



02406
4
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE FACTORES SECRETADOS POR CELULAS
TUMORALES EN SU PROLIFERACION Y EN EL COMPOR-
TAMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

María del Carmen Mejía Viggiano

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
A).- INMUNIDAD TUMORAL.....	3
a) ANTIGENOS TUMORALES.....	3
b) INMUNIDAD CELULAR.....	4
c) INMUNODEFICIENCIA Y CANCER.....	6
B).- FACTORES DE CRECIMIENTO.....	8
a) FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF).....	10
b) FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFs).....	11
c) FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF).....	14
d) FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF).....	15
e) FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTES (TGFs).....	15
f) PEPTIDOS RELACIONADOS CON EL TGF-BETA.....	20
OBJETIVOS.....	22
METODOLOGIA.....	23
A) .- COLECCION DE LOS PRODUCTOS DEL MELANOMA M-3 Y DE LOS FIBROBLASTOS.....	23
B) .- ESTUDIO "IN VITRO".....	24
C) .- ESTUDIO "IN VIVO".....	27
D) .- ELECTROFORESIS DE LOS MEDIOS DEL MELANOMA M-3 Y DE LOS FIBROBLASTOS SIN SUERO.....	28
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40.

RESUMEN

Los pacientes con cáncer presentan inmunosupresión la cual esta frecuentemente correlacionada con el estudio de la enfermedad y su pronóstico.

La supresión del sistema inmune asociada al cáncer parece ser resultado directo de la presencia de la enfermedad o resultado del tratamiento de esta, más que ser un antecedente o una condición para que se de (Oldham, 1990).

En el presente trabajo se pretendió investigar si los metabolitos liberados en cultivo por un melanoma de ratón (clona M-3, ATCC), estaban asociados con el desarrollo y crecimiento del mismo "in vitro" e "in vivo". Ya que entre los metabolitos liberados por el melanoma se encuentran varios factores de crecimiento transformantes (Benicelli y col. 1989). Se evaluó la respuesta mitogénica a estos metabolitos de varias líneas tumorales y fibroblastos de ratón mediante la incorporación de timidina tritiada. Los resultados (Fig.4) mostraron que la respuesta varió dependiendo de la célula blanco y el tiempo de la observación. No hubo cambios fenotípicos aparentes en los fibroblastos cuando se pusieron en contacto con los metabolitos. El melanoma M-3 fue estimulado con uno de los eluidos, de su medio de cultivo, la fracción B (Fig 3) "in vitro", observación que se correlacionó con el resultado del experimento "in vivo" (Tablas 1 y 2).

Los metabolitos encontrados en la fracción A del eluido del medio de cultivo del melanoma M-3 inhibieron la actividad de los melanocitos M-3 "in vitro", lo cual también sucedió con el experimento "in vivo".

Así mismo se evaluó el efecto de estos metabolitos en linfocitos T Lyt -2 y Lyt -3,-4. Se encontró que ninguna de las fracciones utilizadas en el ensayo "in vivo" estimuló a alguna de las subpoblaciones, mas bien se noto un decremento en la actividad de los mismos.

No existen trabajos que señalen el efecto de los metabolitos tumorales en el desarrollo tumoral "in vivo", o trabajos que discutan el posible papel de estos productos tumorales en células del sistema inmune, de aquí la importancia de los resultados del presente trabajo. Es posible que los factores de crecimiento transformantes u otros productos de las células tumorales sean los responsables de la inmunosupresión presente en pacientes con cáncer, y que estas moléculas sean las mismas que regulen el crecimiento tumoral regulando las funciones de otras células a fin de lograr el establecimiento y éxito del tumor en el huesped.

INTRODUCCION

Las neoplasias estan compuestas de poblaciones celulares heterogeneas. Esta heterogeneidad fue notada primeramente a nivel histologico, ahora se sabe que existe diversidad genetica, bioquimica, enzimatica, inmunologica etc. Un aspecto interesante de la heterogeneidad tumoral es la capacidad de una subpoblacion de celulas tumorales de influir en otras subpoblaciones, tales interacciones pueden modular el crecimiento tumoral, las propiedades inmunologicas y metastasicas, sensibilidad a drogas y la expresion de glicoproteinas de la superficie celular (Sutherland, 1988). El microambiente de las celulas tumorales es importante en determinar sus propiedades fenotipicas, pequenas diferencias en el microambiente pueden originar heterogeneidad dentro de los tumores. Las variaciones en la inervacion tisular, nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, oxigeno, iones inductores y otros posibles reguladores tumorales pueden desestabilizar a las celulas tumorales y determinar su susceptibilidad a cambios geneticos y epigeneticos (Nicolson, 1987).

Los tumores con frecuencia son infiltrados por celulas normales del huésped, como linfocitos, granulocitos, y macrofagos afectando su crecimiento y otras propiedades. Por ejemplo Yamashina y col (1986) encontraron que los macrofagos pueden liberar sustancias mutagenicas como peroxidasas que inducen la formacion de variantes droga-resistentes en un tumor. Es de considerar entonces que el dilucidar las interacciones celula-celula, en particular celula tumoral-celula normal ayudara a desarrollar nuevas estrategias de diagnostico o de terapia en relacion al cancer. Es importante señalar que no existen en la actualidad trabajos que reporten el efecto que tienen los factores de crecimiento de origen tumoral en el sistema inmune, especificamente en las celulas que lo componen. Uno de los objetivos de este trabajo fue el de buscar el posible efecto que pudieran tener los factores de crecimiento asociados al desarrollo del melanoma M-3 de raton en los linfocitos T, por lo que esta introducción se refiere a los avances en relacion a la inmunidad tumoral y a los factores de crecimiento cuyo conocimiento es primordial para el entendimiento del microambiente en torno a un tumor maligno y para los objetivos de este trabajo.

INMUNIDAD TUMORAL

Es difícil precisar la responsabilidad de los distintos mecanismos inmunológicos en el rechazo de tumores. La aparición alta de tumores en individuos inmunosuprimidos y la posibilidad de realizar en algunos modelos animales vacunas preventivas antitumorales o incluso de transferir inmunidad antitumoral mediante células linfoides, sugieren en conjunto la existencia de un control inmunológico del crecimiento de determinados tumores. A partir de las ideas de Burnet se ha perfilado el concepto de vigilancia inmunológica según el cual el sistema inmunológico eliminaría continuamente las células malignas que puedan aparecer en el organismo. Durante mucho tiempo se consideró a las células T preponderantes en el ejercicio de esta vigilancia, actualmente esto se considera poco probable desde la demostración que en ratones desnudos (atímicos) no se desarrollan tumores espontáneos en una frecuencia anormal.

En la actualidad se cree que las células NK ("natural killer") lleven a cabo esta vigilancia, la correlación observada entre la capacidad de rechazar los tumores y el nivel de células NK en distintas cepas de ratones abogaría en favor de esta hipótesis. (Oldham, 1990).

Las células T citotóxicas pueden participar en el rechazo a tumores inducidos por virus (Fuyama y col. 1986) y los anticuerpos podrían intervenir en la prevención de la reaparición de un conjunto de células transformadas o de otras de igual antigenicidad cuando las células T han sido eficaces, también podrían actuar vía células K. Hipotéticamente los tumores humanos clínicamente detectables pueden escapar del control inmunológico por las siguientes causas:

- 1.- Ausencia de inmunogenicidad del tumor, el huésped es incapaz de reconocer a los determinantes antigénicos del tumor, en determinados casos la inmunogenicidad es demasiado baja como para que se pueda montar una respuesta inmunológica.
- 2.- Modulación antigenica, aquí el anticuerpo dirigido a los determinantes propios del tumor induce una redistribución de los antígenos de membrana según el proceso de "capping".
- 3.- Bloqueo de reacciones inmunológicas por anticuerpos facilitadores o por células T supresoras
- 4.- Respuesta tardía o insuficiente debido a la débil inmunogenicidad o gran tamaño del tumor
- 5.- Producción por parte de los tumores de mediadores que inhiben la migración de los macrófagos al tumor.

ANTIGENOS TUMORALES.

Se define clásicamente a un antígeno como toda sustancia que provoca una respuesta inmunitaria y reacciona de modo específico con los productos (anticuerpos y/o células sensibilizadas) generados como consecuencia de dicha respuesta (Sela, y 1969 Kabat, 1976). Los antígenos son reconocidos por su reacción con

anticuerpos o células específicamente sensibilizadas en una forma medible, y pueden distinguirse uno del otro por la elevada especificidad de esas reacciones. Se ha encontrado que los antígenos pueden ser proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, así como complejos de algunos de estos (Nisonoff, 1984). De los cambios moleculares asociados con la transformación neoplásica, la expresión de los antígenos tumorales fue objeto de especial interés hace algunos años debido en gran parte a las posibilidades diagnósticas y de inmunoterapia que su existencia pudiera dar lugar. Estas entidades son frecuentemente descritas como neoantígenos, ya que los determinantes son nuevos con respecto al huésped al tiempo que aparece la neoplasia.

Los antígenos tumorales originan reacciones inmunológicas humorales y celulares análogas a las descritas para el caso de los de injerto. Moore senalo las siguientes definiciones (Castro, 1978) .:

TSA, antígenos tumor específicos, sólo detectables en células tumorales que difieren cualitativamente de los expresados en células normales

TSTA antígenos de transplante asociados a tumor, son tumor específicos capaces de desencadenar el rechazo de la célula que lo posee

TATA antígenos de transplante asociados a tumor, capaces de inducir resistencia al transplante tumoral en recipientes sinténicos

TAA asociados a tumor, ya que en determinadas circunstancias pueden encontrarse en tejidos normales por ejemplo la alfa-feto proteína (aFP) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) ambos se presentan en ciertos estados del desarrollo embrionario, además existen los antígenos inducidos por oncornavirus detectables en células normales antes de la transformación neoplásica (Castro, 1978).

Así mismo existen los antígenos inducidos por oncornavirus y los inducidos químicamente. La característica mas significativa de los tumores inducidos químicamente es su individualidad antigénica. El estudio de los antígenos tumorales mediante la inmunización de huéspedes extraños a partir del suero o de las células del huésped natural permitió establecer una segunda clasificación en la que se distinguen :

Antígenos individuales que se encuentran en los tumores experimentales inducidos químicamente, éstos son inmunógenos débiles y no se ha demostrado su existencia en el hombre.

Antígenos virales encontrados en tumores inducidos por virus oncogénicos de ARN o ADN .

INMUNIDAD CELULAR.

En términos generales se acepta que la respuesta inmune que interviene en el rechazo de tumores sólidos en animales de experimentación, es la misma que causa rechazo del homoinjerto: la hipersensibilidad retardada. No obstante como ya se menciono la citotoxicidad mediada por las células T es un fenómeno importante en el rechazo tumoral. Los tumores pueden dar lugar a diversas reacciones de inmunidad celular, por ejemplo la transformación blastica "in vitro" en presencia de células tumorales, inhibición

de la migración de los macrófagos por el antígeno tumoral y reacciones de hipersensibilidad retardada cutánea.

Además se dan reacciones de citotoxicidad inducidas por las células linfoides frente a algunos tumores sin olvidar que existen células no T capaces de destruir a los tejidos transformados, como las K que pueden destruir al tejido recubierto por IgG y las NK y macrófagos. La demostración de que la inmunidad tumoral puede ser suprimida con el suero de ratones con tumor provee uno de los primeros ejemplos de inmunorregulación por factores solubles, varias explicaciones se propusieron al respecto, por ejemplo la facilitación del crecimiento tumoral por anticuerpos que enmascaran a los determinantes antigenicos tumorales así como la inhibición por antígenos tumorales solubles, complejos antígeno-anticuerpo y factores derivados de las células T. En 1977 Nepom y col. introdujeron el concepto de factores específicos bloqueantes, éstos fueron definidos como factores antígeno-específicos presentes en el suero de huéspedes con tumor, en extractos solubles de tumor o en los sobrenadantes de células T derivadas del huésped con tumor, las cuales suprimen el potencial citostático de las células T inmunes, los autores propusieron que el antígeno actúa como una señal próxima para estimular a las células T que van en turno a frenar la respuesta inmune. Durante los últimos ocho años ha sido aparente que la supresión tumor-específica por las células T y factores derivados de las células T participan de manera importante en el escape del tumor del control inmunológico (Sickler y col. 1991). Se ha propuesto que deben existir diferentes tipos de células T supresoras, una que es inductora que es la que está cercana al tumor y por tanto capta la señal específica que éste pueda transmitirle ésta puede ser el antígeno o complejo antígeno-anticuerpo. Esta célula T supresora inductora tendrá el papel de reclutar otras células T supresoras aceptoras, para que esta comunicación exista deben estar presentes factores solubles, a los que han llamado factores supresores solubles de las células T (TsF) que son antígeno específicos y pueden llevar determinantes codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Finalmente las células T supresoras efectoras son las que inhiben la función de la célula T ayudadora y células preT-asesinas (killer) y otros tipos de células involucradas en la respuesta inmune (Nepom y col, 1983). Tsuda y col. en 1987 investigaron la influencia de la edad en el crecimiento tumoral, inyectando el mismo número de células de melanoma a ratones de diferentes edades, el crecimiento fue lento en los individuos viejos. Así mismo probaron la respuesta de los linfocitos T de cada edad siendo ésta mayor en los individuos jóvenes. Además encontraron un crecimiento lento en animales jóvenes tratados con suero anti-teta o timectomizados y una transferencia de la velocidad de crecimiento con células del bazo que disminuía en jóvenes al ser recipientes de células de bazo de ratones viejos. Se ha señalado que cuando la respuesta inmune se ha determinado por la interacción de los antígenos tumorales con el sistema inmune, los tumores de poca antigenicidad producidos por un débil estímulo oncogénico tienden a ser dependientes de una respuesta inmune del huésped inusual, que

la facilita el crecimiento, contrariamente los tumores altamente antigénicos que son producidos con frecuencia por un fuerte estímulo oncogénico pueden ser facilitados a medida que se reduce la respuesta inmune. (Prehn & Prehn 1987). Estas observaciones han generado varios trabajos como de la relación entre las inmunogenicidades de los tumores y los periodos latentes de su inducción en el huésped, susceptibilidad a la oncogénesis con dosis variables de metilcolantreno (MCA), el efecto de la timestomía, el cual produce hiperplasias autoinmunes. DiGiacomo y North en 1986 reportan la aparición de células T supresoras de dos tipos, uno durante el desarrollo temprano del tumor el cual decae al sexto día del desarrollo, estas células se definieron por su habilidad para transferir pasivamente la supresión de la expresión de la DNT (hipersensibilidad retardada) dirigida a antígenos tumorales en ratones inmunizados, el fenotipo de estas células fue Lyt-1-2+ y fueron sensibles a bajas dosis de ciclofosfamida. El otro tipo de células T supresoras aparecieron después del noveno día de crecimiento tumoral y se definieron por su habilidad para inhibir la expresión de inmunidad adoptiva en contra de organismos con tumor deficientes en células T, este tipo de células presentaron este fenotipo Lyt-1+2- L3T4+ y fueron menos sensibles a la ciclofosfamida. Los autores argumentaron con estos hallazgos que parecería probable que el segundo tipo de linfocitos fueran los responsables del escape tumoral ya que este puede suprimir la expresión de un poderoso mecanismo de inmunidad antitumoral en ratones recipientes y es generada progresivamente conforme el huésped pierde la inmunidad concomitante. En contraste los otros linfocitos no suprimen la expresión de la inmunidad a un mismo implante. Por otro lado se ha demostrado que los nodulos linfáticos cercanos a un tumor de melanoma responden menos a mitógenos, aloantígenos e interleucina-2 (Hoon y col. 1987b).

INMUNODEFICIENCIA Y CÁNCER:

La mayoría de los estudios en los cánceres comunes revelan que la inmunodeficiencia se origina secundariamente como consecuencia del cáncer y de las terapias a las que se ven sometidos los pacientes con tal padecimiento, el cáncer por si mismo es una enfermedad inmunosupresiva. La inmunodeficiencia asociada al cáncer puede estar influenciada además por la edad, la constitución genética de cada organismo, así como factores ambientales tales como el estado nutricional, estrés e infecciones (Oldham, 1990). No obstante estas observaciones no son satisfactorias, realmente no se conoce aun el mecanismo que origina la inmunosupresión en los individuos con cáncer. Schuler y col. (Oldham, 1990) proponen que esta inmunosupresión es el resultado de una serie de interacciones y que existen cinco factores principales :

- 1.- La proporción y el número absoluto de células efectoras circulantes intratumorales o en otros tejidos
- 2.- La capacidad funcional intrínseca de las células efectoras
- 3.- La influencia inmunoregulatoria de las células T ayudadoras y T supresoras

- 4.- La influencia inmunorregulatoria de factores locales y sistémicos
- 5.- La influencia del tratamiento sistémico.

En la actualidad existen mas evidencias del papel de los monocitos y macrófagos en la aparición de la depresión inmune que el que juegan los linfocitos T aunque se ha encontrado que la relación linfocitos T-inductores/linfocitos T-citotóxicos-supresores esta deprimida en individuos con cancer muy avanzado. Pocos reportes habian de la participación supresora de los linfocitos en el cancer. Como ya se menciono la respuesta inmune celular que se da a tumores es generalmente la hipersensibilidad retardada (DHT), esto ha servido para realizar estudios en pacientes encontrándose que a medida que el cancer aumenta la prueba a DHT disminuye influyendo el tipo de tumor y los elementos ambientales (Oldham, 1990). En general no se ha encontrado correlación entre la participación de las células del sistema inmune y la inmunosupresión ya que todos los hallazgos revelan que el papel de cada una de ellas depende de factores múltiples entre ellos los ya mencionados, el estado general del enfermo, su constitución genética, el tratamiento (radioterapia y quimioterapia), alimentación etc. Se menciona asimismo la participación de factores solubles, ya que algunos estudios con el suero de individuos con cancer muestran su actividad deprimiendo la respuesta de los linfocitos de individuos sanos a mitógenos y antígenos entre estos factores podemos mencionar a la glicoproteína ácida alfa-1, las alfa-globulinas, la proteína reactiva C y los complejos inmunes. Sin embargo no obstante estos avances, con las pruebas que se realizan "in vitro" e "in vivo" para probar la inmunocompetencia es imposible determinar la etiología de la inmunosupresión.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Las células normales tienen dos modos alternativos de existencia, un estado letárgico y un estado proliferativo. El crecimiento y la división de esas células normales están regulados por la acción de varios estimuladores e inhibidores endógenos. En contraste la mayoría de las células de fuente neoplásica son relativamente insensibles al programa regulador y son incapaces de cambiar al estado de letargo. Las células malignas se caracterizan por su alta actividad mitogénica, su crecimiento desorganizado y la capacidad para invadir los tejidos normales que las rodean "in vivo". La invasión y la metástasis requieren la liberación de las células, la degradación de membranas basales, la intrusión de células malignas dentro del tejido conectivo y su expansión por medio de los sistemas linfático y circulatorio. Esos procesos son en su mayoría mediados por enzimas proteolíticas producidos por estas células así como por otro tipo de proteínas dentro de las cuales se encuentran varios factores de crecimiento (Nicolson, 1982). La proliferación celular está regulada por varios polipeptidos que funcionan como reguladores de crecimiento inhibiéndolo o estimulándolo. El efecto que ejercen estos está mediado vía receptores, sin embargo el mecanismo molecular de su acción aun no está bien estudiado, no obstante se ha mencionado la intervención de mecanismos que involucran al inositol trifosfato, al calcio, al sodio y al potasio existiendo primero un señalamiento postreceptor, que altera los patrones de expresión genética, segundo el complejo ligando-receptor se internalizan y degradan lo que da una modulación del receptor o una baja regulación que puede actuar en forma de retroalimentación negativa (Green, 1989 y Lahio & Keski-Oja 1989). Se sabe poco acerca de los componentes transmembrana, varios receptores tienen dominios citoplasmáticos con actividad cinasa que fosforilizan moléculas en sus residuos tirosina. Existe además otra categoría de receptores los cuales interactúan con la guanina, una de tales enzimas implicadas en la transducción es la fosfoinositidasa C (PIC) cuya actividad genera dos segundos mensajeros, uno que moviliza a los iones calcio mientras que el otro activa a la proteína cinasa C, que a su vez fosforila a varias otras proteínas, los eventos siguientes permanecen sin esclarecer. Parece ser que la proteína cinasa C es una familia de al menos 7 isoenzimas que difieren en sus actividades bioquímicas y distribución en el tejido. A pesar del dogma central de la transducción de señal de los factores reguladores a nivel de membrana, en que se inicia solamente por la interacción de los receptores y el ligando en la superficie celular, ahora se concibe que puedan existir sitios de unión a nivel del núcleo (Green, 1989). Hay evidencia de que los efectos de un particular factor regulador son dependientes de los que ejercen otras moléculas semejantes. Por ejemplo el TGF-beta estimula la proliferación de los fibroblastos en presencia de PDGF pero ejerce un efecto opuesto si el EGF está presente. Así pues la multitud de señales a las

cuales las células están continuamente expuestas pueden ser vistas como un lenguaje en el cual, como todos los lenguajes el contenido de algún mensaje individual depende de su coexistencia. Así mismo estos factores pueden influir en las características de las células afectando la estructura de la matriz extracelular pudiendo aumentar o disminuir las interacciones de las células con el sustrato de crecimiento, recientes trabajos han reportado que pueden modular la expresión de enzimas proteolíticas tan necesarias para el proceso invasivo como ya se mencionó, de esta forma podemos suponer que la acción de estos factores producidos por células malignas está encaminada al éxito de estas en su huésped, una forma de lograrlo es modulando la proliferación de las células normales adyacentes de cualquier tipo de tejido incluyendo por supuesto a aquellas células involucradas en la defensa del organismo. Green (1989) define a los factores de crecimiento como péptidos de bajo peso molecular, usualmente menores de 80 KD, con un rango de acción corto, receptores de superficie de alta afinidad y con habilidad para afectar la diferenciación y la proliferación celular. Dentro de este grupo el término citocina (o monocina para linfocitos) es usado para describir un juego de péptidos con efectos regulatorios y distinguirlos de los factores de crecimiento que modulan la proliferación de células no pertenecientes al sistema inmune. La distinción entre citocinas y factores de crecimiento cada vez es menor ya que los dos tipos de moléculas tienen muchas similitudes, muchas citocinas actúan sobre las células que no pertenecen al sistema inmune. La mayoría de estas moléculas son glicosiladas lo cual resulta en heterogeneidad en el peso molecular, aunque la función de estas porciones es aun desconocida. Estos péptidos regulatorios son denominados de acuerdo a la función biológica que desempeñen, aunque aparentemente la mayoría de ellos son moléculas multifuncionales. El término de factor de crecimiento se le ha dado a un péptido que tenga la habilidad de aumentar el crecimiento celular, muchos de estos se han identificado en sangre, suero, fluidos de tejidos y extractos celulares (Todaro y Col. 1969). Otras moléculas importantes en la regulación del crecimiento son los inhibidores de este que también son polipéptidos. El trastorno del crecimiento celular probablemente resulta de las alteraciones cuantitativas entre las señales estimuladoras y las inhibitorias. Así tanto el aumento de las señales estimulantes como la disminución de las inhibitorias pueden contribuir al fenómeno canceroso. Los receptores para esos polipéptidos funcionan como tirosinas cinasas, encontrándose similitud entre los factores de crecimiento a sus receptores y las proteínas producidas por oncogenes (Koski-Oja & Moses, 1987). Los factores de crecimiento que parecen tener un papel importante en ciertos tipos de cáncer son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformantes (FGF) el factor derivado de plaquetas (PDGF) y factores semejantes a la insulina. A continuación se detallará cada uno de los factores de los que se tiene mayor conocimiento hasta la actualidad.

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF)

El EGF es un polipeptido de aproximadamente 6 Kd (Mr=6045) el cual estimula o inhibe la proliferación de una amplia variedad de células, aunque la naturaleza exacta de su función todavía no es clara debido a su difícil extracción aun de las glándulas salivales del ratón que es el sitio de mayor síntesis de este péptido, el EGF funciona de manera autócrina y paracrina (Okeefe y col. 1974).

Este polipeptido que media su respuesta por una glicoproteína de membrana, que es su receptor compuesto de 1160 residuos aminoácidos que están precedidos en el lado amino terminal por un péptido señal de 24 aminoácidos hidrofóbicos. La señal pasa después dentro de la membrana del retículo endoplásmico. El receptor suero está compuesto de tres elementos estructurales: un dominio extracelular compuesto de 671 aminoácidos anclado a la membrana plasmática por una región transmembrana de 23 aminoácidos hidrofóbicos, esta está seguida por una secuencia de residuos aminoácidos básicos, característica común de muchas proteínas de membrana. El dominio del citoplasma está compuesto de 542 aminoácidos, este contiene una región de 30 aminoácidos que es homólogo al dominio catalítico de la proteína tirosina cinasa codificada por la familia de los oncogenes src. La unión del EGF al receptor induce la activación de la tirosina cinasa, la cual fosforila varias proteínas celulares así como al propio receptor. Una característica notable del dominio extracelular es su alta proporción de residuos de cisteína agrupados en dos regiones, cada una de 16 aminoácidos de largo, los cuales también se encuentran en el receptor de la insulina. Numerosos estudios sugieren que el receptor para EGF puede jugar un papel importante en la oncogénesis a través de un mecanismo autócrino (Yung y col. 1989 y Nugent y col. 1989).

Se ha mostrado que el gene para este receptor está amplificado y rearrreglado en muchos tumores cerebrales de origen glial, la sobreexpresión puede participar en el desarrollo o progresión de esos tumores. (Yen y col. 1981). Existen además dos estados de afinidad en el receptor, los sitios de alta afinidad usualmente representan del 5 al 1 % del total de la población del receptor, dependiendo del tipo de célula esto está bien correlacionado con la ocupación óptima requerida para iniciar la síntesis de ADN, se ha sugerido que los sitios de alta afinidad participan en el señalamiento de la actividad mitogénica. El dominio de unión extracelular está conectado a la región cinasa citoplásmica por una sola región transmembrana, en contraste con las otras proteínas transmembrana, que están también involucradas en un señalamiento a través de la membrana plasmática y que usualmente atraviesan la bicapa lipídica más de una vez. Como muchas otras proteínas sericas el EGF es internalizado por endocitosis mediada por receptor, el EGF parece facilitar la entrada de su receptor dentro de las vesículas. Por todas las características encontradas en el receptor para EGF se dice que es una proteína alosterica multifuncional con varios sitios regulatorios, que modulan varias de sus funciones, como la afinidad del ligando, agrupamiento del receptor, endocitosis del receptor, endocitosis, actividad de

proteína tirosina cinasa y el estado de fosforilación del receptor (Schelessinger, 1988). Como ya se ha mencionado el EGF se ha asociado con el proceso de la carcinogénesis (Stoscheck & King Jr. 1986, Twardzik y col. 1985, y Yung y col. 1989), la adición de EGF a células normales exhibe ciertas respuestas las cuales están asociadas con la transformación neoplásica, por ejemplo induce una parcial pérdida, de la inhibición del crecimiento por contacto, pérdida de la fibronectina, aumento en la secreción de activador de plasminogeno, incremento en el nivel de proteínas fosforilasas, incremento en el metabolismo celular incluyendo el transporte de azúcares y aminoácidos, cambio de ATP y actividad ornitín descarboxilasa, así mismo induce la expresión de ARNm de los protooncogenes *c-fos* y *c-myc*. El EGF aumenta la transformación viral de las células pero no la promueve ya que no estimula el crecimiento de las células normales o transformadas por virus, y el tiempo requerido para la transformación no se acelera. La transformación de las células normales en contraste a ciertas líneas ya establecidas requiere la presencia de al menos dos oncogenes complementarios, así el EGF puede sustituir a un segundo oncogene. Alternativamente el EGF puede ser un amplificador de la función ras, aumenta la actividad de la unión del nucleótido guanina de las proteínas transformantes ras, así como aumenta la fosforilación de al menos uno de ellos (Green, 1989).

FACTORES DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFs):

Existen el ácido y el básico, ambos muy relacionados entre sí de peso molecular de 16 KD, actúan como potentes mitógenos y factores de diferenciación para una amplia variedad de células derivadas de neuroectodermo y mesodermo. El FGF básico tiene un punto isoelectrico de 9.6 y fue primeramente identificado por su habilidad para causar la proliferación y diferenciación fenotípica de los fibroblastos 3T3. El FGF ácido con punto isoelectrico de 5.6 fue identificado por su habilidad para causar la proliferación y la diferenciación retrasada de mioblastos por Gospodarowicz en 1975 y estimula la proliferación en células epiteliales por Lemmon y col. en 1978. Actualmente ambos factores se han purificado y secuenciado, así como el ADN se ha clonado (Gospodarowicz, 1980). Los dos FGF son multifuncionales, ya que ellos pueden estimular la proliferación y la diferenciación, sin embargo el mecanismo de su acción como en todos los factores de crecimiento está por determinarse. El factor de crecimiento de fibroblastos básico es al que más propiedades se le ha encontrado, se ha purificado de tejidos derivados del neuroectodermo o del mesodermo o células que tienen un potencial angiogénico común. Este factor consta de una sola cadena compuesta de 146 residuos aminoácidos, existiendo una forma alternativa que carece de 15 aminoácidos del lado amino terminal la cual también es activa, esto indica que esta región no está involucrada en la función biológica ni en la unión con el receptor. El FGF ácido también existe en una forma alternativa truncada en la región amino terminal pero solo de 6 aminoácidos, así pues se ve que también aquí existe homología entre los dos factores, que se proponen derivan de un gen ancestral común, siendo

el básico el mas conservado durante la evolucion pues el bovino y el humano presentan una homologia del 98.7% y una homologia de casi el 99% del bovino con el de las aves. Los genes de ambos factores se han clonado, describiendose ademas su organizacion genómica; el básico tiene dos exones ampliamente separados por dos intrones, el primero de los cuales separa a los exones 6 y 61 y el segundo separa a los exones 94 y 95. El ácido tienen una organizacion similar. El mapeo con enzimas de restriccion indica que su tamaño es mayor de 38 pares de kilobases, los análisis de "Southern blot" indican que existe un solo gene para cada factor. El gene para el FGF básico esta localizado en el cromosoma numero 4c del hombre, mientras que el ácido esta en el cromosoma 5. Esto sugiere que a través de un proceso de duplicación genética y divergencia evolutiva ambos genes se separaron. En cultivo se ha observado que el FGF básico da lugar a dos ARNm uno de 3.7 Kb y otro de 7 Kb, en tanto que para el ácido solo se ha encontrado uno de 4.8 Kb. El producto de translacion de ambos FGF esta compuesto de 155 aminoácidos, para la maduración del básico se cortan 9 residuos y para el ácido 15. Todos los tejidos que contienen FGF básico son muy vascularizados, esto sugirió que tal vez las células endoteliales podrian sintetizarlo, el gen se ha encontrado en estas células, así pudiera pensarse que este factor actue en forma autócrina para células del endotelio vascular, se ha sugerido que en especial este factor básico pueda participar en los fenómenos de carcinogenesis. En cuanto a las funciones encontradas en estos factores de crecimiento, la mayoría como ya se menciono han sido halladas en el FGF básico y podemos mencionar las siguientes: incrementa la fluidez de la membrana y la actividad en "ruffling," eventos correlacionados con cambios en la dinámica y estructura del citoesqueleto, estimula la síntesis de proteínas específicas, la mayoría de estas son secretadas, como por ejemplo la MEP que es una catepsina tior dependiente. Otra glicoproteína secretada es la MRP que es miembro de las hormonas de crecimiento y es idéntica a la proliferina, ambas se ha propuesto actuan como mensajeros intracelulares como reguladores paracrinos. Así mismo el FGF regula la expresion de oncogenes celulares en particular de los c-fos y c-myc, el primero involucrado en la diferenciación celular y el segundo en la proliferación, la activación de c-fos es directa a diferencia de la del c-myc. Estudios "in vitro" también se han realizado en su mayoría también con la forma básica, aunque las funciones de ambos, el ácido y el básico son semejantes como estabilizar la expresión fenotípica de los cultivos. El FGF básico induce a las células endoteliales a invadir una matriz colágena tridimensional y organizarse para formar tubos que semejen vasos capilares, asimismo este factor estimula procesos característicos de la angiogenesis "in vivo" como la migración de las células endoteliales y la producción de activador de plasminogeno. El FGF básico también actúa como factor de diferenciación de varias células como condrocitos, astrocitos y oligodendrocitos induciendo actividad ornitina descarboxilasa, no todos los efectos de este factor son estimulantes y como ejemplo esta que puede retrasar la diferenciación y la fusión de mioblastos diploides, en algunas

líneas de mioblastos puede decrementar la actividad de la expresión de la creatina fosfoquinasa, además retrasa el envejecimiento de células cultivadas como las granulosa, de la corteza adrenal, y epiteliales, ya que si se limita este factor estas células disminuyen su vida media, mientras que en su presencia pueden proliferar más de 20 generaciones. La heparina puede modificar la acción de estos factores, en cultivo de células endoteliales umbilicales humanas y células PC12 potencia la actividad mitogénica de estos factores. El sulfato de protamina puede también modificar la respuesta biológica a los FGF, pues se ha encontrado que inhibe la respuesta angiogénica de células endoteliales vasculares, este efecto es reversible, además inhibe la unión de ambos factores con sus receptores de membrana lo cual disminuye la actividad mitótica en estos. En contraste sucede con el EGF el cual se ve potenciado en su actividad mitogénica con esta sustancia. Otro factor, el TGF beta puede modular la acción de los FGF dependiendo de la célula blanco de la que se trate por ejemplo potencia la actividad mitogénica del FGF básico en osteoblastos y la inhibe en células epiteliales. Debido a que el TGF beta y los FGF pueden interactuar a nivel celular para modular el crecimiento, se sugiere que muchas de sus actividades biológicas de los TGF observadas "in vitro" e "in vivo" pueden estar moduladas por la presencia de TGF-beta u otras moléculas relacionadas (Olli y col. 1987). Es posible que los FGF estén involucrados en los procesos de diferenciación y proliferación durante el desarrollo embrionario (Olwin & Hauschka, 1990), en la interacción de las células con la matriz extracelular recién formada para adquirir un nuevo fenotipo, existe por lo tanto la posibilidad de que los FGF sean secretados por las células en asociación con los componentes de la matriz extracelular y sean una parte integral o un producto de la hidrólisis de esta. Entre las funciones regulatorias de estas moléculas podemos mencionar las siguientes: el FGF básico puede incrementar la liberación de prolactina y decrementar el nivel basal de la hormona de crecimiento en células de pituitaria anterior de rata, el FGF básico inhibe la inducción mediada por FSH del receptor LH. En los estados embrionarios tempranos se ha encontrado que el FGF básico actúa como un factor primordial de diferenciación, induciendo al ectodermo a convertirse en mesodermo, en anfibios puede promover la regeneración de miembros, esto apoya el hecho de que este factor pueda estar involucrado en el control neurotrópico de este proceso, así como a estar involucrado en el desarrollo del sistema nervioso en el estado embrionario, lo cual se ve apoyado por el hecho de que se ha encontrado en células nerviosas. Así mismo el FGF básico se ha encontrado en macrófagos y en otras células involucradas en la restauración y limpieza de los tejidos, de la misma forma se ha encontrado interviene en la formación de tejido granuloso "in vivo" y en la función sintética de fibroblastos y mioblastos, y por que promueve la condroosificación se piensa también pueda intervenir en el desarrollo del sistema óseo. Además actúa como un potente factor angiogénico "in vivo". Se ha demostrado que este factor básico es semejante al factor angiogénico tumoral (Folkman y col. 1980), por lo tanto también participa en la

progresión tumoral pues también es un potente mitógeno para células tumorales (Gospodarowicz, 1988).

FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF):

Este factor fue descubierto a finales de los años cuarenta. Se ha identificado en una amplia variedad de tejidos de vertebrados en su mayoría en muy bajas concentraciones, sin embargo existen dos fuentes principales de este, como son la glándula submaxilar del ratón y de la glándula del veneno de serpientes de las familias Crotlidae, Viperidae y Elapidae (Bradshaw, 1978, Schwartz & Costa, 1978). Además el gene para el precursor del monomero beta del NGF murino ha sido clonado, lo que en tiempos futuros no muy lejanos, permitirá la síntesis de este en altas concentraciones. (Petrides & Shooter, 1986). El NGF que mas se ha caracterizado es el extraído de la glándula submaxilar del ratón. Este está formado por tres cadenas, la estequiometria es de dos alfa, una beta y dos gama, la subunidad beta es un dímero de cadenas idénticas que mantiene un eje de simetría. El peso molecular de la alfa y la gama es de aproximadamente 26 Kd, el peso molecular combinado es de 2618. Las tres cadenas difieren en sus puntos isoelectricos lo que permite su completa separación por cromatografía de intercambio iónico, de las tres subunidades solo la beta posee características de promover el crecimiento nervioso y mantener las neuronas adrenérgicas "in vitro", por lo tanto no es claro el porque existe asociada a las otras subunidades (Kromer, 1986). En la subunidad alfa se ha demostrado que no existe actividad biológica aunque es una proteína serica y tiene partes homologas con la tripsina bovina, además es similar a la proteína de unión encontrada en el EGF.

Se ha mostrado que el NGF aumenta el crecimiento de ganglios simpáticos "in vitro" e "in vivo" y exhibe un sobrecrecimiento de ganglios simpáticos y sensoriales embrionarios "in vitro". El significado biológico de esta proteína se ha demostrado por la rápida generación del sistema nervioso simpático de animales inyectados con anticuerpo a NGF, por los marcados efectos del NGF durante el metabolismo del sistema nervioso "in vitro" y por su amplia distribución en tejidos y fluidos del cuerpo de todos los mamíferos que han sido examinados. Sus efectos metabólicos en el sistema nervioso han sido bien documentados (Petrides & Shooter, 1986). Angletti y Levi-Montalcini y Partlow mostraron que el NGF estimula muchos de los procesos anabólicos de neuronas sensoriales y simpáticas embrionarias. En particular se han hecho estudios sobre la toma de la uridina y la síntesis de ARN, proteinasas y lípidos así como la toma y metabolismo de la glucosa (Frazier y col. 1977). Por otro lado se ha demostrado que la inyección intravascular por periodos prolongados de tiempo de este factor en roedores neonatales eleva la biosíntesis de la enzima para la acetilcolina; la acetilcolintransferasa en el septum y en el hipocampo y en adultos a menos que exista una lesión parcial de los patrones axonales del septo o del hipocampo (Kromer, 1986).

Como con otros factores de crecimiento en el caso del NGF se

conoce mucho acerca de sus funciones pero no de su mecanismo de acción. En general se sugiere una interacción del receptor de la membrana plasmática con el NGF, una internalización e unión con el segundo receptor el cual está localizado en el núcleo (Bradshaw, 1978). La comparación de los efectos fisiológicos del NGF con los otros factores tróficos sugirió que muchas de las propiedades fueron semejantes a las de la insulina, por ejemplo la insulina en altas concentraciones puede estimular la toma de la uridina, la síntesis de macromoléculas y la energía del metabolismo de las neuronas sensibles al NGF (Frazier, 1977 y Muller, 1977). Por estas características se cree que la insulina junto con otros factores de crecimiento se originaron de un ancestro común, por lo que se habla también de factores tipo insulina a los que nos referiremos a continuación.

FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGFs) :

Existen dos polipéptidos estructuralmente relacionados, el IGF-I y el IGF-II que modulan el crecimiento y la proliferación y que pueden sustituir a la insulina en este papel el requerimiento que tienen casi todas las células para estos factores sugiere que sus funciones biológicas satisfacen necesidades específicas que no son cubiertas por otras hormonas o factores de crecimiento, sin embargo existen paradojas en cuanto a su importancia, por ejemplo en el hombre la concentración de IGF circulante es 1000 veces más alta que la de la insulina, pero a diferencia de lo que sucede en la insulina la actividad biológica del IGF en el suero está restringida por proteínas que se unen a ella. La hipoglicemia mediada por la insulina en ratas es mimetizada más potentemente por el IGF-I que por el IGF-II. El IGF-I también difiere en que su síntesis depende de la hormona de crecimiento y parece ser más efectiva en promover el crecimiento animal (Czech, 1989).

FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTES (TGFs) :

Los TGFs corresponden una familia de polipéptidos de peso molecular bajo (de 5000 a 25000), que tienen dos características, la primera es su habilidad para transformar reversiblemente células normales asumiendo una apariencia similar a la de las células neoplásicas y la segunda es que estimulan reversiblemente el crecimiento de las células en forma independiente del anclaje en medio semisólido, estas propiedades causaron considerable interés en esos factores (Tucker y col. 1983). Los TGFs han sido operacionalmente definidos como péptidos que reversiblemente inducen a células no neoplásicas a expresar el fenotipo transformado, medido por la pérdida de la inhibición de crecimiento por contacto y la adquisición de crecimiento independiente del anclaje (Roberts, 1985).

Según Sporn y Todaro (1980) un polipéptido de este tipo debe reunir al menos las siguientes propiedades:

- 1.- ser un potente mitógeno y causar el sobrecrecimiento de las células en un monocapa de cultivo
- 2.- causar la transformación morfológica de células normales

- 3.- promover el crecimiento independiente del anclaje
- 4.- ser producido por la célula transformada que lo utiliza, en cuyo caso se hablaría de una secreción autócrina.

Dos tipos de TGFs, el alfa y el beta pueden ser distinguidos química y biológicamente. Cuando varias células tumorales humanas fueron examinadas para buscar receptores para el EGF, se encontró que ciertas líneas celulares, como la línea de carcinoma epidermoide A431 tiene altos niveles de estos, mientras que otros carcinomas, algunos sarcomas y casi todos los melanomas humanos tienen un fenotipo como el de las células murinas transformadas por retrovirus, pero no las células transformadas por ADN virus, estuvieran produciendo un factor del tipo del EGF capaz de actuar con el receptor, haciendo por lo tanto imposible la unión de un ligando añadido externamente, fue así como se encontró al TGF-alfa. Un factor estimulante del crecimiento que pudiera competir con el EGF por la unión al receptor y pudiera estimular a células normales a crecer en monocapa y en medio semisólido fue detectado y purificado basándose en ensayos de radioreceptor y ensayos de estimulación de crecimiento, este factor fue originalmente llamado factor de crecimiento del sarcoma (SGF) por Todaro y De Larco en 1978 (Fanger y col. 1986). Este pudo estimular la división celular e inducir a células de riñón de rata a crecer en medio semisólido. Además se encontró a otro factor de crecimiento en el medio sin suero del sarcoma, el cual incrementaba el tamaño de las colonias celulares pero no tenía actividad estimulante del crecimiento a menos que se añadiera el EGF, a este factor se le llamo TGF-beta. Por otro lado Holley en 1983 había encontrado un factor al que llamo GI en la línea BSC-1 del mono verde africano con efectos antagonicos parecidos a los que presenta el TGF-beta, posteriormente fue comprobada su identidad por Moses en 1984. Así mismo Iwata y col. en 1985 reportan inhibidores de crecimiento en un rhabdomyosarcoma humano, que compiten con los receptores del EGF y que también reversiblemente confieren un fenotipo transformado a células normales, estos factores inhiben el crecimiento de varios tumores humanos, pero no de fibroblastos humanos o células epiteliales.

El TGF-alfa con un peso de 6000 es ácido y termoestable, produce profundos cambios morfológicos en fibroblastos de rata y humanos, y promueve que células normales crezcan independientemente del anclaje y en medio semisólido esta propiedad es reversible ya que si se colocan colonias de fibroblastos creciendo en medio semisólido en cultivo de monocapa y en ausencia de TGF-alfa, crecen como células normales con inhibición del crecimiento por contacto (Assoian, 1986). El TGF-alfa ha sido clonado y secuenciado a partir de células de rata transformadas por el virus del sarcoma de Snyder Theilen. Tiene 50 aminoácidos con puentes disulfuro, a diferencia del EGF este no tiene triptofano o metionina. Las secuencias del TGF-alfa de la rata y el EGF del ratón y humano pueden alinearse de tal manera que los residuos cisteína exhiban posiciones homólogas insertando solo una delección entre los residuos 20 y 21 del TGF-alfa de la rata, la carencia de grupos sulfihidrido libres y la presencia de seis residuos de cisteína sugiere tres puentes

disulfuro en este polipeptido supuestamente colocado en la misma posición que en el EGF. El TGF-alfa de la rata contiene los residuos necesarios para mantener una conformación que es esencial para el reconocimiento del receptor del EGF las diferencias mas sobresalientes entre el EGF y el TGF-alfa las podemos resumir en el siguiente cuadro:

	EGF	TGF
Aminoácidos	53	5
Punto isoelectrico	4.5	4.8
producido por células tumorales	no	si
conservación de secuencia	70%	90%

Casi todos los hallazgos del TGF-alfa se han hecho con el sintético, a partir de la secuencia de aminoácidos, estos hallazgos poseen propiedades químicas y biológicas indistinguibles de las del TGF-alfa natural, lo que da una idea convincente de que la estructura química es la correcta en base a la secuenciación que propuso Maquard 1984. Además debido a que el TGF sintético carece de contaminantes, sus propiedades biológicas deben ser enteramente debidas a la estructura propia del TGF. El hecho de que las células transformadas produzcan no solo el TGF de 5 aminoácidos, sino también formas de alto peso molecular, hizo que se hiciera un análisis de ADNc. Se aisló un ADNc a partir de una biblioteca hecha de células de rata transformadas. El TGF-alfa es inicialmente sintetizado como una proteína larga, probablemente la transcripción empieza con la metionina en posición -38, el que esta proteína corresponda al iniciador es sugerido por el hecho de que este codón esta precedido por una adenina, tres residuos "upstream" y es inmediatamente seguido por una guanina, estas son características comunes de los codones de inicio en muchos ARNm de eucariotes superiores. En adición la metionina en la posición -38 es seguida por una región de aproximadamente 2 a 25 aminoácidos hidrofobos y sin carga, lo que es característico de los péptidos de señal. Además una metionina en posición analoga se ha sugerido es el inicio del precursor del TGF-alfa humano, comparando las clones del TGF-a humano y de rata se sugiere que las secuencias divergen considerablemente solo "upstream" de la metionina. La secuencia de nucleótidos del ADNc de la rata predice que el TGF-alfa de 5 aminoácidos es seguido por una porción hidrofóbica de aproximadamente 3 aminoácidos extendiéndose entre las posiciones +59 y +67. Esta región hidrofóbica es precedida por residuos básicos parecidos (Lys-115 y Arg-116), y es analoga a regiones intramembrana de proteínas integrales, este carazon hidrofóbico es seguido por una secuencia carboxi terminal de 14 aminoácidos que es particularmente rica en residuos de cisteína. La forma mas grande del TGF-alfa predicha por la secuencia de nucleótidos del pRTGF02, sugiere un papel inesperado hasta ahora para el TGF-alfa, como una proteína integral de membrana. La liberación de un factor de crecimiento de 5 aminoácidos puede a través de la acción de una

proteasa nueva que pueda romper un puente alanina-valina en ambos lados del carboxiterminal, este tipo de rompimiento es distinto del proceso que se lleva a cabo en la mayoría de las hormonas, el cual ocurre en un solo o residuos pareados. Una comparación de las secuencias de aminoácidos de los precursores predichos para las clonas ADNC de rata y humano revela que aunque el precursor entero está poco conservado el polipeptido carboxiterminal rico en cisteína es la parte altamente conservada de la molécula, este último polipeptido tiene un solo cambio conservativo en la posición 98 de isoleucina a valina, por lo tanto esta más altamente conservado que el TGF- α de 50 aminoácidos el cual tiene cuatro diferencias. La posición de este polipeptido relativo al corazón transmembrana sugiere que este se extiende en el citoplasma, esta fuerte conservación de secuencias implica que tienen una función importante. La presencia de residuos básicos pareados en cada final del corazón hidrofóbico sugiere la posibilidad de que una segunda proteasa, a serina, pueda liberar no solo el TGF- α fuera de la membrana sino también un polipeptido rico en cisteína dentro del citoplasma, el cual puede funcionar como una señal para eventos que ocurran en la membrana.

Existe además un polipeptido relacionado con el EGF y el TGF- α , codificado por un poxvirus vaccina virus (VV), a este no se le ha encontrado alguna función, pero su homología con el EGF sugiere que se pueda unir al receptor de éste, además su secuenciación sugiere que pueda ser una proteína integral de membrana, la forma asociada a membrana puede ser el precursor de un factor soluble, este polipeptido es similar en secuencia y en el patrón de distribución de los puentes disulfuro y la estructura tridimensional.

Aunque el EGF y el TGF- α han mostrado ser estimuladores activos del crecimiento celular en una gran variedad de sistemas de cultivo celular y se halla postulado que el VV tenga un funcionamiento similar, esta familia de péptidos puede tener otras funciones fisiológicas y quizá acciones patológicas. Por ejemplo se ha propuesto que el TGF- α pueda tener un papel en la destrucción patológica del hueso observada en muchos pacientes con cáncer ya que libera calcio del hueso (Assoian y col. 1985).

El TGF- β es un polipeptido hormonalmente activo homodímero de 25 kDa y está compuesto de dos subunidades idénticas de 12 500 Da unidas por puentes disulfuro presente en las plaquetas de la sangre y en otras células normales y transformadas (Fernandez, 1986). Todos los tejidos no neoplásicos examinados contienen TGF- β en bajas cantidades (3-20 μ g/Kg tejido), además las plaquetas humanas lo contienen en altas concentraciones (3-6 mg/Kg plaquetas) (Assoian, y col. 1983). La cantidad de TGF- β y del factor derivado de plaquetas (PDGF) en las plaquetas humanas es similar. Las acciones celulares del TGF- β incluyen la inducción de la proliferación independiente del anclaje en células (Raggenbass, 1982), la inhibición del fenotipo transformado en células de carcinoma (Roberts, 1986), y la inhibición de la proliferación de células epiteliales. El TGF- β también estimula la reparación de heridas en animales, esto se ha medido por el incremento de depósito de

colágena y la división celular en los sitios de daño (Assoian y col. 1985). La naturaleza de sus acciones también depende de los factores mitógenos presentes en el medio, sugiriendo que el TGF-beta dicta la forma en la cual las células responden a otros factores de crecimiento. Las acciones celulares de este factor probablemente resultan de la interacción con los receptores de la superficie celular distintos de los receptores de otros factores de crecimiento (Massagué, 1987a). La estructura y propiedades del receptor para el TGF-beta ya se han dado (Tucker y col. 1984, Frolik y col. 1984 y Massagué, 1985a). Fanger y col. en 1986 demuestran que el receptor está localizado en la membrana y puede ser solubilizado sin destruir sus propiedades de unión al TGF-beta, éste tiene un peso de 36 000 y consiste en dos subunidades unidas por puentes disulfuro, la diferencia de los receptores para EGF que se agregan y forman complejos a temperaturas mayores de 4°C, el complejo del receptor para TGF-beta no incrementa su tamaño con la temperatura, además no detectaron fosforilación en condiciones similares en las que para EGF detectaron actividad cinasa, esto indica que los receptores para EGF-beta difieren de los de otros factores de crecimiento, como el EGF. El TGF-beta puede funcionar como un estimulador de la proliferación solo para células fibroblásticas, la estimulación parece ser indirecta y mediada vía la inducción del protooncogen c-sis, el cual codifica para la cadena beta del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Un efecto más prominente del TGF-beta es la inhibición de crecimiento en células epiteliales y varios tipos de células malignas así como la inhibición del crecimiento independiente del anclaje de varias líneas celulares de carcinoma humano. Además es un potente inhibidor de la estimulación inducida por el EGF de la síntesis de ADN en hepatocitos de rata cultivados, e inhibe también el crecimiento de megacariocitos humanos cultivados, precursores eritroides y de células endoteliales. Los efectos inhibitorios de este factor parecen participar en la diferenciación celular, el TGF-beta estimula la diferenciación terminal de las células epiteliales bronquiales, por otro lado inhibe la diferenciación de las células 3T3 en adipocitos (Massagué, 1987a). El mecanismo por el cual el TGF-beta inhibe la proliferación necesita más estudio, pero es un inhibidor de casi todos los tipos celulares. La estimulación de los fibroblastos en arresto es probablemente un evento fortuito que ocurre a través de la inducción del protooncogen c-sis. La actividad autocrina es afectada por la proteína sis del PDGF, el cual es el mitógeno directo. Las células embrionarias de ratón transformadas químicamente producen y responden al TGF-beta. Este factor también puede ser liberado en una forma inactiva de peso molecular mayor, lo que sugiere una asociación con una proteína de unión. Otra característica interesante del TGF-beta es su habilidad para regular la actividad proteolítica de células cultivadas, puede inducir la producción de inhibidores y activadores de plasminógeno en células acromiomasas. Si la activación de plasminógeno participa en la activación del TGF-beta, entonces los inhibidores pueden funcionar en un mecanismo inhibitorio de retroalimentación. El papel de el TGF-beta en la transformación maligna de células

epiteliales y otros tipos de células no fibroblásticas puede diferir significativamente de las células fibroblásticas. Debido a que muchas células producen TGF-beta en forma inactiva y tienen receptores para TGF-beta y son capaces de responder a ésta, un paso regulatorio en la acción de este polipéptido es probablemente a nivel de la activación de sus precursores en este caso la pérdida de la célula para activar TGF latente puede permitir una ventaja al crecimiento. Existen además moléculas relacionadas con el TGF-beta, estas también tienen efectos inhibitorios en el crecimiento, algunos inhiben la secreción de FSH, sin embargo aún no se ha esclarecido bien su función. Se cree son codificados por un gen homólogo al del TGF-beta, estas moléculas forman un grupo de reguladores de crecimiento que tienen funciones fisiológicas variables. (Koski-Oja & Moses, 1987).

PEPTIDOS RELACIONADOS CON EL TGF-beta:

Existen tres formas del TGF-beta, el TGF-beta 1, TGF-beta y el TGF-beta 1.2, los cuales resultan de la combinación homodimérica y heterodimérica de las subunidades beta-1 y beta-2. El polipéptido originalmente descrito como TGF-beta consiste de dos subunidades beta-1. Las subunidades beta-1 y beta-2 están más relacionadas que con otros miembros de la familia TGFs exhibiendo un 70% de secuencia idéntica en sus lados amino terminal. Un alto grado de conservación entre las secuencias del TGF-beta-1 humano y del ratón apoyan que este juegue un papel importante a través de las especies. El rango de tipos celulares que responden a los TGF-beta y la variedad de respuestas celulares es amplia. "In vitro" el TGF-beta-1 y el TGF-beta-2 inhiben la proliferación de células normales y ciertos tumores derivados de células epiteliales. Se ha propuesto que los TGF-betas sean oncogénicos por defecto, si un decremento en su expresión o actividad libera a las células de las limitaciones proliferativas que normalmente estos factores imponen. En contraste algunas células mesenquimáticas proliferan en respuesta a los TGF-beta aunque esta respuesta sea secundaria a la elevada expresión de mitógenos autócrinos. "In vivo" la administración subcutánea del TGF-beta induce el depósito abundante de colágeno. Estos elementos son obviamente un componente importante de la acción fisiológica del TGF-beta, ya que la diferenciación y la morfogénesis son regulados por la interacción de las células con la matriz extracelular, los TGF-beta pueden afectar esos procesos controlando la abundancia y la arquitectura de la matriz extracelular así como la habilidad de las células para interactuar con ella. Otros miembros de la familia TGF-beta parecen tener funciones más especializadas, el MIS por ejemplo se encuentra en la mayoría de los testículos de los mamíferos, causa regresión de los conductos de Muller durante el desarrollo del tracto reproductivo. El MIS maduro es un homodímero compuesto de subunidades glicosiladas de 70-72 kD con el dominio carboxilo terminal homólogo al del TGF-beta, el MIS tiene un dominio carboxilo terminal no enpetrado en la membrana, lo cual lo hace diferente del resto de los miembros de esta familia. Existen además las inhibinas y las activinas, que controlan diferentes funciones

como la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la acumulación del estrógeno en las células granulosas del ovario. Las inhibinas se encuentran en el ovario y tejidos testicular, y están caracterizadas por su habilidad para suprimir la producción de FSH, son heterodímeros de dos cadenas de polipeptidos la alfa y la beta poco relacionadas. Existen dos formas de la cadena beta, beta-A y beta-B que resentan un 70% de homología, las dos formas de inhibina resultan de la combinación de esas dos subunidades que tienen similares actividades biológicas. Las activinas son dímeros compuestos de cadenas beta-A y beta-B, que se han encontrado de las mismas fuentes que producen las inhibinas, y como su nombre indica su funciones diferente de estas, activan la producción del FSH, pero no como activadores inmediatos, sostienen la producción de esta gonadotropina por periodos largos. Es posible que que los dímeros alfa-beta y los beta-beta exhiban un receptor en la superficie celular que reconozca las subunidades beta, pero sólo los dímeros beta-beta son capaces de activar eventos postunion, tal vez por la interacción con dos moléculas simultáneamente. Así el efecto inhibitorio resulta de la ocupación de un receptor con un ligando incapacitado para actuar con dos ligandos. Por otro lado se puede pensar en que existan receptores separados que actúen antagonicamente sobre los mismos blancos intracelulares. Las duplicaciones de las subunidades del TGF-beta pueden dar una ventaja regulatoria si la expresión de cada cadena beta está bajo el control de distintos estimuladores, o si cada cadena beta tiene diferentes propiedades de reconocimiento del receptor, esto último parece ser el caso en el sistema del TGF-beta. Dos de los tres receptores para TGF-beta, la glicoproteína de 65kD y la de 85 kD tienen afinidad para el TGF-beta-1, que es diez veces mayor que para el TGF-beta-2, sin embargo las funciones de esos dos receptores parece desconocida, el tercer receptor es otra glicoproteína de 28 kD que existe como parte de un complejo de receptores, este receptor no parece discriminar entre TGF-beta-1 y TGF-beta-2, y está implicado en la mediación de ciertos de sus efectos, incluyendo la inhibición de la proliferación epitelial, la adipogénesis y la inducción de fibronectina y expresión de colágeno. Los factores de la familia del TGF-beta se conciben como un grupo complejo que está estructural y funcionalmente bien segregado de otras familias de factores de crecimiento (Massagué, 1987).

Recientemente Schroy y col. (1990) mostraron que el agente hexametil bisacetamida (HMBA) incrementa la expresión del TGF-beta-1 en células de carcinoma de colon (HT29), el TGF-beta-1 y el HMBA inducen la pérdida de la expresión de un marcador de superficie maligno en estas células y decrecienta el crecimiento celular en medio libre de suero. Cuando se aplica exógenamente imita el efecto ejercido por el HMBA solo, arrestando el crecimiento de tres carcinomas de colon en un cultivo primario libre de suero, ambos incrementan el crecimiento en un segundo grupo de carcinomas mas agresivos. Los autores sugirieron que los efectos del HMBA sobre las células de carcinoma de colon pueden estar mediados en parte por la inducción del TGF-beta-1.

OBJETIVOS:

El objetivo general de este trabajo fué el de investigar si metabolitos liberados en cultivo por un melanoma de ratón, estaban asociados con el desarrollo y crecimiento del mismo "in vitro" e "in vivo". Así mismo buscar el efecto de los mismos metabolitos en la actividad de las células T "in vitro" a fin de averiguar si la inmunosupresión dada en los individuos con cáncer puede estar mediada por productos solubles del tumor que actúen directamente sobre las células del sistema inmune, para facilitar el desarrollo tumoral.

Los objetivos particulares fueron:

- 1.- Colectar los metabolitos liberados al medio de cultivo por un melanoma de ratón (clona M-3), y buscar su posible función regulatoria en las células que los produjeron, otras líneas tumorales y en los linfocitos T.
- 2.- Colectar los metabolitos liberados al medio de cultivo por fibroblastos de ratón, y buscar su posible función regulatoria en las células que los produjeron, otras líneas tumorales y en los linfocitos T. Los ensayos con los fibroblastos se consideraron como otro control.
- 3.- Buscar el posible papel de los metabolitos del melanoma de ratón en el desarrollo tumoral "in vivo".
- 4.- Coorrelacionar los resultados de los ensayos "in vitro" de los metabolitos del melanoma de ratón con sus propias células y con los linfocitos T, con los resultados del ensayo "in vivo".

METODOLOGIA:

En el presente trabajo se realizo la obtencion de productos tumorales a partir del medio de cultivo en donde su desarrollo un melanoma de ratón (Clona M-3 S91), y la obtencion de metabolitos a partir del medio de cultivo en donde se desarrollaron fibroblastos de ratón. Estos medios se procesaron de igual manera para tratar de correlacionar la presencia de cada uno con la actividad de linfocitos T y las mismas celulas que los produjeron. Asi mismo se busco el papel de estos en el desarrollo tumoral "in vivo".

A.- COLECCION DE LOS PRODUCTOS DEL MELANOMA Y DE LOS FIBROBLASTOS.

a).- CELULAS TUMORALES:

Se contó con una línea de melanoma de ratón, clona M-3 derivada del S91 de Cloudman, (ATCC) la cual se mantuvo preservada en nitrógeno líquido y se cultivo en cuanto se requirio. El medio de cultivo que se utilizó fue el de HAM F-10 (Microlab, Mex.) suplementado con un 2.5% de suero fetal bovino (Sigma, EUA) no inactivado y un 1% de suero de caballo no inactivado (Microlab, México). Como huéspedes se utilizaron ratones C.D2. (producto de la cruce de hembras BALB/C y machos DBA).

b).- CULTIVO DE FIBROBLASTOS:

- 1.- Se prepararon frascos de cultivo de poliestireno de 260 ml (Nunc) con medio de HAM F-10 (Microlab, Mex.) preparado de la misma forma que se utilizó para las celulas tumorales.
- 2.- En una caja Petri con el mismo medio de cultivo se colocaron fetos de 10 dias de gestacion de ratona C.D2 todo en condiciones asépticas.
- 3.- Se utilizó la región torácica la cual se disgrego con jeringas de 3ml usando una aguja de 22 X 1 1/2 mm (tele, México).
- 4.- Con la misma jeringa se vertio 0.2 ml en cada frasco de cultivo y se dejo incubar a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.
- 5.- El medio se reemplazo 5 días despues cuando se alcanza una confluencia del 80-90%.

c).- PROCESAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO SIN SUEPO PARA MELANOMA Y FIBROBLASTOS:

Se siguió una metodología similar a la utilizada por Iwata K. y col. (1985):

- 1.- Las celulas se cultivaron en medio de Ham-F10 (Microlab, México) suplementado con un 2.5% de suero fetal bovino (Sigma EUA) no inactivado y un 1% de suero de caballo (Microlab, México) no inactivado. Hasta alcanzar una

confluencia del 85% al 90%. Para tal efecto se utilizaron frascos de cultivo de 260 ml (80 cm³ Nunc) con 10 ml del medio.

- 2.- Al alcanzarse la confluencia deseada, las monocapas se lavaron con solución salina fisiológica cinco veces y se incubaron en medio libre de suero, 5 ml por frasco.
- 3.- El medio se colecta cada 24 horas o a la semana dependiendo del lote y se reemplazo por un volumen igual.
- 4.- El medio se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 min. Se hicieron alícuotas de 1 ml para liofilizar en viales de vidrio de 10 ml.
- 5.- El medio liofilizado se reunió y se lo determino la concentración de proteínas por el metodo de Lowry (1951)
- 6.- Se dializo en una membrana Spectropor n° 3 contra PBS (pH=7.4) durante 24 horas a 4° C.
- 7.- Se determinó la concentración de proteínas por el metodo de Lowry (1951) y se ensayó la actividad en :
 - a) linfocitos T
 - b) fibroblastos de raton obtenidos de un cultivo primario
 - c) celulas del melanoma M-3 (ATCC) y otras líneas celulares; el melanoma RPMI-1846 de hamster dorado (ATCC), el neuroblastoma P15 de ratón albino (donación del Instituto Nacional de Psiquiatria S. Sa., México) y el glioma C6 de rata (ATCC).
- 8.- Se fraccionó este medio en una columna de sefadex G-25 (Pharmacia) de 90 cm de largo con un diámetro de 1.5 cm, con un flujo de PBS (pH 7.4) de 40 gotas por minuto. Las fracciones se detectaron en un espectrofotómetro Beckman en celdas de cuarzo de 1 ml a tres longitudes de onda 220nm, 260nm y 280nm.
- 9.- Se liofilizó cada fracción y se determinó la concentración de proteína por la técnica de Lowry para ensayar su actividad en las células señaladas en el paso 7 y ademas en linfocitos T (Lyt -1, -1 y Lyt-2).

B.- ESTUDIO "IN VITRO"

a).- REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS EN PRESENCIA DEL MEDIO SIN SUERO PROCESADO DE FIBROBLASTOS Y DE MELANOMA:

Se evaluó la respuesta en base al porcentaje de incorporacion de timidina marcada con tritio, que nos da un indice del ADN sintetizado lo que indica o un aumento en la proliferación celular o un aumento en su estado activo (Hudson & Hay, 1976).

1).- CELULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS:

Se determino la actividad en el melanoma de raton M-3 (ATCC) de donde se obtuvieron los metabolitos a probar, en fibroblastos de raton, así como en otras líneas tumorales: el glioma C₆ de rata (ATCC), en el neuroblastoma P15 de raton (donación del Instituto Nacional de Pediatría S.Sa.

México), y en el melanoma RPMI de hamster (ATCC),

- 1.- Se puso una suspensión de 1×10^6 células por pozo de caja de 24 pozos, en medio de HAM-F10 suplementado con un 2.5% de suero fetal bovino no inactivado (Sigma, EUA) y un 1% de suero de caballo no inactivado (Microlab, México).
- 2.- Cuando las células ya estuvieron adheridas de 3 a 4 horas después se agregó la cantidad de proteína (10 microgramos) requerida para cada lote y dejándose incubar el tiempo que se había establecido previamente (3 hrs a 48 hrs.).
- 3.- Cuatro horas antes de finalizar el período de incubación se agregó $1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) (New England Nuclear) a cada pozo.
- 4.- Al finalizar las cuatro horas, las monocapas se lavaron con PBS (pH 7.4) tres o cuatro veces cuidando no despegar las células.
- 5.- Las células fueron desprendidas de cada pozo agregando tripsina-verseno $1 \times$ (Sigma, EUA), incubando de 2 o 3 minutos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min.
- 6.- Se resuspendió el botón en 0.4 ml de PBS (pH 7.6) y se puso en un disco de papel filtro (Whatman 3MM de 2.1 cm). Los discos se secaron al aire y se procedió a lavarlos con ácido tricloroacético al 10%, PBS (pH 7.6), alcohol absoluto y cloroformo. Esto se hizo utilizando un portafiltros Millipore para 12 muestras (mod.2702550).
- 7.- Cuando los discos estuvieron secos se colocó cada uno en un vial de contador de centelleo líquido con 5 ml de líquido de centelleo (0.05 g de 2,2-p-fenil-bis (5 feniloxalón), 6g de 2,5-difeniloxalón y 1 litro de tolueno), dejando reposar de 2 a 4 horas antes de proceder a cuantificar en el contador beta de centelleo líquido.

2).- LINFOCITOS T :

a).- OBTENCION DE UNA POBLACION RICA EN LINFOCITOS T:

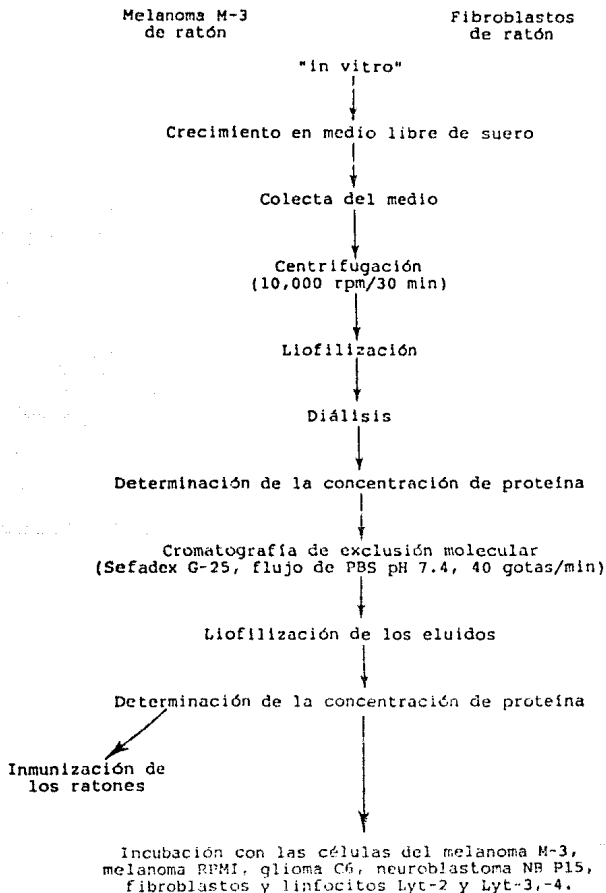
- 1.- Se cultivó una suspensión de 1×10^6 por pozo de caja de 96 pozos (Nunc) en medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (Sigma, EUA).
- 2.- Se agregó la cantidad correspondiente de proteína (10-15 microgramos y 20-30 microgramos) obtenida a partir medio de cultivo, según el lote, incubando a 37°C en atmósfera húmeda durante 24 o 48 hrs. según el lote.
- 3.- Cuatro horas antes de dar por terminado el tiempo de incubación se agregó 1 micro Curie de timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) (New England Nuclear) por pozo.
- 4.- Al finalizar el tiempo de incubación las células fueron lavadas tres veces por centrifugación. Para hacer esto, se tuvo la precaución de coleccionar todas las células y lavar cada pozo con solución salina fisiológica a fin de no perder células que pudieran estar adheridas al pozo.
- 5.- El botón se resuspendió en 0.4ml de PBS (pH 7.4) y se colocó sobre un disco de papel filtro (Whatman 3MM, de 2.1cm).
- 6.- Los discos se dejaron secar al aire.

- 7.- Los discos se lavaron en en ácido tricloroacético al 10%, PBS (pH 7.6), alcohol absoluto y cloroformo y se dejaron secar al aire. Esto se hizo utilizando un portafiltros Millipore para doce muestras (mod.3762550)
- 8.- Cada disco se colocó en un vial de contador beta con 5ml de líquido de centelleo (6g de 2,5-difeniloxazol, 0.05g de 2,2-p-fenil-bis (5 feniloxalon) y un litro de tolueno) reposando de dos a cuatro horas antes de leer en un contador beta de centelleo líquido.

b).- SEPARACION DE LINFOCITOS T EN SUBPOBLACIONES:

- 1.- Una suspensión de células de bazo de ratón en solución salina fisiológica se ajusta a una concentración de 5×10^5 células.
- 2.- Se colocó en tubos de propileno de 15 ml, 3 ml de Histopaque (Sigma, EUA).
- 3.- Encima de cada cama de histopaque se agregaron 8ml de la suspensión de bazo, y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min.
- 4.- La porción correspondiente a linfocitos se pasó a un tubo limpio con PBS (pH 7.6) y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min.
- 5.- La suspensión celular se enriqueció en células T de acuerdo a la técnica descrita por Julius, 1973:
 - a) Colocar 0.6g de fibra de nylon (Laboratorios Fenwall, Illinois) en jeringas de plástico de 5 ml, empaquetarlas y esterilizar por autoclave.
 - b) Las jeringas funcionan como columnas y se drenan con medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (Sigma, EUA). Sellar las columnas e incubar durante 30 min. a 37°C
 - c) Colocar de 1 a 2×10^5 células /ml en la parte superior de la columna que se mantiene en posición vertical. Dejar incubar durante 30 min. a 37°C .
 - d) Lavar las columnas lentamente con el medio RPMI a 37°C , recoger los primeros 25 ml, centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.
 - e) Contar la viabilidad en una solución de azul tripano al 0.05%
- 6.- Se separó esta población rica en linfocitos T mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales (MAS 110 (anti L3/T4) y MAS 111 (anti Lyt.2) (Sera-Lab, E.U.A.) ligados a seferosa-6M (Sigma, EUA), por la técnica de Schlossman & Hudson 1973:
 - a) Preparar la seferosa hinchándola con HCl 1M, de acuerdo al método de March y col. (1971)
 - b) Acoplar la proteína con buffer de NaHCO_3 0.1 M (pH 8.2) en una concentración de 500 microgramos por mililitro de gel.
 - c) Mezclar la solución durante toda la noche a 4°C durante 2hrs. a temperatura ambiente.
 - d) Lavar el exceso de proteína y bloquear con glicina 1M.
 - e) Lavar el exceso de agente bloqueador con buffer de acetatos

METODOLOGIA:



0.1 M (pH=4). Seguir con buffer de acoplamiento. Almacenar a 4°C.

- f) Incubar 1×10^6 linfocitos T (población enriquecida en linfocitos T) en la columna durante 15 min. a temperatura ambiente.
- g) Lavar la columna con medio de cultivo (20 -30 ml) suavemente.
- h) Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. Resuspender el botón en medio de cultivo cuantificar y registrar la viabilidad con azul tripano (0.05 %).

C.- ESTUDIO "IN VIVO"

- 1.- Se inyectaron ratones híbridos C.D2 producto de la cruce entre la cepa DBA (machos) y la BALB/C (hembras) con las fracciones A o B de la colecta diaria del medio de melanoma vía subcutánea en el dorso. A un lote se le administro la proteína sola a razón de 1.0mg/Kg peso semanalmente, a otro lote se le agrego adyuvante con solo 0.5mg/Kg peso y se hizo de acuerdo siguiente esquema:

día 0	Sangrado de ratones y primera dosis de proteína (0.5mg/kg peso) mas ACF (adyuvante completo de Freund) en relación 1:1 con respecto al volumen.
día 7	La misma cantidad de proteína mas AIF (adyuvante incompleto de Freund) 1:1
día 14	La proteína sola en la misma cantidad
día 21	Igual que el día 14
día 28	Sangrado de ratones

- 2.- Al concluir la administración de las proteínas se reto a los ratones con una cantidad de 1×10^6 células de melanoma S91 éstas se implantaron vía subcutánea en el dorso, del lado opuesto a donde se administraron las proteínas. Se tuvo un lote control de ratones a los cuales se les implantó la misma cantidad de células.
- 3.- La evaluación que se hizo del desarrollo tumoral consistió en tomar el peso promedio por grupo del tumor, además de que se considero el tiempo de aparición de los tumores y el número de ratones que presentaron tumor en cada grupo, palpando a los animales diariamente.

Se aplico la prueba de T de Student (Tarker, 1976).

A los sueros de los ratones que se pretendieron inmunizar se les hizo una prueba de inmunofluorescencia indirecta en monocapas de las células de melanoma de la siguiente forma:

- a.- Se prepararon cajas de 6 pozos (Nunc) con un cubreobjeto de vidrio por pozo en condiciones asepticas con 0.5 ml del

- medio de cultivo de las células de melanoma (HAM-F10, suplementado con 2.5% SFB y 15% SC).
- b.- En cada pozo se sembraron 10,000 células de melanoma y se espero a que alcanzaran una confluencia del 100%.
 - c.- Las monocapas se lavaron cuatro veces con PBS (pH 7.6) y se agrego 0.5 ml de metanol absoluto el cual se dejó durante 5 min.
 - d.- De nuevo se lavaron las monocapas con PBS (pH 7.6).
 - e.- Los sueros problema (experimentales y testigo) se diluyeron 1:4 con PBS (pH 7.6).
 - f.- A cada cubreobjeto se le colocaron 20 microlitros de una dilución de suero diferente y se dejaron incubar durante 30 min. a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos con PBS (pH 7.6) cinco veces suavemente.
 - g.- A cada cubreobjetos se le agregaron 20 microlitros de una dilución 1:2 de anticuerpo antiinmunoglobulina de ratón (IgG) marcada con fluoresceína y de nuevo se dejó incubar durante 30 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente.
 - h.- Los cubreobjetos se lavaron con PBS (pH 7.6) diez veces, suavemente y se montaron en portaobjetos con una solución de glicerol/glicina y se procedió a observar en microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

D.- ELECTROFORESIS DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS SIN SUERO.

Se procedió a hacer la electroforesis en un gel de poliacrilamida a 10% discontinuo, es decir con un gel de concentración de las muestras y un gel de separación de éstas, de acuerdo al sistema de Laemmli (1970). Los geles se prepararon como se indica a continuación:

Gel inferior

Acrilamida 30% bisacrilamida 0.8 %	11.0 ml
Tris base 2M pH 8.8	6.0 ml
SDS 10%	0.3 ml
Agua destilada	11.2 ml
Persulfato de amonio (1 mg/ml)	0.5 ml
TEMED	0.03ml

Se desgasificó durante 15 minutos con agitación.

Gel superior

Acrilamida 30% bisacrilamida 0.8 %	3.5 ml
Tris-HCl 2M pH 6.8	0.65ml
SDS 10%	0.1 ml
Persulfato de amonio (1 mg/ml)	0.2 ml
Agua destilada	11.5 ml
TEMED	0.01ml

Se desgasificó durante 15 minutos con agitación

Preparación de las muestras:

- 1.- Los medios de cultivo como se indica anteriormente se liofilizaron y despues se dializaron contra PBS pH 7.4 y contra agua durante 24hrs. usando una membrana Spectrapor de 1000 Da de "cut off"
- 2.- Se pasaron por una columna de Sephadex G-10 de 3 cm X 1.5 cm con un flujo de agua destilada.
- 3.- Se volvieron a liofilizar
- 4.- Se determino la concentracion de proteina por el metodo de Lowry (1951)
- 5.- Se ajustaron volúmenes que contuvieran 40 microgramos para poner en cada pozo agregando buffer de la muestra con betamercaptoetanol, este se preparó como sigue:

agua destilada.....	4.0 ml
tris HCl pH 6.8.....	1.0 ml
glicerol.....	0.8 ml
SDS 10 %.....	1.6 ml
2 beta mercaptoetanol.....	0.4 ml
azul de bromofenol 0.05 %	0.2 ml.

3.- Corrimiento de las muestras:

Se utilizó una cámara de electroforesis de BIO-RAD que se llenó con el siguiente buffer de corrimiento:

tris base 15 gr/litro

glicina 72 gr/litro

SDS 5 gr/litro

300 ml se llevaron a 1500 ml de agua destilada.

El gel superior se corrió a 10 mA y el inferior a 30 mA. Se tiñeron con plata mediante la técnica descrita por Oakley R.B., 1980.

RESULTADOS

COLECCION Y CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DEL MELANOMA M-3 Y DE FIBROBLASTOS DE RATON

Se realizó la extracción y parcial purificación de los metabolitos excretados al medio de cultivo de melanoma y al medio de cultivo de fibroblastos. Esto se hizo de forma similar a la reportada por otros autores como Holley y col. (1980), Assoian y col. (1983), Iwata y col. (1985) y Conn y col. (1990). En la cromatografía se observaron diferencias en el número de fracciones obtenidas, en su tamaño y cantidad dependiendo de las células de las que se obtuvo y del tiempo de colecta (fig. 1). El medio de melanoma que se colectó diariamente presentó cinco fracciones, tres de ellas las del centro aun mezcladas. El medio de melanoma colectado semanalmente presentó tres fracciones, en la sección intermedia apareció solamente uno. Los medios de fibroblastos colectados diariamente y semanalmente presentaron tres fracciones (Fig. 1).

En la electroforesis del medio completo del melanoma se encontraron varias bandas, una con un peso molecular cerca a 200 Kd, otra con un peso mayor a 100 Kd, otra menor de 100 Kd, otra cerca a 60 Kd, y otras menores de 50 Kd. La fracción A contuvo a las bandas mayores de 50 Kd y la fracción B a las bandas menores de 50 Kd. El medio de fibroblastos presentó varias bandas menores de 100 Kd (Fig. 2).

EFFECTO DE LOS METABOLITOS SOBRE SUS CELULAS PRODUCTORAS Y OTRAS

Se evaluó el efecto de los metabolitos contenidos en el medio de cultivo de fibroblastos y del melanoma M-3 en base al porcentaje de incorporación de timidina marcada con tritio en las células del melanoma de ratón (clona M-3), fibroblastos de ratón, células de glioma de rata (línea C6), células de neuroblastoma de ratón (línea p15), y otra clona de melanoma de hamster (RPMI 1846).

Estos ensayos se realizaron en medio libre de suero (fig.4). El melanoma M-3 se estimuló con su propio medio a las 6 y a las 24 hrs., y con el medio de los fibroblastos a las 6 hrs. Hubo un notable decremento de la incorporación con los dos medios a las 12 hrs. y a las 48 hrs. con el medio del melanoma. Los fibroblastos fueron ligeramente estimulados con su propio medio a las 6 hrs., estímulo que fue decreciendo paulatinamente a mayor tiempo. El medio del melanoma estimuló a los fibroblastos a las 3 hrs, el resto del tiempo los mantuvo cerca del 100 % de incorporación.

En el neuroblastoma P15 el medio de melanoma estimuló la incorporación a las 48 hrs, en tanto que el medio de fibroblastos estimuló en todos los tiempos excepto a las 12 hrs. en que existió un notable desenso de la incorporación. En el glioblastoma el medio de melanoma M-3 ejerció un efecto similar que el medio de fibroblastos. En el melanoma RPMI, el medio de melanoma solo estimuló a las 3 hrs. bajando y manteniéndose cercano al 100%, el

Fig. 1 FRACCIONES DE LOS DIFERENTES MEDIOS EN SEFADEX G-25

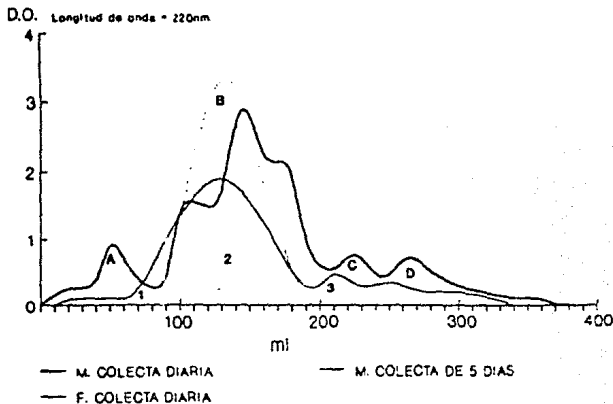


Fig. 1 - Los medios de cultivo sin suero del melanoma M-3 colectados semanal y diariamente, y el de los fibroblastos, fueron eluidos en una columna de sefadex G-25 (Pharmacia) de 90 x 1.5 cm. con un flujo de 40 gotas por minuto de PBS (pH 7.4). Las fracciones se detectaron en un espectrofotómetro Beckman a tres longitudes de onda: 220nm, 260nm y 280nm. No se encontró diferencia en las gráficas con las diferentes longitudes de onda.
M= MEDIO DEL MELANOMA M-3
F= MEDIO DE LOS FIBROBLASTOS

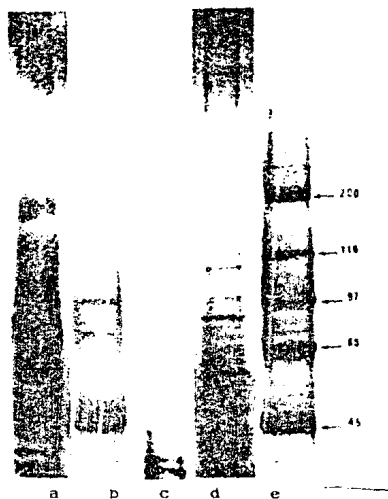
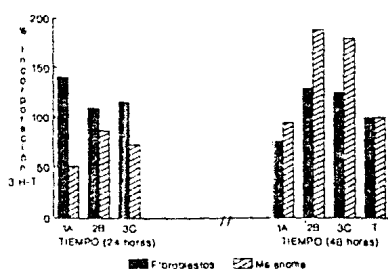
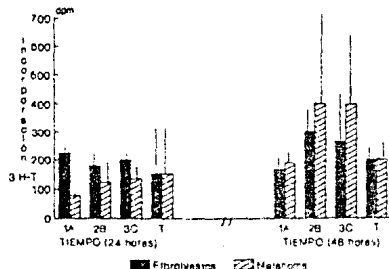


FIG. 2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y BETA-MERCAPTOETANOL DE LOS SOBRENADANTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SIN SUERO. a) MELANOMA M-3, b) FRACCION A DEL MELANOMA M-3, c) FRACCION B DEL MEDIO DEL MELANOMA M-3, d) FIBROBLASTOS e) ESTANDARES DE PESO MOLECULAR.

Fig. 3 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN EL MELANOMA M-1 CON 10 MICROGRAMOS DE LAS FRACCIONES DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS EN MEDIO LIBRE DE SUERO A 24 Y 48 HORAS.



a



b

Fig. 3 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en el melanoma M-1 con 10 microgramos de las fracciones de los medios del melanoma M-1 (A, B y C) y de los fibroblastos (1, 2 y 3) en medio libre de suero. Se usaron cajas de 24 pozos (Nunc) en cada pozo se pusieron 1×10^4 células con 10 microgramos de la fracción. Cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada en cada pozo. Al finalizar la incubación se procedió a cuantificar la radioactividad incorporada de acuerdo a la técnica descrita por Hudson & Ray (1977).

a) Gráfico del porcentaje de incorporación, tomando como referencia el lote testigo (T) al que se consideró como el 100%.
b) Gráfico del promedio de incorporación y la desviación estándar en 3 integraciones por minuto (dpm).

FIG.4 PORCENTAJE DE INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN DIFERENTES CELULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS CON 10 MICROGRAMOS DE MEDIO DE MELANOMA (M) Y FIBROBLASTOS (F) A DIFERENTES TIEMPOS EN CULTIVO SIN SUERO.

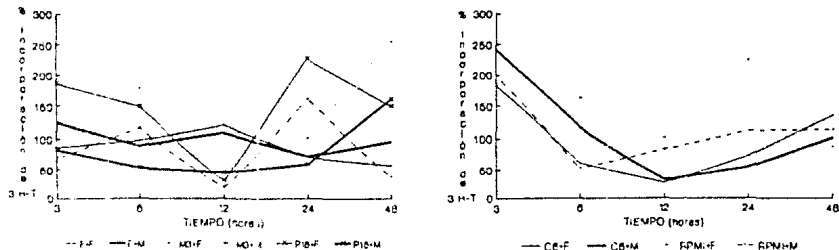


Fig. 4 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en diferentes líneas tumorales y fibroblastos con 10 microgramos del medio del melanoma M-3 y fibroblastos, en medio libre de suero. Se usaron cajas de 24 pozos (Nunc), en cada pozo se pusieron 1 X 10⁴ células con 10 microgramos del medio. Cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada a cada pozo. Al finalizar la incubación se procedió a cuantificar la radioactividad de acuerdo a la técnica descrita por Hudson & Hay (1990).

F-F, fibroblastos mas medio de fibroblastos, F-M, fibroblastos mas medio del melanoma M-3, M3-F, melanoma M-3 mas medio de fibroblastos; M3-M, melanoma mas medio del melanoma M-3, P15-F, neuroblastoma P15 mas medio de fibroblastos; P15-M, neuroblastoma P15 mas medio del melanoma M-3, C6-F, glioma mas medio de fibroblastos; C6-M, glioma mas medio del melanoma M-3, RPMI-F, melanoma RPMI mas medio de fibroblastos, RPMI-M, melanoma RPMI mas medio del melanoma M-3.

medio de fibroblastos lo estimuló a las 6 y 24 hrs. El glioma C6 se estimuló a las 1hrs con los dos medios, notándose un decremento en la incorporación a las 12 hrs.

De la misma forma se probó el efecto de cada una de las fracciones tanto de medio de melanoma como de fibroblastos, en el melanoma (fig. 3) ninguna de las fracciones hicieron que el porcentaje de incorporación subiera arriba del 100% a 24 hrs. Las fracciones B y C del medio del melanoma aumentaron la incorporación a las 48 hrs. La fracción A las mantuvo por debajo del 100% de incorporación. Por su parte los eluidos del medio de los fibroblastos estimularon al melanoma arriba del 100% de incorporación a las 24 hrs, aumentando a las 48 hrs, solo la fracción 1 decremento la incorporación a las 48 hrs.

EFFECTO DE LOS METABOLITOS EN LINFOCITOS T Y EN ALGUNAS SUBPOBLACIONES

Otra parte de este trabajo consistió en probar el efecto que ejercieran los metabolitos tumorales en la incorporación de timidina marcada radioactivamente en linfocitos T. Cuando los linfocitos fueron incubados con las fracciones del medio de melanoma M-3 durante 24 hrs. (fig.5), la fracción A estimulo la incorporación aumentando esta a mayor concentración. A mayor tiempo la fracciones B y C estimularon ligeramente a menor concentración, e inhibiendo la estimulación a mayor concentración, la fracción A decremento la incorporación que se observo a 24 hrs (fig.6). Las fracciones del medio de fibroblastos incrementaron el porcentaje de incorporación de linfocitos a los dos tiempos con las dos concentraciones, el estímulo de cada fracción dependio del tiempo de la exposición y de la concentración de la misma.

De acuerdo a la nomenclatura aceptada para dividir a los linfocitos de ratón por las moléculas presentes en su superficie, se separaron linfocitos Lyt -3,-4 (T supresores/citotóxicos) y linfocitos Lyt -2 (T de ayuda) mediante el uso de anticuerpos monoclonales en cromatografía de afinidad (Paul, 1989), los cuales tambien fueron expuestos a cada una de las fracciones de los medios del melanoma M-3 y de los fibroblastos. En la fig.7 se aprecia que las fracciones A y C del melanoma M-3 estimularon a los linfocitos Lyt -2 ligeramente, estímulo que decremento a las 48 hrs.(fig.8). Los linfocitos Lyt -3,-4 no fueron estimulados con alguna de las fracciones del medio del melanoma M-3 a 24 hrs., por el contrario se inhibio su incorporación con respecto al control, solo la fracción C aumento su incorporación a las 48 hrs. (fig.8). Por otro lado las fracciones de los fibroblastos estimularon a los linfocitos Lyt -2 a las 24 hrs., la fracción 2 incremento más la incorporación pero esto no se observo a las 48 hrs. Los linfocitos Lyt -3,-4 no se estimularon con alguna de las fracciones de los fibroblastos a ningún tiempo.

FIG. 6 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN LINFOCITOS T A 24 HORAS CON LAS FRACCIONES DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS.

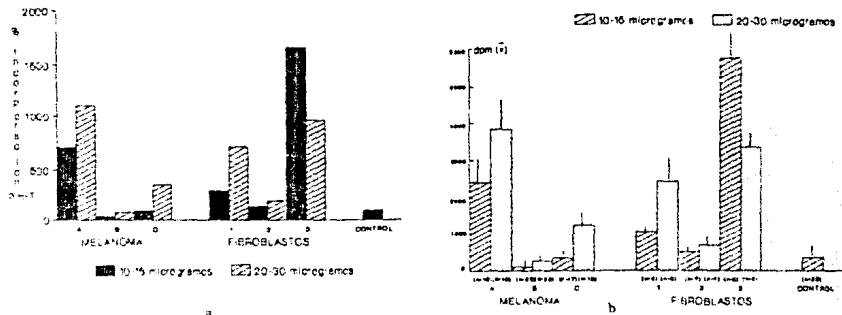


Fig. 5 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en linfocitos T a 24 hrs. con las diferentes concentraciones de las fracciones de los medios del melanoma M-3 (A, B y C) y de los fibroblastos (1, 2 y 3). Se usaron cajas de 96 pozos (Nunc), en cada pozo se pusieron 1×10^5 linfocitos con la concentración de proteína. Cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada a cada pozo. Se procedió a cuantificar la radioactividad incorporada de acuerdo a la técnica descrita por Hudson & Hay (1990).

a) Gráfica del porcentaje de incorporación, tomando como referencia el lote control (C) al que se consideró como el 100%.

b) Gráfica del promedio de incorporación y la desviación estándar dada en desintegraciones por minuto. (dpm).

FIG. 6 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN LINFOCITOS T A 48 HORAS CON LAS FRACCIONES DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS.

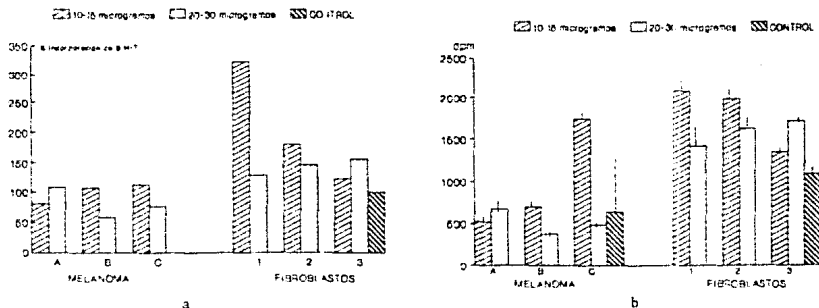


Fig. 6 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en linfocitos T a 48 hrs. con las diferentes concentraciones de las fracciones de los medios del melanoma M-3 (A, B y C) y de los fibroblastos (1, 2 y 3). Se usaron cajas de 96 pozos (Nunc), en cada pozo se pusieron 1×10^4 linfocitos con la concentración de proteína. Cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada a cada pozo. Se procedió a cuantificar la radioactividad incorporada de acuerdo a la técnica descrita por Hudson & Hay (1990).

a) Gráfica del porcentaje de incorporación, tomando como referencia el lote control (C) al que se consideró como el 100%.

b) Gráfica del promedio de incorporación y la desviación estándar dada en desintegraciones por minuto (dpm).

n=12

FIG. 7 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T A 24 HORAS CON 20 MICROGRAMOS DE LAS FRACCIONES DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS Y OTROS MITOGENOS.

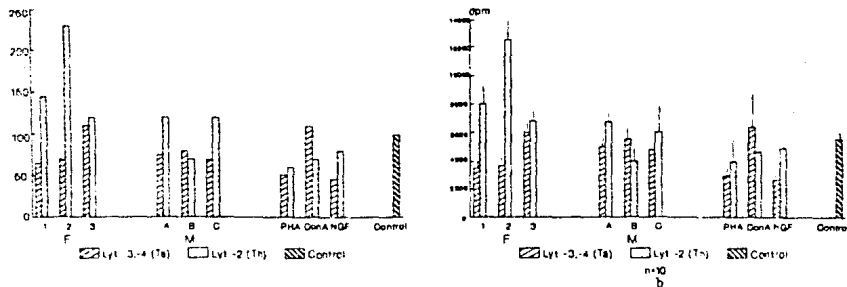


Fig. 7 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en subpoblaciones de linfocitos T a 24 hrs. con 20 microgramos de las fracciones de los medios del melanoma 4-3 (A, B y C) y de los fibroblastos (1, 2 y 3). Se usaron cajas de 96 pozos (Nunc), en cada pozo se pusieron 1×10^5 linfocitos con la concentración de proteína cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada a cada pozo. Se procedió a cuantificar la radioactividad incorporada de acuerdo a la técnica descrita por Hudson & Hay (1974).

a) Gráfica del porcentaje de incorporación, tomando como referencia el lote control (C), al que se consideró como el 100%.
b) Gráfica del promedio de incorporación y la desviación estándar dada en desintegraciones por minuto (dpm).
n=10

FIG. 8 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (3 H-T) EN SUBPOBLACIONES DE LIMFOCITOS T A 48 HORAS CON 20 MICROGRAMOS DE LAS FRACCIONES DE LOS MEDIOS DE MELANOMA Y FIBROBLASTOS Y OTROS MITOGENOS.

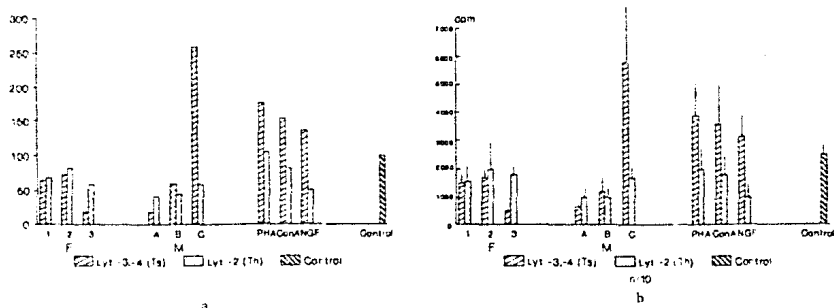


Fig. 8 - Registro de la incorporación de timidina tritiada en subpoblaciones de linfocitos T a 48 hrs. con 20 microgramos de las fracciones del medio del melanoma M-2 (A, B y C) y de los fibroblastos (1, 2 y 3). Se utilizaron cajas de 96 pozos (Nunc), en cada uno se pusieron 1×10^5 linfocitos con la concentración de proteína cuatro horas antes de terminar el tiempo de incubación se agregó un microcurie de timidina tritiada a cada pozo. Se procedió a cuantificar la radioactividad incorporada de acuerdo a la técnica descrita por Huggen & Hay (1970).
a) Gráfica del porcentaje de incorporación, tomando como referencia el lote control (C), el que se consideró como el 100%.
b) Gráfica de, promedio de incorporación y la desviación estándar dada en desintegraciones por minuto (dpm).
n=10

EFFECTO DEL DESARROLLO TUMORAL "IN VIVO" DE LAS FRACCIONES A Y B DEL MELANOMA M-3.

La ultima parte de este trabajo consistió en evaluar el desarrollo tumoral "in vivo" en ratones singénicos al melanoma M-3, previamente inmunizados con las fracciones A y B del medio de melanoma, se trabajo con estas fracciones por tener efectos antagonicos en la incorporacion de timidina tritiada en el melanoma M-3 "in vitro" (fig. 3). El esquema de inmunizacion esta descrito en la metodologia y la evaluacion que se hizo del desarrollo tumoral consistió en tomar el peso promedio por grupo del tumor, además de que se consideró el tiempo de aparición de los tumores de cada grupo. En la tabla 1 se muestran los resultados del experimento "in vivo", se puede apreciar que los ratones inmunizados con la fracción A presentaron un menor crecimiento tumoral, que los inmunizados con la fracción B y el grupo control, además la aparición de los mismos estuvo retrazada. Los ratones inmunizados con la fracción B presentaron un aceleramiento en la aparición del tumor de mas de dos semanas de diferencia con respecto al grupo inmunizado con la fracción A y de dos semanas con el grupo control. Existió diferencia en cuanto al tamaño de los tumores, los de los ratones inmunizados con la fracción A fueron menores que los de los ratones inmunizados con la fracción B y con el los ratones del grupo control. Se detectaron anticuerpos con inmunofluorescencia, en el grupo inmunizado con la fracción A existió positividad en el nucleo, en el grupo inmunizado con la fracción A mas adyuvante la positividad se encontro en la periferia del nucleo, y en el grupo inmunizado con la fracción B mas adyuvante se encontró positividad en el citoplasma. El grado de positividad también fue diferente, siendo mayor en el grupo inmunizado con la fracción A.

Tabla 1. Crecimiento tumoral presentado por los ratones inmunizados con las fracciones A y B del medio de melanoma.

Grupo	Cremimiento Tumoral	Tiempo de aparición (días) *	Porcentaje de aparición	Peso** (gr)		Fluorescencia
				$\bar{X}$	S	
A	+	30-35	40	1.16	0.23	++(núcleo)
A+Ady	++	30-35	45	1.07	0.16	+(perinúcleo)
B	+++++	15-18	75	2.89	0.35	-
B+Ady	++++	15-18	85	2.95	0.39	+(citoplasma)
Control	+++	28-30	95	2.10	0.20	-

* La aparición tumoral fue evaluada palpando a los animales diariamente, la presencia de un nódulo marcó el primer día de aparición tumoral.

** $P < 0.001$ por la prueba de T de Student.

Tabla 2. Efecto de las fracciones A y B del melanoma M-3 en el desarrollo tumoral "in vitro" e "in vivo".

Fracción	% de incorporación de 3H-T "in vitro" en el melanoma M-3	Tiempo (hrs)	% de aparición tumoral "in vivo"	Tiempo de aparición del tumor "in vivo" (días)
A	50	24	40 - 45	30 - 35
	94	48		
B	86	24	75 - 85	15 - 18
	188	48		

DISCUSION

Algunas líneas celulares transformadas producen y liberan péptidos llamados factores de crecimiento que pueden conferir un fenotipo transformado, en forma reversible en células no transformadas (Lahio y col. 1986, Fritz, 1988 y Green, 1989). Se ha sugerido que esos péptidos contribuyen al fenotipo de las células que los producen. La producción de esos péptidos por las células las dota con ventajas sobre el crecimiento de sus contrapartes no transformadas y la habilidad para crecer como un tejido neoplásico. (De Larco, 1985, Massagué, 1987 y Lahio, 1989). La mayoría de los trabajos que se han hecho sobre los factores de crecimiento transformantes reportan el efecto en el crecimiento y transformación sobre células no transformadas generalmente fibroblastos, y en células transformadas entre ellas los melanomas, glioblastomas, etc., considerando la actividad mitógena que tengan sobre las células tales factores y su capacidad para crecer en medio semisólido (Cook & Chen, 1988 y Mooradian y col. 1990). En el presente trabajo se evaluó la respuesta mitógena de algunas líneas celulares tumorales, fibroblastos de ratón y linfocitos T, en particular linfocitos T Lyt -2 y Lyt -3,-4 a los metabolitos liberados por el melanoma de ratón M-3 y por fibroblastos de ratón a su medio de cultivo cuando permanecían sin suero. No se tienen reportes sobre el posible papel de los factores de crecimiento sobre las células del sistema inmune, por lo que en el presente trabajo se pretendió evaluar esto en los linfocitos T. Además se buscó el posible efecto de los metabolitos liberados por el melanoma S91 al medio de cultivo en el crecimiento de dicho melanoma "in vivo".

COLECCION Y CARACTERIZACION DE LOS METABOLITOS:

Como se observa en la fig. 1 se obtuvieron fracciones diferentes a partir del medio de cultivo del melanoma colectado semanal y diariamente. Estas diferencias podrían deberse al uso por los melanocitos malignos en el cultivo de los metabolitos no encontrados en la fracción intermedia (B, fig. 1) de la colecta semanal. Si en el cultivo se tuvieron células transformadas (en el caso del melanoma M-3) de las que se sabe producen gran cantidad de factores de crecimiento entre ellos los que les confieren su malignidad fenotípica (Sen & Fareed, 1987 y Sporn & Todaro, 1989) es de suponer que las mantenga vivas un buen tiempo sin necesidad de tener nutrientes mayores adicionales. Además De Larco (1985) señala el hecho de cuando las células tumorales permanecen sin suero hace que produzcan gran cantidad de factores de crecimiento que actúan de manera autoestimulante. En este trabajo a diferencia de otros (Holley, 1980, Todaro, 1980, Assoian, 1983, Iwata, 1985 y Conn, 1990), en que utilizan medio Waymouth, se utilizó medio de HAM F10, el cual es un medio muy complejo, que según ATCC (American Type Culture Collection) es capaz de mantener a pocas líneas

celulares sin suero, el medio Waymouth menos complejo es capaz de mantener a las células en cultivo sin suero. La complejidad del medio utilizado pudo haber sido favorable para la obtención de mayor concentración de proteína, a partir de menor cantidad de medio, que la obtenida por los autores ya mencionados.

En los trabajos que se han reportado sobre factores de crecimiento la colecta se ha hecho en intervalos de tiempo cortos de 6 a 12 hrs. y nunca en intervalos mayores a 24 hrs. por lo que no existen registros de estos cambios en el medio de cultivo; el hacer esto profundamente podría esclarecer mucho acerca de la regulación en el crecimiento tumoral y su éxito en el establecimiento en el huésped, ya que es muy probable que la célula tumoral sintetice varios tipos de factores de crecimiento dependiendo de las condiciones. En este trabajo se colectó el medio semanal y diariamente, pero como se obtuvo mayor cantidad de la concentración de proteína en el medio del melanoma M-3 colectado diariamente, lo cual se correlaciona con el mayor número de picos en la fracción B (fig. 1) se trabajó con éste en los ensayos de incorporación de timidina marcada con tritio además de que de esta forma se aprovechaba la cantidad de proteína obtenida y se ahorra tiempo.

Existen evidencias de que las células de melanoma en cultivo producen gran variedad de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Westermarck y col. 1986), factores de crecimiento transformantes (TGF-alfa y TGF-beta) y factor de crecimiento nervioso, y muy probablemente interleucina-1 (Benicelli, y col. 1989). Cuando se corrieron las fracciones y el medio completo de melanoma en electroforesis se encontraron varias bandas (fig. 2). No se descarta el hecho de que éstas moléculas sean algunas de las que se han reportado secreta el melanoma, sin embargo en este trabajo no se caracterizó a cada molécula. Entre las moléculas de peso molecular mayor a 50 Kd de la fracción A del medio del melanoma M-3, se podrían encontrar algunos mediadores solubles del sistema inmune cuyo peso puede ser mayor de 100 Kd (Paul, 1989). Las moléculas de peso molecular menor a 50Kd podrían ser algunos factores de crecimiento transformantes (TGFs), el factor de crecimiento epidermal EGF, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Sin embargo se necesitarían trabajar mas sobre estos metabolitos para llegar a su caracterización.

En la fig. 2 se aprecia la diferencia entre los medios del melanoma M-3 y el medio de fibroblastos. Este último constó de mas moléculas, muy probablemente sean todas factores de crecimiento, sobre todo las de peso menor.

EFFECTO DE LOS METABOLITOS DEL MELANOMA M-3 Y DE LOS FIBROBLASTOS DE RATON SOBRE SUS CELULAS PRODUCTORAS Y OTRAS.

Se utilizaron las fracciones obtenidas al eluir el medio del melanoma M-3 de colecta diaria, para fines practicos la fracción intermedia con moléculas aún mezcladas (B, fig. 1) se consideró como una sola. Las fracciones del medio de fibroblastos también se

utilizaron para tener una comparación entre los metabolitos derivados de las células malignas y derivados de células normales muy activas por ser de origen embrionario. Cada una de estas fracciones moduló la actividad de fibroblastos, la de otras líneas tumorales, del mismo melanoma y la de linfocitos T. La actividad se evaluó de acuerdo a la respuesta mitogénica a cada fracción mediante la incorporación de timidina tritiada que da solo un índice del ADN sintetizado lo cual no necesariamente indica si existe proliferación celular, (Hudson & Hay 1990). Como se muestra en la fig.4 el melanoma M-3, del cual se obtuvieron los metabolitos a probar, varió su porcentaje de incorporación dependiendo del tiempo de exposición tanto al medio de melanoma como al medio de fibroblastos. En estos ensayos los metabolitos estuvieron mezclados (fracciones A y B) y tal vez la respuesta fue el resultado de efectos antagonicos o sinérgicos de estos. Así mismo cuando se utilizaron medios completos tanto de melanoma como de fibroblastos en otras líneas celulares (fig.4) la respuesta varió con el tiempo y en general se apreció que el medio de melanoma no estimuló a todas líneas celulares solo al glioma C6 y al melanoma RPM1 en los primeros intervalos de tiempo, esto pudo deberse a que estas células provienen todas de las crestas neurales y podrían tener los mismos sitios de unión o receptores para factores de crecimiento comunes.

Es posible que cuando el melanoma M-3 se estimuló a las 48 hrs con las fracciones B y C y se inhibió con la fracción A de su medio (fig. 3), en el cultivo haya existido mayor cantidad de la fracción A que inhibió la actividad del melanoma. Este efecto pudo darse en determinados tiempos del desarrollo del cultivo y mas probablemente cuando existen en gran número de células. Aunque la primera fracción de los fibroblastos también inhibió la actividad en el melanoma a las 48 hrs. esto no sucedió cuando esta fracción estuvo mezclada con las otras y tal vez su acción sea en otro tiempo y /o en otras circunstancias.

Como ya se ha establecido los factores de crecimiento transformantes son aquellos que como su nombre lo indica confieren cambios fenotípicos en células blanco y les dotan de características de malignidad (Sporn & Todaro, 1980 y Green, 1989), en los ensayos que se realizaron al exponer a las diferentes líneas tumorales con el medio colectado de melanoma M-3 no se observaron cambios aparentes en la morfología de esas células, incluso los cambios no se dieron en los fibroblastos. Cabe señalar, sin embargo que los melanocitos del M-3 al estar sin suero adquirieron una morfología típica de células nerviosas en cultivo, muy parecidas a la morfología que presentan las células del glioma C6 en cultivo normal, esto hizo suponer que en el cultivo se estuviera sintetizando factor de crecimiento nervioso, el cual se sabe puede ser producido por algunas células de melanoma (Fabrician y col. 1977). Esta posibilidad no pudo ser corroborada aunque en la electroforesis existieron bandas con peso molecular menor a 50 Kd que indicarian la posible presencia de este factor cuyo peso es de 26 Kd.

EFFECTO DE LOS METABOLITOS DEL MELANOMA M-3 Y DE LOS FIBROBLASTOS EN LINFOCITOS T, Y LINFOCITOS T LYT -3, -4 Y LYT-2.

Antes de discutir los resultados con los linfocitos T hay que recordar que en el sistema inmunológico las células no actúan solas si no que dependen unas de otras. Así los linfocitos T responden a la presencia de moléculas sintetizadas por otras células principalmente aquellas que actúan como presentadoras de antígeno, entre ellas algunos melanomas (Alexander y col. 1989) y que incluso pueden presentarlo en forma soluble. En este trabajo se trató de evaluar el efecto neto de los metabolitos obtenidos en el medio donde se cultivo un melanoma sin suero sobre los linfocitos T directamente, es decir sin utilizar alguna otra célula que funcionara como presentadora de antígeno. Se observó que las poblaciones ricas en linfocitos T se estimularon ligeramente a las 24 hrs. con la fracción A (fig. 5) una de las dos fracciones que se trabajaron en el ensayo "in vivo". Las poblaciones de linfocitos T ricas en Ts fueron estimuladas con la fracción C a 48 hrs. (fig. 8). Lo que se apreció en estos resultados fue un decremento en la incorporación de timidina tritiada por parte de los linfocitos, lo cual indica que estos metabolitos de origen tumoral tienden a disminuir la actividad de los linfocitos T, sin diferenciar subpoblaciones.

Recientemente Bennicelli J. y sus colaboradores (1989) reportaron la producción de interleucina-1 por parte de varias líneas de melanoma humano, y aunque reportaron actividad de timocitos ante la molécula extraída a partir del medio de cultivo de los melanomas, no quedó claro si realmente se trata de la interleucina-1, ya que el peso molecular no correspondió con la molécula ya caracterizada aun cuando su actividad se logró bloquear utilizando anticuerpos monoclonales contra la interleucina-1. Ellos concluyen que la molécula de interleucina-1 derivada de los melanomas es diferente a la derivada de los monocitos.

En el presente trabajo las fracciones A y B del melanoma M-3 se probaron para su estimulación en dos tipos de linfocitos T (figs. 7 y 8), y en general se encontró que ninguna fue capaz de aumentar la incorporación de timidina tritiada en los linfocitos de manera considerable, mas bien se notó un decremento en la actividad de los mismos. Probablemente entre las bandas con peso molecular menor de 50 Kd presentes en la fracción B del medio del melanoma M-3, alguna correspondió al peso referido por Bennicelli et. al. (1989). Sin embargo esta fracción no estimuló a los linfocitos T, probablemente debido a su coexistencia con otras moléculas.

EFFECTO EN EL DESARROLLO TUMORAL "IN VIVO" DE LAS FRACCIONES A Y B DEL MELANOMA M-3.

Si se considera el efecto en la actividad de las células que tuvieron las fracciones A y B del medio de melanoma M-3 "in vitro" y se trata de correlacionar con los resultados "in vivo" se deben considerar varias diferencias como la presencia de otros factores

de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes en el huésped, así como su estado inmune (Sutherland, 1988). La fracción A "in vitro" en medio libre de suero tuvo un efecto inhibitorio en la actividad de los melanocitos malignos de los cuales derivó (fig. 3), asimismo los ratones inmunizados con esta fracción presentaron un retardo en la aparición del tumor y un crecimiento menor. Por otro lado la fracción B estimuló la actividad del melanoma "in vitro" a mayor tiempo (fig. 3) y los ratones inmunizados con esta fracción presentaron una aceleración del crecimiento tumoral. Lo paradójico de estos resultados radica en que las fracciones se administraron a los ratones antes del reto con las células tumorales teniendo oportunidad de provocar una respuesta inmune que los bloqueara, que era lo que se pretendía para poder definir su probable papel en el desarrollo tumoral "in vivo".

Aunque se utilizaron antígenos solubles en la inmunización, los cuales se supone dan reacciones inmunológicas muy débiles y para potenciarla se tienen que unir a un hapteno o usar un adyuvante (Woir, 1979), en el ensayo "in vivo" no hubo diferencias en el desarrollo tumoral entre los grupos con adyuvante y sin este (tabla 1). Probablemente se crearon anticuerpos contra algunos o algún metabolito dejando actuar libremente a otros que se pudieron estar sintetizando por el propio tumor o por células del huésped. O por otro lado la previa administración en el huésped de estos metabolitos preparó al sistema inmune para responder a la presencia del tumor. En el caso de la fracción A tal vez estimuló a las células Th que como se observó "in vitro" activó a los linfocitos Th a las 24 hrs (fig. 7). En el caso de la fracción B suprimiendo esta respuesta. Los metabolitos que deprimieron la respuesta de los linfocitos T "in vitro" tal vez también lo hicieron "in vivo" así como quizá deprimieron la respuesta humoral y en todo caso a los linfocitos B. Es conocido que los pacientes con cáncer están inmunosuprimidos por causa de la misma enfermedad o que esta inmunosupresión puede originar el padecimiento. Considerando esta premisa los resultados del ensayo "in vitro" con los linfocitos T podrían apoyar la hipótesis de que la inmunosupresión está dada por productos tumorales solubles que inhiben la respuesta de las células del sistema inmunológico, en particular las células T como lo propone Nepom (Nepom et. al. 1983). Aunque existen reportes (Nepom 1977, Di Giacomo & North, 1986, Tsuda, 1987, Moon, 1987a, Moon, 1987b y Prehn & Prehn 1987) que señalan la participación de los linfocitos T en la inmunosupresión en el cáncer, no se sabe si son antígenos de superficie del tumor o productos solubles los que desencadenan esta inmunosupresión (Tsuda y col., 1987, North y col. 1989, Oldham 1990 y Sickler y col. 1991). De aquí la importancia de los resultados del presente trabajo, si se considera que los productos del melanoma B-3 deprimieron la respuesta de los linfocitos T "in vitro" (fracción B, fig. 5, fracciones A y B fig. 6, y figs. 7 y 8) ya se tiene evidencias de que probablemente son los factores solubles los que suprimen la respuesta inmune en el cáncer, pues los estudios "in vivo" revelaron que los animales a los que se les inyectó la fracción B presentaron un aceleramiento en el

crecimiento tumoral y su respuesta humoral fué pobre, como ya se indicó esta fracción consta de dos o tres moléculas cuyo estudio podría ser interesante para dilucidar la inmunosupresión en este sistema tumoral. Así mismo el estudio de la fracción A como probable retardador del crecimiento tumoral conduciría a buscar formas de protección o profilaxis en contra del crecimiento de este sistema tumoral. Ambas fracciones no fueron caracterizadas sin embargo un estudio detallado y minucioso revelaría su identidad ya sea como factores de crecimiento conocidos o como moléculas nuevas. La fracción A del medio del melanoma consta de 5 moléculas de peso molecular mayor a 50 Kd. Entre estas podríamos encontrar a algunos factores derivados de plaquetas (pm=100 Kd), y otras moléculas que tengan acción directa sobre células del sistema inmune que no necesariamente sean linfocitos T. Si esto es así su presencia en el huésped antes del reto con las células tumorales lo prepararía, montándose una respuesta inmune, y esto trajo un retraso en la aparición tumoral. Este mecanismo de defensa decayó probablemente debido a que se terminó el estímulo por la carencia de esas moléculas, ya que el tumor puede producirlas quizá en una etapa avanzada del desarrollo tumoral.

En conclusión los resultados del efecto de los metabolitos parcialmente purificados a partir del cultivo del melanoma M-3 sin suero, en el desarrollo tumoral "in vitro" e "in vivo" deben considerarse solo como un nuevo camino a seguir en el estudio de los factores de crecimiento de los que hasta ahora se sabe mucho de su estructura pero aún quedan muchas incógnitas respecto a sus funciones particularmente en lo que se refiere al complejo sistema inmune.

CONCLUSIONES

La fracción A del medio del melanoma M-3 inhibió la actividad del mismo "in vitro", y retardó su desarrollo "in vivo".

La fracción B del medio del melanoma M-3 estimuló la actividad del mismo "in vitro" y aceleró su desarrollo "in vivo".

Las fracciones del medio del melanoma M-3 y las fracciones del medio de fibroblastos, estimularon o inhibieron a las diferentes líneas celulares, dependiendo del tiempo y de la célula blanco.

Ninguna de las fracciones A y B del medio del melanoma M-3 fue capaz de estimular a los linfocitos Lyt-2 y a los linfocitos Lyt-3,-4, mas bien ejercieron un decremento en la actividad de los mismos.

Estos resultados deben considerarse como un nuevo camino a seguir en el estudio de los factores de crecimiento de los que existen aun incógnitas respecto de sus funciones, particularmente en lo que se refiere al sistema inmune.

REFERENCIAS

- Alexander M.A. , J. Benicelli and D. Guerry IV. 1989. Defective antigen presentation by human melanoma cell lines cultured from advanced but not biologically early disease. *J. of Immunol.* 142 (11):4070-4078.
- Anzano M., D. Rieman W. Prichett, D. F. Bowen-Pope and. R. Greig. 1989. Growth factor production by human colon carcinom cell lines. *Cancer Research* 49: 2898-2904.
- Asoian R. A., Komoriya, Ch. A. Meyers, D.M. Miller and M.B. Sporn. 1983. Transforming growth factor beta in human platelets. *J. of Biological Chemistry* 258 (11):7155-7160.
- Asoian R.A.1985. Biphasic effects of tipe beta transforming growth factor on epidermal growth factor receptors in NRK fibroblasts. *J of Biological Chemistry* 260 (17):9613-9617.
- Benicelli J., J. Elias, J. Kern and Du Pont Guerry IV. 1989. Production of interleukin 1 by cultured human melanoma cells. *Cancer Research* 49:930-935.
- Bradshaw R. 1978. Nerve growth factor. *Ann. Rev. Bioch.* 47:191-216
- Castro J. E. 1978. Immunological aspects of cancer. MTP. Press. London.
- Conn G., D.D. Soderman, M.T. Schaefer, M. Wile, V. Hatcher and K. Thomas. 1990. Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1323-1327.
- Cook J. and J.K. Chen. 1988. Enhancement of transformed cell growth in agar by serine protease inhibitors. *J. of Cellular Physiology* 136:188-193.
- Czech M. 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59:235-238.
- Chess L., RP. Mc Dermott and Stuart F. Schlossman.1974. Immunological functions of isolated human lymphocyte subpopulations 113 (4):1113-1121.
- De Larco J. , D.A. Pigott and J.A. Lazarus. 1985. Ectopic peptides released by human melanoma cell line that modulate the transformed phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5015-5019.
- De Vore D. P. , Houchens D.P., A.A. Ovejera, Dill G.S. and T.B. Hutson. 1980. Collagenase inhibitors retarding invasion of a human tumor in nude mice. *Expl. Cell. Biol.* 48:367-373.

- Di Giacomo A., and R. North. 1986. T cell suppressors of antitumor immunity. *J. exp. med.* 164: 1179-1192.
- Fabricant R., J.E. De Larco and G. Todaro . 1977. Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (2): 565-569.
- Fanger B., L. M. Wakefield and M. Sporn. 1986. Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta. *Biochemistry* 25:3063-3091.
- Fernandez J. A., D. J. Elos and G. A. Grant. 1986. Purification and biological properties of type beta transforming growth factor from mouse transformed cells. *Cancer Research* 46:5153-5161.
- Folkman J., M.D.E. Merier, C. Abernathy and G. Williams. 1970. Isolation of tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 49:275-289.
- Folkman J., K. Watson, D. Inberg and D. Hanahan. 1989. Induction of angiogenesis during the transition from hiperplasia to neoplasia. *Nature* 339:150-152.
- Fontana A., F. Kristensen, R. Dubs, D. Gemsa and E. Webwer. 1982. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J. of Immunol.* 129 (6):2413-2419.
- Frazier W. A., R. Hogue and R. Bradshaw. 1977. Nerve growth factor and insulin. *Science* 176:482-486.
- Fritz I. B. 1938. Perspectives on the biology of growth factors. *Ad. in Exp. Med. Biol.* 234:1-8.
- Fuyama S., H. Yamamoto, Y. Fujii and S. Arai. 1966. Mechanisms of "in vivo" generation of cytotoxic effector cells against tumor in tumor-bearing mice. *Cancer Research*. 46:5548-5552.
- Gospodarowicz D. 1988. Molecular and developmental biology aspects of fibroblast growth factor. *Ad. in Exp. Med. and Biol.* 234:23-38.
- Green A. R. 1989. Peptide regulatory factors multifunctional mediators of cellular growth and differentiation. *Lancet* 1:705-709.
- Hammarstrom S., U. Hellstrom, P. Perlmann and M.L. Dillner. 1973. A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 138:1276-1276.
- Hagag N., S. Hologoua and M. Viola. 1986. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 319:680-682.

- Hudson E. and Hudson M. 1990. Practical Immunology. Raven Press. London.
- Held W., H. R. McDonald, I. L. Weissman, M. Hess and C. Mueller. 1990. Genes encoding tumor necrosis factor- α and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2239-2243.
- Holley R., P. Bohlen, R. Fava, H. Baldwin, G. Kleeman and R. Armour. 1980. Purification of kindley epithelial cell growth inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 (10):5989-5992.
- Hoon D. S. , R. J. Buwker and A. J. Cochran 1987a. Suppressor cell activity in melanoma draining lymph nodes. Cancer Research 47:1529-1533.
- Hoon D. S., E. L. Korn and A. J. Cochran. 1987b. Variations in functional immunocompetence of individual tumor-draining lymph nodes in humans. Cancer Research 47:1770-1744.
- Hunter T. 1986. Cell growth control mechanisms. Nature 323:14-16.
- Hudson L. and F. C. Hay. 1990. Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications. 2n. ed. London.
- Ishikawa F., K. Miyasono, U. Hellman, H. Drexler, C. Wernsted, K. Hagiwara, K. Usuki, F. Takaku, W. Risau and C. Hand-Hanael. 1989. identification of angiogenic activity and the cloning and expression of plated-derived endothelial cell growth factor. Nature 338:557-561.
- Iwata K., C. Fryling, W. B. Knott and G. Todaro. 1985. Isolation of tumor cell growth-inhibiting factors from a human rhabdomyosarcoma cell line. Cancer Research 45:1934-1939.
- Julius M. H., Simpson and L.A. Herzenberg. 1973. A rapid method for isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 3:645-649.
- Kabat, E.A. 1976. Structural concepts in immunology and immunochemistry. Rinehar Winston. pp. 16-41.
- Kesky-Oja J., R. M. Lyons and H. L. Moses. 1987. Immunodetection and modulation of cellular growth with antibodies against native transforming growth factor- β . Cancer Research 47:6451-6458.
- Keski-Oja J. 1987. Growth inhibitory polypeptides in the regulation of cell proliferation. Med. Biol. 65:13-20.
- Kimchi A., X. Wang R. A. Weinberg, S. Cheifetz, J. Massagué. 1987. Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. Science 240:196-199.

Kromer L. 1986. Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 235:214-216.

Lachman L., D.C. Brown and C.A. Dinarello. 1987. Growth promoting effect of recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J. of Immunol.* 138:2913-2916.

Laemmli U. K. 1970. *Nature* 227:680.

Lahio M., O. Saksela, P.A. Andreasen and J. Keski-Oja. 1986. Enhanced production and extracellular deposition of endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. of Cell Biol.* 103 (6):2403-2410.

Lahio M. 1988. Modulation of extracellular proteolytic activity and anchorage-independent growth of cultured cells by sarcoma cell-derived factors: relationships to transforming growth factor beta. *Exp. Cell. Res.* 176:297-308.

Lahio M., and Keski-Oja. 1989. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Research* 49:2898-2904.

Lee P., D. E. Johnson, L. C. Counsels, V. A. Fried, L. T. Williams. 1989. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblastic growth factor. *Science* 245:57-59.

Levine A. L. J., Mc. Rae, D. Hamilton, D. E. Brattain, L. C. Yeoman and M. Brattain. 1985. Identification of endogenous inhibitory growth factors from a human colon carcinoma cell line. *Cancer Research* 45:2248-2254.

Liesi P., L. Rechard and J. Wartiovara. 1983. Nerve growth factor induces adrenergic neuronal differentiation in F9 teratocarcinoma cells. *Nature* 306:265-267.

Lewry C. H., Rosenbrough N. J. and R. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.

March S. C., I. Parikh and P. Cuatrecasas. 1971. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 60:149-152.

Massagué J. 1987 a. the TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49:437-438.

Massagué J. 1987 b. Absence of TGF-beta receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 240:196-199.

Mooradian D. A., F. Purchio and L. Furcht. 1990. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the growth of poorly and highly metastatic murine melanoma cells. *Cancer Research* 50:273-277.

Nepom J. T., J. Hellstrom and K. E. Hellstrom. 1977. Antigen specific purification of blocking factors from sera of mice with chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 74:4605-4609.

Nepom J. T., J. Hellstrom and K. E. Hellstrom. 1983. Suppressor mechanisms in tumor immunity. *Experientia*. 39 (3):235-345.

Nicolson G. 1982. Cancer metastasis. Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochimica Biophysica Acta* 695:113-176.

Nicolson G. 1987. Tumor cell instability diversification and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Research* 47:1473-1478.

Nisonoff A. 1984. Introduction to molecular Immunology. Sinaver. Massachusetts.

North R. J. and I. Bursuker. 1984. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. *J. Exp. Med.* 159:1295-1311.

North R. J., M. Awwad and P. L. Dunn. 1989. The immune response to tumors. *Transplantation Proceedings* 21 (1):575-577.

Nowell P. C. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal leucocytes. *Cancer Research*. 20:462-466.

Nugent M., E. A. Lane, J. Keski-Oja, H. L. Moses and M. J. Newman. 1989. Growth stimulation altered regulation of epidermal growth factor receptors, and autocrine transformation of spontaneously transformed normal rat kidney cells by transforming growth factor-beta. *Cancer Research* 49:3884-3889.

Oldham R. K. 1988. Principles of cancer biotherapy. Raven Press. New York.

Okcefe E., M. Hollenberg and P. Cuatrecasas. 1974. Epidermal growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 164:518-526.

Olli S., D. Moscatelli and D. B. Rifkin. 1987. The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J. of Cell Biol.* 105:957-963.

Olwin B. B. and S. Hauschka. 1990. Fibroblast growth factor receptor levels decreased during chick embryogenesis. *J. of Cell Biol.* 110:503-509.

Onozaki K., K. Matsushima., B. Aggarwal and J. Oppenheim. Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J. of Immunol.* 135:3962-3966.

Parker R. E. 1976. *Estadística para biólogos*. Omega, Barcelona. pp. 20-24.

Parratto N., J.M. Odebralski and K. Kimura. 1989. Poorly metastatic tumor cell variants as primary of syngenic antibody responses against murine melanoma. *Cancer Research* 49:3722-3728.

Paul W.E. 1989. *Fundamental Immunology*. Raven Press. New York.

Petrides P. and E. Shooter. 1986. Rapid isolation of the 7S-nerve growth factor complex and its subunits from murine submaxillary glands and saliva. *J. of Neurochemistry* 46 (3):721-725.

Prehn R. and L. M. Prehn. 1987. The autoimmune nature of cancer. *Cancer Research*. 927-932.

Roberts A., M. Anzano, C. A. Meyers, J. Wideman, R. Blacher, Y. Pan, S. Stein, R. Lehrman, J. M. Smith, Loirs, C. Lamb and M. Sporn. 1983. Purification and properties of type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22:5692-5698.

Roberts A., M. Anzano, L. Wakefield, N. S. Roche, D. F. Stern and M. Sporn. 1985. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:119-123.

Rook A. H., J. H. Kehrl, L.M. Wakefield, A.B. Roberts, M. B. Sporn, D. B. Burlington, H. C. Lane and A. S. Fauci. 1986. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells. *J. of Immunol.* 136 (10):3916-3920.

Schlessinger J. 1988. Regulation of cell growth and transformation by the epidermal growth factor-beta receptor. *Adv. in Exp. Med. and Biol.* 234:65-73.

Schlossman S. and L. Hudson. 1973. Specific purification of lymphocyte populations on a digestible immunoabsorbente. *J. of Immunol.* 110 (1):313-315.

Schroy P., T. Rifkin, J. Coffey, S. Winawer and E. Friedman. 1990. Role of transforming growth factor-beta-1 in induction of colon carcinoma differentiation by hexamethylene bisacetamide. *Cancer Research* 50:261-265.

Schwartz and Costa. 1979. Nerve growth factor-mediated increase of the substance P content of chick embryo dorsal root ganglia. *Brain Research* 170 :198-202.

Sela M. 1969. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 166:1165-1174

Sen A. and G. Fareed. 1987. Oncogenes and growth factors in cancer. Principles of cancer biotherapy. Oldham Raven Press. New York. pp. 447-457.

Sickler J. T., L. L. Pickard and D. R. Salomon. 1991. Suppressor cells and T cell synergy in the primary MLR. *Cellular Immunol.* 134:390-401.

Sporn M. and G. Todaro. 1989. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *The New England Journal of Medicine* 383 (15):878-880.

Stoscheck C., and L. E. King Jr. 1986. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Research* 46:1030-1037.

Sugimura K., T. Ohno., S. Fukuda, Y. Wada, T. Kimura and I. Azuma. 1990. Tumor growth inhibitory activity of a lymphocyte blastogenesis inhibitory factor. *Cancer Research*. 50:345-349.

Sutherland R. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240:177-184.

Tanaka K., Y. Taniguchi and K. Nomoto. 1987. T cell recruitment from the thymus to the spleen in tumor bearing mice: phenotypical alteration and recruitment of thymocytes raised in a tumor bearing stata. *Cancer Research*. 47:2136-2141.

Todaro G., C. Fryling and J. E. de Larco. 1980. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact whit epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (9):5258-5992.

Tsuda T., Y. Tai Kim, G. W. Siskind, A. de Blasio, R. Schwab, W. Ershler and M. E. Weksler. 1987. Role of the thymus and T cells in slow growth of B16 melanoma in old mice. *Cancer Research* 47:3097-3100.

Tsuboi R., Y. Sato and D. B. Rifkin. 1990. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor numer, proteinase production and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J. of Cell. Biol.* 110:511-517.

- Tucker R., M. E. Volkenant, E. L. Branun and H.L. Moses. 1983. Comparison of intra and extracellular transforming growth factors from nontransformed and chemically transformed mouse embryo cells. *Cancer Research* 43:1581-1586.
- Tucker R., G. Shipley, H. Mosses and R. Holley. 1984. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to plated type beta transforming growth factor. *Science* 226:705-707.
- Twardzik D., E. S. Kimball, S. A. Sherwin, J. E. Ranchalis and G. J. Todaro. 1985. Comparison of growth factors functionally related to epidermal growth factor in the urine of normal and human tumor bearing athymic mice. *Cancer Research* 45:1934-1939.
- Welsch C. 1985. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggings. *Cancer Research* 45:3415-3443.
- Weir D. M. 1978. *Handbook of experimental immunology*. Blackwell Publications. London.
- Westermarck B., A. Johnson, Y. Paulsson, C. Betscholtz, C. Heldin, M. Herlyn, U. Rodeck and H. Koprowski. 1986. Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:7197-7200.
- Yamashina K., Miller B. and G. H. Heppner. 1986. Macrophage mediated induction of drug-resistant variants in a mouse mammary tumor cell line. *Cancer Research* 46:2396-2401.
- Yeh Y. C. , A. Scheving, T. S. Tsai and L. E. Scheving. 1981. Circadian stage-dependent effects of epidermal growth factor on deoxyribonucleic acid synthesis in ten different organs of the adult male mouse. *Endocrinology* 109 (2):644-655.
- Yung A. , R. Lotan, P. Lee, D. Lotan and P. Steck. 1989. Modulation of growth and epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in human glioma cells. *Cancer Research* 49:1014-1019.
- Zangemeister-Wittke U., B. Kyewski and V. Schirmacher. 1989. Recruitment and activation of tumor specific immune T cells in situ. *J. of Immunol.* 143 (1):379-385.