el cual, dada su universalidad puede ser estudiado asociado a tumores inmunogénicos y no inmunogénicos- correlaciona fuertemente con una actividad inhibitoria presente en el suero de ratones portadores de tumor, que no sólo es capaz de inhibir in vitro la proliferación celular medida por incorporación de (^3H)timidina sino que además induce apoptosis y alteraciones en la distribución en el ciclo celular similares a las observadas in vivo en el tumor secundario inhibido por RC. Esta actividad inhibitoria es timo-independiente, es inespecífica con respecto al tipo de tumor, actúa con mayor intensidad contra células tumorales que normales y es dependiente de la presencia del tumor primario. Tal actividad inhibitoria está asociada a un factor (o factores) de un peso molecular aproximado de 1000 D y presenta características funcionales y físico-químicas comunes, independientemente de que se obtengan a partir del suero de portadores de MC-C (tumor inmunogénico) o LB (de inmunogenicidad no detectable) y puede ser transferida por unión en parabiosis desde un ratón portador de tumor hacia un ratón sin tumor. Nuestros resultados ponen en evidencia una fuerte asociación entre dicha actividad sérica inhibitoria y la RC generada por tumores inmunogénicos como no inmunogénicos de gran volumen.

DISCUSSION

Desde hace algunos años nos hemos dedicado a la búsqueda de mecanismos de naturaleza fisiológica involucrados en el control del crecimiento tumoral. Nuestro interés se ha centrado en el estudio de algunos aspectos poco conocidos de la biología tumoral que ponen de relieve las interacciones entre el tumor y su huésped. Nuestro horizonte ha sido, por un lado, de índole teórica y por el otro, de índole práctica en tanto podamos describir aspectos que podrían ser útiles en la terapia antineoplásica.

En este sentido, hemos iniciado hace algunos años el estudio del fenómeno de la **resistencia concomitante (RC)**, según el cual un individuo portador de un tumor inhibe el desarrollo de un implante secundario realizado con células de ese tumor en un sitio distante (38,40,42,52). Este fenómeno constituye un modelo interesante para estudiar la participación del tumor primario en el control de las metástasis, que pueden ser consideradas como implantes secundarios "naturales" en un individuo portador de un tumor y cuyo control constituye el principal objetivo de las terapias antineoplásicas. La experiencia clínica y numerosos datos experimentales revelan que, en muchas ocasiones, la extirpación de un tumor va seguida del rápido desarrollo de metástasis que no eran aparentes al momento de la extirpación, sugiriendo que la presencia del tumor primario ejercía un control inhibitorio sobre aquéllas (33-38), cuyo mecanismo podría ser explotado terapéuticamente.

A pesar de todo lo expuesto acerca de la relación entre el fenómeno de RC y el control de metástasis y a pesar de haberse descrito la RC en asociación con tumores humanos (33,141,142), este fenómeno ha sido poco estudiado en comparación con otras áreas de la oncología.

Existe evidencia experimental de que la RC puede ser generada tanto por tumores **inmunogénicos** (20,47-52) como **no inmunogénicos** (38,42,128,129) pero hasta hoy, la RC generada por uno y otro tipo de tumores, había sido atribuída a

mecanismos completamente diferentes (mecanismos inmunes T-dependientes en el caso de los tumores inmunogénicos y mecanismos no inmunológicos como la atrepsia, la inhibición de la angiogénesis y la acción antitumoral de factores antimetabólicos en el caso de los no inmunogénicos) y no se había explorado la asociación entre ambos grupos de tumores (34,35,38,40,47-52).

En este trabajo, usando nueve tumores murinos con diferentes grados de inmunogenicidad, desde tumores fuertemente inmunogénicos (L15, MC-D, MC-C) hasta aquéllos con inmunogenicidad indetectable (LB y C7HI), pasando por aquéllos de inmunogenicidad moderada (MC-B, MNU-2.1, MNUMPA-1.1 y M3) hemos intentado determinar si, además de las diferencias mencionadas, existe un mecanismo o componente común de resistencia concomitante inducido por todos los tumores independientemente de su inmunogenicidad, y de ser así, cuál era su naturaleza y su vía de acción.

Nuestro primer objetivo fue entonces determinar si en algún punto del desarrollo del tumor primario encontrábamos características similares entre la RC generada por tumores inmunogénicos y no inmunogénicos. El conjunto de los resultados obtenidos nos permite concluir que durante el crecimiento del tumor primario se generan dos picos de RC temporalmente separados, que presentarían características distintas y estarían mediados por distintos mecanismos:

a) El **primer pico de RC** se observó cuando el tumor primario era pequeño (<500 mm³) en el momento de realizar el segundo implante tumoral; fue específico de tumor, es decir, sólo se observó cuando el segundo implante se llevaba a cabo con células del propio tumor pero no con células de otro tumor y fue dependiente del timo ya que se observó en ratones eutímicos pero no en ratones *nude*, genéticamente

timoprivos. Comparando a los distintos tumores entre sí, la intensidad del primer pico de RC resultó ser proporcional al grado de inmunogenicidad, esto es, cuanto mayor era la inmunogenicidad del tumor, mayor era la intensidad del primer pico de RC que generaba. Recíprocamente, cuando la inmunogenicidad era débil o indetectable, el primer pico de RC no se observaba. Asimismo, la inhibición del tumor secundario en esta etapa estuvo asociada a una típica reacción de rechazo inmunológico contra tumores (55, 144), similar a la observada en rechazos de trasplantes alogeneicos, con una profusa infiltración por células mononucleares y con la aparición de extensas áreas centrales de necrosis, observables a través de estudios histológicos. Más aún, la cinética de aparición y desaparición del primer pico de resistencia concomitante inducido por un tumor fue paralela a la aparición y desaparición de la respuesta inmune, mediada por células o anticuerpos, montada contra ese tumor. Por último, el mecanismo de rechazo montado contra el segundo implante tumoral no revirtió con la extirpación del tumor primario.

b) Por otro lado, **el segundo pico de RC fue exhibido tanto por tumores inmunogénicos como no inmunogénicos**, lo cual reviste gran importancia para contestar nuestro objetivo. Este segundo pico de RC se observó cuando el tumor primario era grande (volumen $>2000 \text{ mm}^3$) en el momento de realizar el segundo implante tumoral. La inhibición del segundo implante por la presencia de un tumor de gran volumen no fue específica de tumor, inhibiéndose también implantes secundarios llevados a cabo con células de un tumor distinto del primario, aún cuando estas células eran de un tumor no inductor de RC. La inespecificidad del segundo pico de RC sugiere que, sean cuales fueren los mecanismos involucrados, éstos podrían potencialmente ser utilizados no sólo contra el tumor de origen sino también contra otros tumores, sean éstos inductores de RC o no. Por otro lado, esta inhibición del tumor secundario fue

independiente del timo dado que se observó tanto en ratones eutímicos como en ratones *nude*. La intensidad de este segundo pico de RC no correlacionó con el grado de inmunogenicidad, obteniéndose valores similares de RC para tumores con inmunogenicidades muy disímiles y recíprocamente, importantes diferencias en la capacidad de generar RC para tumores con inmunogenicidad similar. Por otro lado, estudios histológicos del sitio del segundo implante tumoral inhibido por un tumor primario (inmunogénico o no inmunogénico) de gran volumen (segundo pico de RC) no revelaron, a diferencia del primer pico de RC, signos de necrosis ni de infiltración por células mononucleares, sugiriendo que tales efectores no participarían al menos directamente en esta inhibición. A diferencia de lo observado para el primer pico de RC, la extirpación del tumor primario de gran volumen fue seguida de la abolición de la inhibición ejercida sobre el segundo implante tumoral, el cual abandonó su estado de "tumor dormido" y reanudó su crecimiento, sugiriendo que en este caso la inhibición es reversible o al menos parcialmente reversible. Esto confirma observaciones anteriores en las cuales el tumor secundario inhibido por RC fue capaz de retomar su crecimiento al ser transplantado en un ratón normal (42).

El único tumor estudiado que no exhibió RC en ningún punto de su desarrollo fue el tumor C7H1 que es el único que dá metástasis pulmonares, lo cual sugiere una relación entre la capacidad de inducir RC y la habilidad para restringir el desarrollo metastásico. Este dato confirma observaciones hechas previamente en nuestro laboratorio con dos carcinomas de mama murinos que tienen distintos patrones metastásicos y un origen común. En ese modelo, el tumor M3 no inducía metástasis espontáneas mientras el tumor MM3 sí lo hacía. A pesar de no haberse detectado diferencias entre ellos en cuanto al grado de inmunogenicidad, contenido de células mononucleares, capacidad de generar respuesta NK, capacidad intrínseca para colonizar

pulmón, etc, se encontró una marcada diferencia en la capacidad de generar RC: los ratones portadores del tumor M3 inducían RC más fuerte (contra inóculos endovenosos mayores) que el tumor MM3. Correlativamente, el tumor M3 era capaz de controlar el desarrollo de sus propias metástasis espontáneas, ya que una vez que se extirpaba el tumor primario, aparecían metástasis que en cambio no eran evidentes en el animal portador del tumor (43).

Estudios previos utilizando tumores no inmunogénicos realizados en nuestro laboratorio y en otros, habían demostrado la existencia de RC en etapas tardías del desarrollo tumoral, que aquí llamamos "segundo pico de RC" (38,42,53). Por otro lado, la mayoría de los autores que han estudiado la RC inducida por tumores de fuerte inmunogenicidad han descrito la existencia del primer pico, asociado a mecanismos inmunes convencionales, pero no la del segundo pico de RC (47,48,50,52,146-148). Esto puede deberse a que en la mayoría de estos estudios se analizaron solamente los estadios tempranos del crecimiento tumoral (48,50,52,145-148). Por otro lado, la evaluación de la RC muchas veces había sido llevada a cabo con una sola dosis de células tumorales en el segundo implante, lo cual brinda menor información porque no permite determinar un título de RC y en consecuencia muchas diferencias pudieron haber pasado inadvertidas (52,145-148). Finalmente, algunos de estos autores (145,149) no han podido evaluar correctamente la RC ya que el tumor primario fue removido al poco tiempo del segundo desafío.

La descripción de dos picos de RC temporalmente separados realizada en esta Tesis, podría explicar aparentes discrepancias halladas en la literatura. Por ejemplo, Berendt (52) y Gorelik (53) han trabajado con el tumor fuertemente inmunogénico Meth-A, utilizando dosis similares de células tanto en el primero como en el segundo

implante y sin embargo, mientras el primero ha descrito la existencia de una RC transitoria en ratones portadores de un tumor pequeño, el segundo observó que la RC no aparecía cuando el tumor primario era pequeño y aumentaba progresivamente a medida que aquél crecía. En nuestra opinión, la razón de estas conclusiones a primera vista contradictorias pero, a nuestro entender, complementarias, reside en los distintos estadios del crecimiento del tumor primario en los que cada autor ha evaluado la RC y en el concepto que cada uno tenía de "tumor pequeño": mientras el primero (52) había estudiado el fenómeno de RC cuando el tumor primario era $<400 \text{ mm}^3$, el segundo (53) había focalizado su estudio en etapas más avanzadas del desarrollo del tumor primario (entre 500 y 5000 mm^3). Otros ejemplos similares de aparentes discrepancias basados en la observación de distintas etapas del crecimiento tumoral, se observan en estudios de la RC inducida por el melanoma B16 (54,147), el carcinoma murino 3LL (34,54), los sarcomas inducidos por metilcolantreno (150-152) y el carcinoma de rata Flexner-Jobling (153).

Como hemos mencionado previamente, el primer pico de RC estaría mediado por mecanismos inmunes dependientes del timo -que han sido ampliamente estudiados por éste y otros laboratorios- y está asociado a la necrosis masiva del segundo implante tumoral. Por otro lado, el segundo pico de RC -común a tumores inmunogénicos y no inmunogénicos- estaría mediado por mecanismos distintos de los inmunológicos clásicos, que no han sido hasta hoy investigados en profundidad.

Para iniciar este estudio, el segundo objetivo de este trabajo fue describir cuáles eran los patrones de proliferación y muerte celular en el tumor secundario inhibido por la presencia de un tumor primario de gran volumen (**segundo pico de RC**) usando como modelos de estudio, tumores inmunogénicos y no inmunogénicos.

En ambos modelos tumorales, la inhibición del tumor secundario estuvo asociada a una disminución en el número de células proliferantes teniendo en cuenta tanto a las células en mitosis como a las células que expresan altos niveles del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular o PCNA y a un aumento en el número de células en apoptosis.

A diferencia de lo observado por nosotros, Folkman y col. (35,63) mostraron que la inhibición de las metástasis por la presencia de un tumor primario se daba exclusivamente mediante la inducción de apoptosis en las metástasis, atribuida a un efecto antiangiogénico. Es posible que el resultado obtenido por ellos sea consecuencia del tipo particular de tumor estudiado, de la etapa del crecimiento del tumor primario donde se focalizó el estudio y del hecho de que, a diferencia de nuestro modelo, ellos observan sólo un efecto indirecto (a través de la inhibición de la neovascularización) y no un efecto directo sobre las células tumorales, por lo cual sus resultados podrían explicar sólo una parte de los observados en nuestro modelo.

El estudio de la distribución en el ciclo celular del tumor secundario inhibido por RC (segundo pico de RC) reveló alteraciones en el patrón de distribución de las células a lo largo del ciclo celular, observándose un crecimiento de la población de células con contenido de DNA correspondiente a la fase S y una disminución de las subpoblaciones G₂-M y G₀-G₁.

Si bien los estudios realizados *in vivo* se basan en mediciones “instantáneas” (posición en el ciclo celular, proporción de células en mitosis o proliferantes determinadas con el PCNA, proporción de células en apoptosis), nos permiten, con ciertas limitaciones, hacer especulaciones en cuanto a los cambios que se producen en la *cinética o progresión del ciclo celular*.

Los cambios en la distribución en el ciclo celular observados en el tumor secundario inhibido por RC podrían ser consecuencia de un enlentecimiento de las células al atravesar la fase S (de síntesis de DNA). Dicho “arresto” daría como consecuencia un aumento de la fracción de células en fase S y una disminución de las fases restantes. Este efecto se ha observado en otros sistemas, donde las células tumorales son tratadas con distintas drogas quimioterápicas –como el cis-diaminodicloroplatino o la camptotecina y como efecto de la radiación o la hipoxia (86-88,92,117,154,155). En estos sistemas las células sufren un enlentecimiento en la fase S y dejan de incorporar nucleótidos, siendo células que no progresan en el ciclo celular y paradójicamente, engrosan la fracción S. En este sentido, es importante señalar que el % de células en fase S, usado muchas veces en la clínica como parámetro de proliferación de un tumor (156,157) puede o no dar una pauta certera, por lo cual es recomendable la utilización simultánea de varias metodologías.

Por otro lado, los cambios observados en la distribución en el ciclo celular podrían ser consecuencia de la inducción de apoptosis en forma mayoritaria en las fases G_0 - G_1 y G_2 -M, produciendo un aumento relativo de la fracción S.

La observación de una disminución en el número de células proliferantes (PCNA positivas y en mitosis) en nuestro modelo *in vivo* y la inhibición de la incorporación de nucleótidos en nuestro sistema *in vitro* sugieren que uno de los mecanismos responsables de los cambios en el patrón de distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular es el enlentecimiento postulado en la primera hipótesis. Adicionalmente, nuestros resultados no nos permiten descartar que la apoptosis diferencial podría ser un aporte adicional a los cambios observados.

Por otro lado, el hecho de que el efecto antiproliferativo preceda a la inducción de apoptosis nos permite descartar que esta última – a través de una disminución en el

número de células disponibles para proliferar- sea la responsable de todos los efectos observados. En el futuro, creemos importante estudiar estos aspectos a partir de la obtención de cultivos sincronizados y a partir de estudios *in vitro* con tiempos más prolongados, para lo cual sería conveniente adoptar un modelo más adaptado al crecimiento en cultivo. Los estudios realizados en el presente trabajo tanto *in vivo* como mediante cultivos primarios de células tumorales tienen la importancia de reflejar de forma más cercana y con menos artificios, lo que ocurre en el individuo.

El tercer objetivo propuesto fue describir los mecanismos efectores del segundo pico de RC.

Como hemos discutido previamente, los resultados de este trabajo sugieren que los **mecanismos inmunes** convencionales no jugarían un rol importante en el segundo pico de RC, a pesar de su relevancia en el primer pico de RC. Esto significa que el segundo pico de RC debería explicarse por mecanismos no inmunológicos. El primero de estos mecanismos propuestos se conoce con el nombre de **atrepsia** y postula que un tumor primario que induce RC –a diferencia de un tumor incapaz de inducirla- genera un gradiente de nutrientes y factores de crecimiento a su favor y como consecuencia de esta sustracción impediría el desarrollo del segundo implante tumoral (33,38,40). Hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos tendientes a demostrar o descartar esta hipótesis en relación con el fenómeno de RC. En nuestro laboratorio hemos realizado algunas observaciones que no favorecerían esta hipótesis: en efecto, hemos demostrado que el tumor LB es capaz de restringir el desarrollo de las metástasis pulmonares de otro tumor (el C7HI, el cual no es inductor de RC) a pesar de que el tumor C7HI que dio origen a las mismas sigue creciendo sin ser inhibido (141). Estas observaciones no apoyarían esta hipótesis ya que la falta de nutrientes debería haber

afectado a ambos, las metástasis y el tumor primario C7HI, a menos que éste último fuera capaz de atraer o sustraer más nutrientes que las metástasis. Sin embargo, de acuerdo con esta teoría, ésto no sería posible ya que la capacidad de atraer o sustraer nutrientes sería proporcional a la capacidad de generar RC y hemos admitido que el tumor C7HI no es inductor de RC.

Una segunda hipótesis no inmunológica sugiere la existencia de un mecanismo **indirecto** de inhibición tumoral basado en la **inhibición de la neovascularización** del tumor secundario (35,57). En el presente trabajo hemos observado una disminución en el número de vasos sanguíneos que drenan el tumor secundario MC-C inhibido por la presencia de un tumor primario de gran volumen, o sea asociado al segundo pico de RC. Esto sugiere que la inhibición de la angiogénesis podría estar involucrada en este fenómeno, al menos en la etapa de establecimiento del tumor secundario, o sea en los primeros días desde su implantación, que es donde esta inhibición de la neovascularización fue manifiesta. Hemos hecho dos observaciones que sugieren que la inhibición de la angiogénesis sería una de las causas de la RC y no una consecuencia de un menor crecimiento del tumor secundario: a) la disminución en el número de vasos observables macroscópicamente precede a las diferencias en el crecimiento tumoral y b) aún cuando comparamos tumores de igual volumen (correspondiente al día 10 en el grupo control y día 18 en el experimental) se observa un menor número de vasos en este último.

Por otro lado, algunas observaciones sugieren que, además de este mecanismo indirecto basado en la inhibición de la angiogénesis, también estarían involucrados otros mecanismos:

a) Una vez que se iguala el número de vasos en el grupo control y experimental, el volumen del tumor secundario en el grupo experimental no sólo sigue siendo menor –lo cual podría ser consecuencia de la previa inhibición de la angiogénesis observada- sino que la pendiente de la cinética de crecimiento del mismo es sensiblemente menor que la del grupo control.

b) Observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio sugieren que estarían involucrados también, mecanismos de acción **directa** sobre las células tumorales. En efecto, el tumor primario LB inoculado por vía subcutánea, es capaz de restringir el crecimiento de un tumor LB inoculado por vía intraperitoneal, a pesar de que en este último caso, no se requeriría la formación de neovasos para el desarrollo tumoral (140); por otro lado, hemos demostrado que el tumor LB es capaz de restringir el crecimiento de las metástasis pulmonares del tumor C7HI mediante una disminución de las células en mitosis y mediante la inducción de apoptosis aún cuando estas metástasis se encuentran en un estadio prevascular (141).

Todo esto nos llevó a explorar una tercera hipótesis no inmunológica que plantea la participación de **factores solubles antimitóticos** producidos en presencia del tumor primario (33,34,38,158) que ejercerían su acción directamente sobre las células tumorales.

En este trabajo hemos demostrado la existencia de factores inhibitorios de la proliferación *in vitro* de las células tumorales, en el suero de ratones portadores de tumores que inducen RC. Esta actividad inhibitoria creció proporcionalmente con el volumen tumoral y con la intensidad del segundo pico de RC: cuanto mayor fue el segundo pico de RC (tumor LB) mayor fue el título de actividad inhibitoria en el suero de estos ratones; recíprocamente, cuando el segundo pico de RC estuvo ausente (el

único caso fue el tumor C7HI), también estuvo ausente esta actividad sérica inhibitoria. Por otro lado, dicha actividad inhibitoria fue independiente de la inmunogenicidad del tumor, ya que no hubo correlación entre la intensidad de esta actividad inhibitoria y el grado de inmunogenicidad propio de cada tumor, sugiriendo que tales factores inhibitorios no estarían relacionados con la respuesta inmune antitumoral. En este sentido, los dos tumores con mayor actividad inhibitoria (el LB y el L15) fueron justamente el menos inmunogénico y el más inmunogénico respectivamente de todos los estudiados. Por otro lado, sueros de ratones inmunizados contra el tumor L15 o MC-C que habían rechazado el tumor, no exhibieron actividad inhibitoria *in vitro*.

La actividad inhibitoria sérica ha sido difícil de transferir *in vivo* a animales no portadores de tumor debido a que esta actividad se perdía rápidamente en el suero de los ratones que habían recibido repetidos inóculos endovenosos o intraperitoneales de suero con alta actividad inhibitoria, probablemente por la rápida degradación o metabolización de los factores involucrados o al reclutamiento de los mismos por otros tejidos (73).

No obstante, a pesar de esta dificultad práctica, existen numerosas evidencias que sugieren que esta actividad sérica no es sólo un acompañante del fenómeno de RC sino su causa:

- a) Se observó una resistencia al crecimiento de un implante tumoral (por ejemplo, MC-C o LB) en un ratón normal unido en parabiosis a un ratón portador de un tumor LB o MC-C de gran volumen. Esta "imitación" de la resistencia concomitante correlacionó con la presencia de actividad inhibitoria sérica transferida del ratón portador de tumor al ratón normal unido en parabiosis con él. Más aún, cuando ambos ratones en parabiosis fueron separados, el título de actividad inhibitoria decayó progresivamente en el suero del ratón normal, al mismo tiempo que las

células LB o MC-C, previamente inhibidas, comenzaron a crecer. Estos experimentos sugieren que el segundo pico de resistencia concomitante depende de la presencia de un alto y persistente nivel de actividad inhibitoria en el suero y que este nivel podría ser alcanzado sin ser portador de un tumor, lo que sugiere que esta actividad inhibitoria podría ser útil en la terapéutica antitumoral.

Es interesante que una situación similar a la observada con la RC ocurre en la regulación del crecimiento del hígado. En efecto, la hepatectomía parcial o total estimula la proliferación de hepatocitos implantados en otro sitio (159). Más aún, el suero de animales normales y hepatectomizados exhibe efectos inhibitorios y estimulatorios respectivamente de la proliferación *in vitro* de los hepatocitos. No obstante, los numerosos intentos para inhibir la regeneración hepática por repetidas inyecciones de suero normal o para estimular el crecimiento hepático por inyección de suero de animales hepatectomizados no ha sido exitoso, mientras que la transferencia de señales inhibitorias y estimulatorias de la proliferación hepática fue posible en ratones en parabiosis (160).

En estudios recientes de nuestro laboratorio donde se ha evaluado el efecto inhibitorio de un tumor inductor de RC (el LB) sobre las metástasis pulmonares de otro tumor (el C7HI) no inductor de RC, hemos demostrado que es posible transferir esta inhibición *in vivo* por inoculación endovenosa periódica de suero de ratones portadores de LB (*manuscrito en preparación*). Esto constituiría una evidencia directa de la acción antitumoral *in vivo* de este suero. Es posible que la mayor dificultad encontrada en esta Tesis y en trabajos anteriores para inhibir el crecimiento de un implante tumoral por inoculación de suero de ratones portadores del mismo tumor se deba a la diferente cinética de crecimiento de los tumores estudiados. En efecto, el tumor C7HI y sus metástasis crecen mucho más

lentamente que los otros tumores y esto podría permitir evaluar mejor los efectos de una transferencia adoptiva.

- b) La extirpación de un tumor primario de gran volumen, ya sea inmunogénico o no inmunogénico, fue acompañada de una caída de la actividad inhibitoria y correlativamente se observó una abolición de la capacidad de inhibir un segundo implante tumoral ya sea que éste hubiese sido realizado antes o después de la extirpación del tumor primario.
- c) Tanto el segundo pico de RC *in vivo* como la actividad antiproliferativa *in vitro* fueron inespecíficos de tumor e independientes de la presencia del timo.
- d) Como se mencionó previamente, la exposición *in vitro* de las células tumorales a distintas concentraciones de suero de portadores de tumor indujo, con respecto a las mismas células tratadas con suero normal, una inhibición de la proliferación medida por incorporación de (³H) timidina. El estudio más profundo mediante el uso de distintas técnicas reveló la presencia de células en apoptosis como así también la existencia de alteraciones en la distribución en el ciclo celular. En este sentido, se observó un aumento de la fracción de células en fase S y una disminución de la subpoblación en fases G₂-M y G₀-G₁. Todas estas alteraciones observadas *in vitro* son similares a las que sufre *in vivo* el tumor secundario inhibido por resistencia concomitante (segundo pico de RC).
- e) Tanto el fenómeno de RC *in vivo* como la actividad inhibitoria *in vitro* son al menos en parte, *reversibles*. Otros autores habían descripto que la inhibición de células epiteliales por acción del Transforming Growth Factor β (TGF β) *in vitro* era también parcialmente reversible, coexistiendo fenómenos antiproliferativos y de muerte celular, atribuyendo esa reversibilidad al hecho de que sólo algunas subpoblaciones celulares eran sensibles a la inducción de apoptosis (162). Por otro

lado, algunos autores han descrito la inducción de un estado de tumor dormido reversible al tratar un linfoma B con anticuerpos anti-IgM y demostraron que tal estado se alcanza mediante la inducción de apoptosis y arresto en el ciclo celular (97). Por último, el modelo de inhibición metastásica atribuida a la acción de la "angiostatina" estudiado por Folkman y col. (35,63) involucra solamente un mecanismo apoptótico manteniéndose altos los niveles de proliferación y aún así se comprueba que se alcanza un estado de "tumor dormido" que se revierte al extirpar el tumor primario. En nuestro sistema, en vista de las perturbaciones en los patrones citocinéticos sufridos por el tumor secundario y por las células tumorales tratadas *in vitro* con factores derivados del suero, creemos que las células arrestadas (o "retardadas") en su progresión en el ciclo celular, retomarían el mismo una vez que se quita el elemento inhibidor (sea éste el tumor primario o los factores derivados del suero); por otro lado, la subpoblación que no fue afectada y que, aunque en cantidad insuficiente para determinar el desarrollo del tumor secundario o la proliferación del cultivo, sigue ciclando, también daría un aporte en la reversión de estado de tumor dormido. Por último, la población que ya sufrió apoptosis, obviamente, no sería capaz de retomar el ciclo celular.

En cuanto a la *comparación entre células tumorales y normales* pueden hacerse las siguientes observaciones:

El suero de portadores de tumor fue capaz de inhibir la proliferación *in vitro* de células endoteliales, que son componentes principales de los vasos sanguíneos. Esto sugiere que el mismo grupo de factores séricos que ejercería su acción directa sobre las propias células tumorales inhibiendo su crecimiento, también podría ser responsable de la inhibición de la angiogénesis. Por el contrario, este suero no afecta la agregación

plaquetaria, que es considerada un evento importante en la diseminación metastásica, lo cual está de acuerdo con la observación de que la presencia de un tumor primario puede inhibir drásticamente el crecimiento *in vivo* de implantes secundarios tumorales artificiales o naturales (metástasis) ya establecidos pero tiene poco efecto sobre la diseminación metastásica (141).

Por último, se demostró que el suero de ratones portadores de tumor también ejercía un efecto inhibitorio sobre fibroblastos y linfocitos normales –en el caso de los linfocitos, proporcionalmente a su grado de proliferación–, aunque el efecto inhibitorio fue menor al observado sobre células tumorales.

En cuanto al *origen* de los factores séricos antitumorales, la observación de que al extirpar el tumor, su actividad decae, sugiere que podrían ser elaborados por el propio tumor. Los experimentos realizados con medios condicionados obtenidos de cultivos de células tumorales *in vitro* muestran una tendencia en este sentido, ya que pudo recuperarse cierta actividad inhibitoria en los mismos, la cual estaba ausente en cultivos de fibroblastos normales embrionarios.

Alternativamente, no podemos descartar la posibilidad de que el tumor induzca a otras células del huésped a elaborar estos factores inhibitorios. En este sentido, en nuestro laboratorio se había demostrado que la inoculación de drogas antiinflamatorias reducía la actividad inhibitoria en el suero sugiriendo que no sólo el tumor sino las alteraciones que induce en el huésped, podrían ser responsables de la producción de esta actividad (140). Por otro lado, nuestros resultados actuales sugieren que ni el timo (órgano linfático en el cual se produce la maduración de los linfocitos T) ni las glándulas adrenales (principales productoras de glucocorticoides, de conocida acción

antiproliferativa sobre linfocitos T) ni tampoco el bazo (datos no mostrados) serían los responsables de su elaboración.

En cuanto a la *naturaleza* de los factores séricos antitumorales, la caracterización en paralelo de la actividad antiproliferativa e inductora de alteraciones en el ciclo celular y de apoptosis, reveló importantes similitudes. Todas ellas exhibieron inespecificidad, produciendo efectos *in vitro* no sólo contra las células del tumor del animal de cuyo suero se aislaron sino también contra células de otros tumores; por otro lado, todas ellas estuvieron mediadas por factores termorresistentes y dializables y de un peso molecular cercano a 1000 D estimado por su posición en columnas cromatográficas de Sephadex G-15. Esto sugiere que tanto la actividad antiproliferativa, inductora de alteraciones en el ciclo celular e inductor de apoptosis podrían estar mediadas por el mismo factor/s o por un grupo de factores con características similares.

En nuestro laboratorio hemos caracterizado con mayor detalle al factor/es que media la actividad antiproliferativa, basada en ensayos de incorporación de (³H)timidina, hallada en el suero de ratones portadores de un tumor no inmunogénico (el tumor LB): este factor fue recuperado en una columna HPLC presentando máxima absorción a 215 y 266 nm, fue aniónico a pH neutro, exhibió grupos carboxilo libres y una o más moléculas de tirosina. Por último, estudios de espectrometría de masa revelaron la presencia de tres picos, correspondientes a pesos moleculares: 876.3, 1034.7 y 1304.7 representando posiblemente un componente activo con distintas modificaciones (141). Las similitudes entre los factores que median las tres actividades descritas en esta Tesis, nos sugieren que estas propiedades químicas encontradas para la actividad antiproliferativa, podrían ser también compartidas por la actividad inductora de alteraciones en el ciclo celular y de apoptosis.

Factores antitumorales conocidos como el TNF α , la familia del TGF β , interferones, poliaminas, angiostatina, endostatina, óxido nítrico y glucocorticoides no estarían involucrados debido a su diferente peso molecular, a diferencias en sus propiedades físicas y biológicas (por ejemplo, ni el TGF β ni el TNF α ni la angiostatina son resistentes al calentamiento; por otro lado, la angiostatina y la endostatina ejercen su acción sobre células endoteliales pero no sobre las propias células tumorales) y/o en base a determinaciones específicas realizadas en este trabajo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como conclusión general de esta Tesis podemos decir que la RC que se genera a lo largo del desarrollo de un tumor exhibe dos picos temporalmente separados que estarían mediados por mecanismos distintos:

El primer pico, que es generado sólo por tumores inmunogénicos pequeños, está asociado a mecanismos inmunológicos convencionales, que han sido muy estudiados por éste y otros laboratorios.

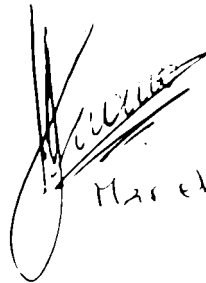
El segundo pico, que es generado por tumores inmunogénicos y no inmunogénicos de gran volumen, está asociado a un mecanismo distinto del inmunológico convencional, que estaría mediado por un factor/es sérico de bajo peso molecular no relacionados con moléculas antitumorales previamente descritas.

Este factor/es ejercería un efecto inhibitorio directo y otro indirecto sobre el tumor secundario: el efecto directo induciría en las propias células tumorales, efectos antiproliferativos con alteraciones en el patrón de distribución de sus células en las distintas fases del ciclo celular, como así también apoptosis; el efecto indirecto se ejercería a través de la inhibición de la neovascularización.

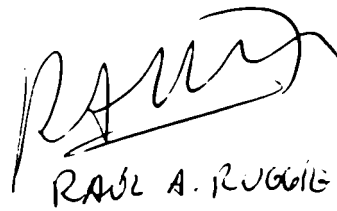
El estudio realizado abre dos horizontes: uno teórico y uno aplicado.

Con respecto al primero, es intrigante que una situación similar a la RC se observa en la regulación del crecimiento normal, como por ejemplo el hígado, sugiriendo que “el tumor puede asimilarse más a un órgano integrado que a un conjunto de células independientes” como propuso el Dr Prehn (162). Por lo tanto la comprensión de la RC podría ayudar a develar algunos mecanismos de regulación de la proliferación tumoral y normal.

Por último, el estudio y el manejo de los factores que median la actividad antitumoral asociada a la RC podría ser útil para mejorar la terapia antineoplásica, utilizando y potenciando el rol de factores fisiológicos presentes en el organismo portador de un tumor.



Marcela Franco



RAÚL A. RUGGIERO

BIBLIOGRAFIA

1. Pitot, HC. Fundamentals of Oncology. Marcel Dekker Inc, New York and Basel (1978).
2. Ewing, J. Neoplastic disease: A treatise on tumors (4th Ed), Saunders, Philadelphia, (1940).
3. Liotta LA, Strake ML, Wewer UM, Schiffmann E. Tumor Invasion and Metastases. Biochemical Mechanisms. En: The Pathobiology of Neoplasia, pp 533-546, Sirica AE (ed), Plenum Press, New York and London (1989).
4. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastases. *Cell* 79: 185-188 (1994).
5. Boyd D. Invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 15 (1): 77-89 (1996).
6. Shreiber H. Tumor Immunology. En: Fundamental Immunology, 3rd edition, Paul WE (Ed), Raven Press, New York, (1993).
7. López DM, López-Cepero M, Watson GA, Ganju A, Sotomayor E and Fu YX. Modulation of the immune system by mammary tumor-derived factors. *Cancer Investigation* 9 (6): 643-653 (1991).
8. Kammo I and Friedman H. Immunosuppression and the role of suppressive factors in cancer. *Adv. Cancer Res*, 25: 271-321 (1977).
9. Prehn RT. Stimulatory effect of immune reactions upon the growth of untransplanted tumors. *Cancer Res.* 54: 908-914 (1994).
10. Prehn RT and Lappé MA. An immunostimulation theory of tumor development. *Transplant. Rev.* 7: 26-54 (1971).
11. Prehn RT and Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*; 18: 769-778 (1957).
12. Foley EJ. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13: 835-837 (1953).
13. Baldwin RW. Immunity to methylcholanthrene-induced tumors in inbred rats following atrophy and regression of implanted tumors. *Br J Cancer* 9: 652-665 (1955)
14. Old LJ, Boyse EA, Clarke DA, Carswell EA. Antigenic properties of chemically-induced tumors. *Ann. NY Acad. Sci.* (101) : 80-106 (1962).
15. Klein G., Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer res.* 20: 1561-1572 (1960)
16. Globerson A, Foldman M. Antigenic specificity of benzopyrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 32: 1229-1243 (1964).
17. Vaage J. Nonvirus-associated antigens in virus-induced mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 28: 2477-2483 (1968).
18. Morton DL, Miller GF, Wood DA. Demonstration of tumor-specific immunity against antigens unrelated to the mammary tumor viruses in spontaneous mammary adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 42: 289-301 (1969).
19. Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1333-1336 (1974).
20. North RJ, Kirsstein DP. T-cell mediated concomitant immunity to syngeneic tumors. *J. Exp. Medicine* 145: 275-2291 (1977).

21. Winn HJ. Immune mechanisms in homotransplantation II. Quantitative assay of the immunological activity of lymphoid cells stimulated by tumor homograft. *J. Immunol.* 86: 228-239 (1961).
22. North R. J. The murine antitumor response and its therapeutic manipulation. *Adv. Immunology*, 35:89-155 (1984).
23. Rouse BT, Rollinghoff M, Warner NL. Anti-tita serum induced suppression of the cellular transfer of tumor-specific immunity to syngeneic plasma cell tumor. *Nature New Biol.* 238: 116-117 (1972).
24. Biddison WE, Palmer JC, Alexander HA, Cowan EP and Manson LA. Characterization and specificity of murine antitumor cytotoxic effector cells within an ascitic tumor. *J.Immunol.* 118: 2243-2253 (1977).
25. Burnett FM. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13: 1-27 (1970).
26. North R. J. Down regulation of the antitumor immune response. *Adv. Cancer Res.*, 45, 1-43 (1985).
27. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic nude mice. *Science* 183: 534-536 (1979).
28. Outzen HC, Custer RP, Eaton GJ, Prehn RT. Spontaneous and induced tumor incidence in germfree nude mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* 17: 1-8 (1975).
29. Moller G. (ed). Experiments and the concept of immunological surveillance. *Transpl. Rev.* 28: 43-61 (1976).
30. Hewitt HB, Blake ER, and Walder AS. A critique of the evidence for active host defense against cancer based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33:241-258 (1976)..
31. Middle JG and Embleton MJ. Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 637-643 (1981).
32. Bast RC and Bast BS. Critical review of previously reported animal studies of immunotherapy with nonspecific immunostimulants. *Ann. NY. Acad. Sci.* 277: 60-92 (1976).
33. Sugarbaker EV, Thornthwaite J, Ketcham AS. Inhibitory effect of a primary tumor on metastases.. En: S. Day (ed). *Cancer invasion and metastases. Biologic Mechanisms and therapy:227-240*, New York, Raven Press (1977).
34. De Wys WD. Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors. *C. Res.* 33: 474-379 (1972).
35. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R., Moses M., Lane W., Cao Y. Sage J. and Folkman J. Angostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328 (1994).
36. Lange PH, Bekmat K, Bose G, Kennedy BJ and Fraley. EE. Accelerated growth of testicular cancer after cryoreductive surgery. *Cancer* 45: 1498-1506 (1980).
37. Gorelik E. Antimetastatic concomitant immunity. In: *Tumor invasion and metastases*. Eds: Liotta & Hart; The Hague; Martinus Nijhoff Publishers, p.113-131 (1982).
38. Gorelik E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv.C.Res.* 39: 71-120 (1983).
39. Gorelik E, Segal S and Feldman M. Control of lung metastases progression in mice: Role of growth kinetics of 3LL Lewis Lung Carcinoma and host immune reactivity. *JNCI* 65: 1257-1264 (1980).

40. Ehrlich P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. En: P. Ehrlich (ed) *Arbeiten aus dem Kooglischen Institut für Experimentelle Therapie zu Frankfurt / A.M.*: 77-103, Jena, Germany: Gustav Fischer, (1906).
41. Bashford E. (ed) *Third Scientific Report on the Investigation of the Imperla Cancer Research Fund*, London: Taylor and Francis: 262-268 (1908).
42. Ruggiero RA., Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, and Pasqualini CD. "Concomitant immunity" in murine tumors of non-detectable immunogenicity. *Br. J. Cancer*, 51: 37-48 (1985).
43. Bonfil RD, Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Meiss RP and Pasqualini CD. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. *Int. J. Cancer* 41: 415-422 (1988).
44. Schabel FM. Concepts for systemic treatment of metastases. *Cancer Res.* 35: 15-24 (1975).
45. Prehn RT. Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance. *C.Res.* 53: 3266-3269 (1993).
46. Michelson S, Leith JT. A theoretical explanation of "concomitant resistance". *Bulletin of Mathematical Biology*, vol 57, No 5: 733-747 (1995).
47. Tuttle R.L., Kniick V.C., Stopford C.R and Wolberg G. In vivo and in vitro antitumor activity expressed by cells of concomitantly immune mice. *Cancer Res.*, 43: 2600-2605 (1983).
48. Belehradek J., Barski G. and Thonier M. Evolution of cell-mediated antitumor immunity in mice bearing a syngeneic chemically induced tumor. Influence of growth, surgical removal and treatment with irradiated tumor cells. *Int. J. Cancer*,, 9: 461-469 (1972).
49. Akporiaye E. T., Kudalore M., Stevenson A. P., Kraemer P. M., Stewart C. C.; Isolation and reactivity of host effectors associated with the manifestation of concomitant tumor immunity. *Cancer Res.*, 48, 1153-1158 (1988).
50. Chandradasa K.D. The development and specific suppression of concomitant immunity in two syngeneic tumor-host systems. *Int. J. Cancer*, 11: 648-662 (1973).
51. Milas L, Hunter N, Mason K, Withers R. Immunological resistance to pulmonary metastases in C3Hf/Bu mice bearing syngeneic fibrosarcoma of different sizes. *Cancer Res.* 34: 61-71 (1974)..
52. Berendt MJ, North RJ and Kirstein DP. The immunological basis of endotoxin-induced tumor suppression. *J. Exp. Med.* 148: 1560-1569 (1978).
53. Gorelik E. Resistance of tumor-bearing to a second tumor challenge. *Cancer Res.* 43: 138-145 (1983).
54. Gorelik. E., Segal S. and Feldman M. On the mechanism of tumor "concomitant" immunity. *Int. J. Cancer*, 27: 847-856 (1981)..
55. Meiss RP, Bonfil RD, Ruggiero RA, and Pasqualini CD. Histologic aspects of concomitant resistance induced by non-immunogenic murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 1163-1173 (1986).
56. Tytzer EE. Factors in the production and growth of tumor metastases. *J. Med. Res.* 28: 309-332 (1913).
57. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* vol. 3, N° 1 (1996)
58. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J.Natl.Cancer Inst.* 82: 4-6 (1990).

59. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl. J. Med.* 283: 1182-1186 (1971).
60. Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 253: 3736-3740 (1978).
61. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-844 (1992).
62. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* vol. 1, n°1: 77-81 (1995).
63. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine*, vol 2, No 6 (1995).
64. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C and Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Medicine* vol 2 n°8: 689-692 (1996).
65. Bohen T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390: 404-407 (1997).
66. Mauceri HJ, Henna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Helmann R, Gately S, Dhanaball M, Soff GA, Sukhatmel VP, Kufe DM, Weichselbaum RR. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature* 394: 287-291 (1998).
67. Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberg EG and Lair SV. Regulators of cell division: endogenous mitotic inhibitors of mammalian cells. *Int. Rev. Cytol.* 42: 1-47 (1975).
68. Bichel P. Tumor growth inhibiting effect of JB-1 ascitic fluid . I. An in vivo investigation. *Eur. J. Cancer* 6L 291-296 (1970).
69. Iwata KK, Fryling CM, Knott WB and Toduro GJ. Isolation of tumor cell growth-inhibiting factors from a human rhabdomyosarcoma cell line. *Cancer res.* 45: 2689-2694 (1985).
70. Watts J. A factor in the serum of tumor-bearing rats which is deleterious to cells in tissue culture. *Nature* 197: 196-197 (1963).
71. Davignon D, Fast LD, and Albala MM. Inhibition of in vitro lymphocyte function by a soluble AKR leukemic suppressor factor. *Cell Immunol.* 89: 364-374 (1986)
72. Kumar RK, Lykke AW and Penny R. Immunosuppression associated with SJL/L murine lymphoma. I. Suppression of cell-mediated immune responses after tumor transplantation. *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 1269-1275 (1981).
73. Ruggiero R.A., Bustuoabad O.D., Cramer P., Bonfil R.D. and Pasqualini C.D. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing non-immunogenic tumors. *Cancer Res.*, 50: 7159-7165 (1990).
74. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1827 (1994).
75. Hartwell LH and Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of the cell cycle events. *Science* 246: 629-634 (1989).
76. Murray AW and Kirschner MW. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-621 (1989).
77. Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547-550 (1994).

78. Hunter T, Pines J. Cyclins and Cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573-582 (1994).
79. Gelfant S. A new concept of tissue and tumor cell proliferation. *Cancer Res.* 37: 3845-3862 (1977).
80. Darzynkiewicz Z. Cell cycle: application of flow cytometry in studies of cell reproduction. In: *Clinical flow cytometry. Principles and applications.* Eds: Kenneth D. Bauer, Ricardo E. Duque and T. Vincent Shankey. Williamns & Wilkins, USA (1993).
81. Rabinovitch PS. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. In: *Clinical flow cytometry. Principles and applications.* Eds: Kenneth D. Bauer, Ricardo E. Duque and T. Vincent Shankey. Williamns & Wilkins, USA (1993).
82. Sherr CJ. G₁ phase progression: Cycling on cue. *Cell* 79: 551-555 (1994).
83. Barthova J, Lukas J, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J and Bartek J. The p-16 cyclin D/cdk-4 pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma patogenesis. *Cancer Res.* 56: 5475-5482 (1996).
84. Kaufmann WK, Levedakou EN, Grady HL, Paules SP, Stein GH. Attenuation of G₂ checkpoint function preceedes human cell immortalization. *Cancer Res.* 55: 7-11 (1995).
85. Sorenson CM and Eastman E. Influence of cis-Diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 48: 6703-6707 (1988).
86. Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diaminedichloroplainum (II)-induced cytotoxicity: Role of G₂ arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 48: 4484-4488(1988).
87. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analyis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J.Natl.Cancer Inst.*, vol 82, No 9, (1990).
88. Qiao L, Pizzolo G, Melamed MR. Effects of selected chemotherapeutic agents on PCNA expression in prostate carcinoma cell lines. *Urol. Res.* 22: 171-176, 1994.
89. Muschel R, Zhang HB, Iliakis G, Mc Kenna WG. Cyclin B expression in HeLa cells during the G₂ block induced by ionizing radiation. *C. Res.* 51:5113-5117 (1991).
90. O'Connor PM, Fern DK, Pagano M, Draetta G, Pines J, Hunter T, Longo DL and Kohn KW. G₂ delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/CDK2 and cyclin B/cdc2-kinase differentially. *The J. Biol. Chem.* 268: 8296-8306 (1993).
91. Jha MN, Bamburg JR and Bedford S. Cell cycle arrest by colcemid differs in human normal and tumor cells. *Cancer Res.* 54: 5011-5015 (1994)
92. Rutgers DH, Niessen DPP and van der Linden PM. Cell kinetics of hipoxic cells in a murine tumor in vivo: flow cytometric determination of the radiation-induced blockage of cell cycle progresion. *Cell Tissue Kinet.* 20:37-42 (1987)
93. Amellem O, Pettersen BO. Cell inactivation and cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage. *Cell. Prolif.* 24: 127-141 (1991).
94. Maltzer A. Dormancy and breast cancer. *J.Surg. Oncol.* 43: 181-188 (1990).
95. Eccles SA and Alexander P. Immunologically-mediated restraint of latent tumor metastases. *Nature* 257: 52- 53 (1975).

96. Michelson S, Leith JT. Dormancy, regression and recurrence: Towards a unifying theory of tumor growth control. *J.Theor. Biol.* 169: 327-338 (1994).
97. Racila E, Dcheuermann RH, Picker LJ, Yefenof E, Tucker T, Chang W, Marches R, Street NE, Vitetta ES and Uhr JW. Tumor dormancy and cell signalling. II. Antibody as an agonist in inducing dormancy of a B cell lymphoma in SCID mice. *J. Exp. Med.* 181: 1539-1550 (1995).
98. Gorocyca W, Gong J, Aldlet B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 53: 3186-3192 (1993).
99. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and in cancer therapy. *Cancer* 73, N°8: 2013-2026 (1994).
100. Stephens LC, Ang KK, Schulthess TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat. Res.* 127: 308-316 (1991).
101. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2353-2362 (1990)
102. Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney SG. Cell cycle related changes associated with formation of Pt-adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry* 27: 54-64 (1997).
103. Evans DL, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes. *Cancer Res.* 52: 2133-2139 (1993).
104. Donaldson KL, Goolsby GL, Wahl AF. Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. *Int.J.Cancer* 57: 847-855 (1994).
105. Ormerod MG, Orr RM and Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br. J. Cancer* 69: 93-100 (1994).
106. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1459 (1995).
107. Cotter TG, Glyon JM, Echeverri S, Green DR. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res.* 12: 773-780 (1992).
108. Shinomiya N, Takemura T, Iwamoto K, Rokutanda M. Caffeine induces S-phase apoptosis in cis-diaminodichloroplatinum-treated cells, whereas cis-diaminodichloroplatinum induces a block in G2/M. *Cytometry* 27: 367-373 (1997).
109. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agent cisplatin as a model system. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor)* 2: 275-280 (1990).
110. Hickman IA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastases Rev.* 11: 121-139 (1992).
111. Robertson CN, Roberson KM, Padilla GM, O'Brien ET, Cook JM, Kim CS, Fine RL. Induction of apoptosis by diethylstilbestrol in hormone-insensitive prostate cancer cells. *J.Natl.C.Inst.* vol 88, No 13: 908-917 (1996).
112. Sacks L and Lotern J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 82: 15-21 (1992).
113. Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW and Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3754-3758 (1994).

114. Arends MJ, Mc Gregor AH, Toft NJ, Brown EJH, Wyllie AH. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability. *Br. J. Cancer* 68: 1127-1133 (1993)
115. Kimura S, Hackana T, Hirakawa K, Murakami A, Abe T. Alterations of c-myc expression by antisense oligodeoxynucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells. *C. Res.* 55: 1379-1384 (1995).
116. Hoang AT, Cohen KJ, Barret JF, Bergstrom DA, Dang CV. Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc. Natl. Sci. USA* 91: 6875-6879 (1994).
117. Zamai L, Falcieri E, Gobbi P, Santi S, Falconi M, Marhefka G and Vitale M. Anti-BrdUrd labeling of newly synthesized DNA in HL-60 cells triggered to apoptosis. *Cytometry* 25: 324-332 (1996).
118. Pazos P, Lanari C, Meiss RP, Charreau EH and Pasqualini CD. Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (NMU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res. Treatment* 20: 133-138 (1992).
119. Kordon E, Lanari C, Molinolo AA, Elizalde PV, Charreau EH and Pasqualini CD. Estrogen inhibitor of MPA-induced mammary tumor transplants. *Int. J. Cancer* 49: 900-905 (1991).
120. Pasqualini CD and Colmerauer MEM. Immunological enhancement of a murine allogeneic lymphoma. *Medicina (Buenos Aires)* 36: 189-192 (1976).
121. Rao VS and Bonavida B. Specific enhancement of tumor growth and depression of cell-mediated immunity following sensitization to soluble tumor-antigens. *Cancer Res.* 36: 1384-1391 (1976).
122. Zahalka MA, Okon E and Naor D. Blocking lymphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the beta-chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). *J. Immunol.* 150: 4466-4477 (1993).
123. Attia MA and Weiss DW. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res.* 36: 18787-18800 (1966)
124. Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. Characterization of proliferating nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.* 139: 981-992 (1984).
125. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 326: 515-517 (1997).
126. Bolton WE, Mikulka WR, Healy CG, Schmittling RJ, Kenyon NS. Expression of Proliferating Associated antigens in the cell cycle of synchronized mammalian cells. *Cytometry* 13: 117-126 (1992).
127. Pellicciari C, Mangiarotti R, Bottone MG, Danova M and Wang E. Identification of resting cells by dual parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* 21: 329-337 (1995).
128. Gavrielli Y, Sherman Y, and Ben Sanson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501 (1992).
129. Brunner ET, Manuel J, Cerotini JC, Chaplup B. Quantitative assay of immune lymphoid cells in ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14: 181-196 (1968).

130. Nicoletti J, Miglioratti G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C. A rapid and simple method for measuring apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J of Immun. Meth* 138: 271-279 (1991).
131. *Current Protocols in Cytometry*. Vol. 1. Chapter 7. Edited by: JP Robinson, Z Daraynkiewicz, PN Dean, LG Dressler, PS Rabinovitch, CC Stewart, HJ Tanke, LL Wheelless. John Wiley & Sons Inc. New York (1997).
132. Gorman AM, Samali A, Mc Gowan AJ and Cotter TG. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry* 29: 97-105 (1997).
133. Vaupel P, Kallinowski F and Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic and microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49: 6449-6465 (1985).
134. *Current protocols in immunology*. De: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. National Inst. of Health (1992).
135. Ruibal B, Riera NE, Bracco MM. Apoptosis. Su papel en la ontogenia del sistema inmune y en la infección por HIV. *Medicina (Bs As)* 54: 661-670 (1994)..
136. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler J and Marrack P. The VB-specific superantigen Staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal. *Cell* 56: 27-30 (1989).
137. Molecular cloning of the complementary DNA of human Tumor Necrosis Factor. *Science* 228: 149-154 (1985).
138. Green LC, Wagner DA, Gloowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tammenhaum SR. Analysis of Nitrate, Nitrite and (15N)Nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982).
139. di Gianni PD, Bonfil RD, Genovese J, Dean G, Meiss RP, Bustuoabad OD. Abrogation of neovascularization in tumor-bearing mice: a putative explanation of concomitant resistance. *J. Exp. Clin. Res.* 14:189-195 (1995).
140. di Gianni PD. Estudio de los factores involucrados en el establecimiento del estado de tumor dormido en metástasis experimentales. Tesis Doctoral UBA. (1996).
141. di Gianni PD, Franco M, Meiss RP, Vanzulli S, Pasqualini CD and Ruggiero RA. Inhibition of spontaneous metastases by a serum factor induced by secondary implants of unrelated murine tumors. Trabajo enviado para su publicación al *Cancer Res* (1998).
142. Southam CM, Brunschwing A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer *Cancer* 14. 971-975 (1961).
143. Southam CM. Co-existence of allogeneic tumor growth and homograft immunity in man. *Eur. J. Cancer* 4 :507-511 (1968).
144. Vaage J and Pepin K. Morphological observations during developing concomitant immunity against a C3H/He mammary tumor. *Cancer Res.* 45: 659-666 (1985).
145. Vagge J. Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity. *Cancer Res.* 33: 493-503 (1973).
146. Howell SR, Dean JH and Law LW. Defects in cell-mediated immunity during growth of a syngeneic simian virus-induced tumor. *Int. J. Cancer* 15: 152-169 (1973).

147. Levenson SM, Hoell JH, Padini NS, Tan MH, Holyoke ED and Goldrosen MH. Correlation between the leukocyte adherence inhibition microassay and in vivo tests of transplantation resistance. *Cancer Res.* 39: 582-586 (1979).
148. Finlay-Jones JJ, Bartholomaeus WN, Fimmel PJ, Keast D and Stanley NF. Biologic and immunologic studies on a murine model of regional lymph node metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 1363-1369 (1980).
149. Vagge J. Host serum factors versus tumor factors in immune resistance to metastases. En: *Cancer Invasion and Metastasis. Biologic Mechanisms and Therapy*, Day SB, Myers W, Stansly P, Garattini S and Lewis M (eds): 305-318, Raven Press, New York (1977)
150. Deckers PJ, Daves RC, Parker GA and Mannok JA. The effect of tumor size on cocombitant tumor immunity. *Cancer Res.* 33: 33-39 (1973).
151. Kearney R and Nelson DS. Concomitant immunity to syngeneic methylcholanthrene-induced tumours in mice. Occurrence and specificity of concomitant immunity. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51: 723-733 (1973).
152. Nomi S, Naito K and Pellis NK. Effects of concomitant and sineconcomitant immunity on postsurgical metastases in mice. *Cancer Res.* 46: 6111-6115 (1986).
153. Woglom WH. Immunity to transplantable tumors. *Cancer Rev.* 4: 129-209 (1929).
154. White RA. A theory for analysis of cell population with non cycling S phase cells. *J. Theor. Biol.* 150: 201-214 (1991).
155. Drewinko B, Ying Yang L, Barlogie B and Trujillo JM. Cultured human tumor cells may be arrested in all stages of the cycle during stationary phase: demonstration of quiescent cells in G₁, S and G₂ phase. *Cell Tissue Kinet.* 17: 453-463 (1984)
156. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker P, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.* 320: 627-633 (1988).
157. Gustafson P, Ferno M, Akerman M, Baldetorp B, Willen H, Killander D and Rydhoim A. Flow cytometric S-phase fraction in soft-tissue sarcoma: prognostic importance analysed in 160 patients. *Br. J. Cancer* 75: 94-100 (1996).
158. Bullough WS. Mitotic control in adult mammalian tissue. *Biol. Rev.* 50 99-127 (1975).
159. Jiirtle RL, Michalopoulos G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res.* 42: 3000-3004 (1982).
160. Moolten FL, Bucker NLR. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross-circulation. *Science* 158: 272-274 (1967).
161. Rotello RJ, Liberman RC, Purchid A and Gerschenion LE. Coordinated apoptosis and cell proliferation by Transforming Growth Factor beta I in cultured uterine epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3412-3415 (1991).
162. Prehn RT. The inhibition of tumor growth by tumor mass. *C. Res.* 51: 2-4 (1991).

PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PREMIOS OBTENIDOS EN RELACION CON EL PRESENTE TRABAJO.

PUBLICACIONES:

- Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Pasqualini CD and Ruggiero RA. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *British Journal of Cancer*, 74: 178-186 (1996).
- Franco M, Beckinschtein P, di Gianni PD, Bustuoabad OD, Vanzulli S, Ruggiero RA. The role of apoptosis in the inhibition of a secondary tumor by concomitant resistance in a mouse model of metastases. *Medicina (Buenos Aires)*, 56: 393-396 (1996).
- Ruggiero RA, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Bonfil D, Franco M, Pasqualini CD. Resistencia concomitante antitumoral. *Boletín de la Ac Nac Medicina* 70: 531-540 (1992).
- Ruggiero RA, di Gianni PD, Franco M, Bustuoabad OD. Resistencia concomitante antitumoral. *Medicina (Bs As)*, 56 (supl. 1): 57-64 (1996).
- Bustuoabad OD, di Gianni PD, Genoves JA, Falco R, Franco M, Ruggiero RA. Rol del tejido conectivo en la relación tumor-huésped. *Medicina (Bs As)*, 56 (supl. 1) : 25-31 (1996)
- Bustuoabad OD, di Gianni PD, Franco M, Ruggiero RA, González M, Pasqualini CD. A variable neovascularization threshold in tumor-bearing mice. *Oncology Reports*, 4: 1005-1010 (1997).
- di Gianni PD, Franco M, Meiss RP, Vanzulli S, Pasqualini CD and Ruggiero RA. Inhibition of spontaneous metastases by a serum factor induced by secondary implants of unrelated murine tumors. *Trabajo enviado para su publicación al Cancer Research* (1998).

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

a) Congresos nacionales:

Comunicaciones al Congreso de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas (SAIC) :

- Franco M, Ruggiero RA. Análisis de la resistencia concomitante inducida por un tumor murino fuertemente inmunogénico. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 52, nº 5, 1992.
- Franco M, Ruggiero RA. Actividad sérica de ratones portadores de un tumor inmunogénico sobre su proliferación in vitro. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 53, supl.II, 1993.
- Franco M, Ruggiero RA. Correlación entre la resistencia concomitante y una actividad sérica inhibitoria en tumores de distintos grados de inmunogenicidad. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 54, nº 5/2, 1994.
- Franco M, Beckinschtein P, di Gianni PD, Nepomnaschy I, Piazzon I, Ruggiero RA. Inducción de apoptosis en un tumor por tratamiento con suero de ratones portadores de tumor. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 55, nº 5/2, 1995.
- Franco M, di Gianni PD, Bustuoabad OD, Piazzon MI, Ruggiero RA. Inducción de alteraciones en el ciclo celular en el tumor secundario LB inhibido por resistencia concomitante. Publicado en Medicina (Buenos Aires), vol 57, supl.4, 1997.
- Giordano M, Palermo, M, Vermeulen M, Franco M, Dran G, Ruggiero RA. Efecto del stress en el desarrollo tumoral de ratones pinealectomizados. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 55, nº 5/2, 1995.
- di Gianni PD, Bustuoabad OD, Franco M, Ruggiero RA. Caracterización del factor inhibidor de la proliferación in vitro de las células del tumor LB. Publicado en: Medicina (Buenos Aires), vol 55, nº 5/2, 1995.
- di Gianni PD, Franco M, Bustuoabad OD, Meiss RP, Ruggiero RA. Inhibición de metástasis espontáneas de un tumor por otro tumor no relacionado en ratones BALB/c. Publicado en Medicina (Buenos Aires), vol 57, supl.4, 1997.

Comunicaciones al Congreso de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI):

- Franco M, Meiss RP, di Gianni PD, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Estudio histológico del segundo implante tumoral inhibido por la resistencia concomitante inducida por un tumor inmunogénico (1996)
- di Gianni PD, Meiss RP, Bustuoabad OD, Franco M, Ruggiero RA. Inhibición de metástasis espontáneas: I) Efecto inhibitorio de las metástasis de un tumor por la presencia de otro tumor inductor de resistencia concomitante (1996)
- di Gianni PD, Meiss RP, Bustuoabad OD, Franco M, Ruggiero RA. Inhibición de metástasis espontáneas: II) Correlación con un factor sérico inhibitorio (1996)

b) Congresos internacionales:

- Franco M, di Gianni PD, Bustuoabad OD, Pasqualini CD, Ruggiero RA. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance induced by murine tumors. Presentado en la *II Convención Latinoamericana de la Escuela Europea de Oncología (ESO)*, realizado en Sao Paulo, Brasil (1997).
- Ruggiero RA, Bonfil D, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Franco M, Pasqualini CD. Resistencia concomitante inducida por tumores inmunogénicos. Presentado en el *III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI)*, realizado en Santiago, Chile (1993).

PREMIOS OBTENIDOS COMO PRIMERA AUTORA:

- Premio "Eufemio Uballes", otorgado por la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, por el trabajo: "Factores inmunológicos y no inmunológicos involucrados en el control del crecimiento tumoral". Franco M, di Gianni PD, Bustuoabad OB, Ruggiero RA, (1993).
- Premio "Bernardino Rivadavia", otorgado por la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, por el trabajo: "Inducción del estado de tumor dormido por resistencia concomitante". Franco M, di Gianni PD, Meiss RP, Bustuoabad OD, Ruggiero RA, (1997).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi especial agradecimiento a Raúl, por haberme guiado y acompañado en esta etapa que fue el inicio de mi carrera como investigadora.

A la Dra Pasqualini, no sólo por haberme abierto las puertas de su laboratorio en un principio, sino, y especialmente, por haberme enriquecido con la convivencia diaria, por los ejemplos que me dio y por su espíritu de constante impulso a la investigación básica, todas cosas estas, que fui valorando en forma creciente con el correr del tiempo.

A Oscar, por su libre espíritu crítico, por la enorme ayuda que me brindó en el laboratorio y por lo que me enseñó.

A Isabel Piazzon, Martín Isturiz, Claudia, Irene, Mirta, Marina y Jorge, por los consejos y el apoyo que me fueron dando a lo largo de estos años.

Al Dr Meiss, por su enorme ayuda en el terreno de la histología y especialmente por todo lo que me enseñó.

A Silvia Vanzulli, por su valiosa ayuda y su apoyo constante.

A Lucas, por sus consejos.

A los Dres Prehn, Stewart y Miguel Angel Basombrió, por su generosa valoración de nuestro trabajo y por alentarme a seguir adelante.

A mi consejera de estudios, Silvia Moreno.

A Carlos, por su paciencia y su ayuda con la PC.

A Analía, por su ayuda con las células endoteliales.

A Javier, por agilizarme las búsquedas bibliográficas.

A Edith, por la revisión de este trabajo.

A Alfredo, Patricio, José, Juan Domingo y Julio, por su enorme y necesario apoyo técnico.

A Antonio, por la labor importantísima que cumple en el bioterio y por su deliciosa compañía.

A Juan Portaluppi, por su solidaridad sin límites y por su eficiencia, que sólo alcanzan aquéllos que aman lo que hacen y que lo convierten en un ser irremplazable.

A mis amigos y compañeros de siempre, Colo, Pedro, Vale, Sandra, Ale, Fernando, Adri, Patri, Fernanda L y Fernanda M, con quienes compartí tantos sueños y tantas pálidas a lo largo de estos años y especialmente a vos, Colo, por tantas otras cosas.

A mis amigos y compañeros más recientes, Pedrito, Gaby, Caro, Paula y Vicky, por traer con ellos, una ráfaga de aire fresco.

A Carina y Sandra, que me acompañaron en mi carrera y en mi vida.

A mis hermanos Mariana y Hernán, especialmente a ella, que a pesar de pertenecer a un área muy distinta, tuvo la dedicación de leer gran parte de esta tesis. El día que terminé este trabajo recibí de vos, Mariana, la mejor noticia; gracias por realizarme esta ilusión.

A Germán, por acompañarme y aguantarme.

A mamá y papá, sin necesidad de enumerar los “por qué”, a quienes dedico este trabajo.

Este trabajo cerró un ciclo en más de un sentido. En su comienzo, la vida me sorprendió duramente. En su conclusión, me regaló una promesa. Este trabajo es un sincero homenaje a la vida que, en tan opuestas situaciones, me sugirió su misteriosa y fuerte naturaleza.