

UNION DIFERENCIAL DE ACIDO HIALURONICO EN DOS SUBLINEAS CELULARES CD44+ POSIBLE IMPLICANCIA EN LA INFILTRACION TUMORAL

GLENDIA M. ERNST, ELOISI CALDAS LOPES*, PAULA V. CABRERA*, ELIDA ALVAREZ, SILVIA E. HAJOS****

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Resumen A partir de un linfoma T murino de origen espontáneo LB se estableció una línea celular LBL que fue caracterizada. Por análisis histopatológicos se demostró que el tumor parental inoculado en ratones singeneicos infiltró bazo, ganglios linfáticos, hígado, timo, médula ósea y pulmón, mientras que la línea celular lo hizo en estos mismos órganos pero no en pulmón. A partir de la línea LBL se originaron dos sublíneas con características diferentes. Una de ellas creció en suspensión formando grumos (LBLc) mientras que la otra lo hizo adheriéndose al frasco de cultivo (LBLa). Cuando se evaluó la velocidad de crecimiento, respuesta a estímulos mitogénicos e inducción de apoptosis se observaron algunas diferencias entre la línea celular y las sublíneas. Se analizó la expresión de la glucoproteína de superficie CD44 encontrándose que tanto la línea madre LBL como la sublínea LBLa expresaron esta molécula constitutivamente, mientras que LBLc necesitó ser estimulada con PMA para alcanzar estos niveles de expresión. Las células LBLa unieron ácido hialurónico (AH), por el contrario las células LBL y LBLc no lo hicieron ni aun luego de ser activadas con PMA. Se postula que la unión diferencial de AH podría estar relacionada con una diferente capacidad de anclaje e infiltración en los distintos órganos.

Abstract *Differential binding of hyaluronic acid in two CD44+ sublines. Relationship with tumor infiltration.*

We have established and characterized a cell line (LBL) from a spontaneous murine T lymphoma LB. Histopathological analysis has demonstrated LB primary tumor infiltration in spleen, lymph nodes, liver, thymus, bone marrow and lung. However LBL cells infiltrated all these organs except lung. Two sublines with different growth behavior were derived from LBL cell line. One of them grew in suspension as clusters (LBLc) while the other one grew as adherent monolayers (LBLa). Growth rate, response to mitogenic stimuli and apoptosis induction were different among the parental cell line and the derived sublines. CD44 was expressed constitutively in LBL and LBLa cells. In contrast LBLc cells only expressed similar levels of this molecule when stimulated with PMA. LBLa cells showed hyaluronic acid (HA) binding properties, while LBL and LBLc cells were not able to bind HA even when activated with PMA. We postulate that differences in HA binding could be related with different infiltration behaviors.

Key words: HA binding, CD44, tumor cell lines

Los linfocitos normalmente circulan por la sangre y la linfa para dirigirse a los órganos linfoides y tejidos. Este tráfico está controlado por quimocinas que direccionan la migración celular y modulan la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie celular posibilitando la adhesión y trans migración a través del endotelio vascular, hacia los órganos linfoides secundarios o hacia los sitios de inflamación.

La glucoproteína de 90 kDa denominada CD44 es una molécula de adhesión que se expresa sobre la su-

perficie de diversos tipos celulares, incluyendo las del linaje hematopoyético. Esta molécula fue descrita inicialmente por estar involucrada en el tráfico de leucocitos y en la migración celular¹. Posteriormente, la correlación encontrada entre la expresión de CD44 y la capacidad migratoria de diferentes subpoblaciones de linfocitos avalaron este concepto, ya que los linfocitos circulantes de sangre periférica o los timocitos medulares expresan altos niveles de CD44 (CD44^{hi}) mientras que las células de los centros germinales o

Recibido: 11-V-00

Aceptado: 14-VI-00

*Becario de la Universidad de Buenos Aires

** Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Dirección postal: Dra. Silvia E. Hajos, Universidad de Buenos Aires, (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4964-0024 e-mail: shajos@huemful.fyb.uba.ar

Abreviaturas:

AH: ácido hialurónico
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
ConA: concanavalina A
CsA: ciclosporina A
LB: linfoma T murino
LBL: línea celular de LB
LBLc: crecimiento en suspensión
LBLa: células adheridas al frasco de cultivo
PMA: acetato miristato de forbol

los timocitos corticales se caracterizan por una baja expresión (CD44^{lo})².

Actualmente se sabe que CD44 cumple una variedad de funciones: es un antígeno de diferenciación durante la linfopoyesis, actúa como molécula de adhesión en interacciones entre linfocitos y células endoteliales, puede remodelar la matriz extracelular durante el desarrollo embriogénico y constituye un potencial marcador de malignidad tumoral y metástasis³. Esta versatilidad de funciones es debida a la heterogeneidad molecular generada por combinación de exones.

La familia de CD44 está codificada por un gen que contiene 20 exones, 10 de los cuales son constantes y los otros 10 (del 6 al 16) pueden expresarse o no, ya que están sujetos a un proceso de *splicing* alternativo, generando un alto número de isoformas. La isoforma más simple es la estándar o hematopoyética que no expresa ningún exón variable. La complejidad de esta molécula es aumentada por glucosilaciones diferenciales que modifican sus características de adhesión permitiendo a cada isoforma interactuar con diferentes sustratos⁴. Algunas de estas isoformas cumplen un importante rol en procesos de progresión tumoral^{5, 6}.

El principal ligando del CD44 es el ácido hialurónico (AH), que se expresa sobre la matriz extracelular, tejido conectivo y fluidos del organismo^{7, 8}. Sin embargo, también puede interactuar con condroitin sulfato, laminina, colágeno tipo I y IV, fibronectina, osteopontina y adreínas de la mucosa vascular⁹. La capacidad de las células para interactuar con AH está estrictamente regulada y es dependiente del tipo de células que expresan el receptor así como de su estado de activación y diferenciación¹⁰.

Utilizando células de melanoma tanto humanas como murinas se demostró una correlación entre la expresión de AH y la capacidad invasiva¹¹ y se postuló que la presencia de AH en la superficie de las células tumorales facilitarían su interacción con las células CD44+ del huésped¹².

El tumor LB se originó como una leucemia linfocítica de origen espontáneo, no inmunogénico, que crece rápidamente en el huésped singéico infiltrando hígado, bazo y ganglios linfáticos¹³. La caracterización fenotípica de las células tumorales demostró que estaban constituidas por linfocitos T, CD3-, CD8+, CD4-, CD25+, J11d+, gp70-, que presentaban antígenos del CMH de clase I pero no de clase II¹⁴. Posteriormente se puso en evidencia que las células LB también expresan moléculas de adhesión, entre ellas la integrina LFA-1 (CD18/CD11a) y el CD44¹⁵. Estas moléculas podrían cumplir una función en la movilización celular y en el anclaje selectivo en diversos órganos y tejidos, aunque no se encontró una correlación entre el aumento en la expresión de CD44 y la invasividad¹⁶.

En este trabajo describimos el establecimiento de una línea celular a partir de la leucemia murina LB y dos sublíneas derivadas de ésta. Todas ellas mostraron un comportamiento similar al de las células del tumor original frente a agentes inmunomoduladores. Por el contrario presentaron características diferenciales en la expresión de la proteína CD44 en la superficie celular y la unión a AH, propiedades que podrían estar relacionadas con su capacidad de anclaje e invasión en los diferentes órganos.

Materiales y métodos

Establecimiento de líneas celulares a partir del tumor LB

Para el establecimiento de la línea LBL se utilizaron células ascíticas del tumor LB (2.5 x 10⁶ células/ml) que fueron cultivadas a 37 °C en presencia de 4% de CO₂ en medio RPMI-1640 (GIBCO, NY, USA) suplementado con 2 mM L-glutamina, 25 mM buffer HEPES, 1% aminoácidos no esenciales, 1 mM piruvato de sodio, 0.5 mM de 2-β mercaptoetanol, 100 µg/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin (RPMI-C), adicionado de 10% SFB. La concentración y la viabilidad celular se determinaron por conteo en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión con azul Tripán. Actualmente se mantienen en RPMI-C adicionado de 5% SFB.

De la línea madre LBL constituida por dos subpoblaciones celulares con características diferentes de crecimiento se obtuvieron dos sublíneas, LBLc que crece en suspensión formando grumos y LBLa que crece adherida al frasco de cultivo. Para repicar esta última se utilizó Tripsina-EDTA (0.25% Tripsina, 1 mM EDTA.4Na) (GIBCO, NY, USA).

Las células se analizaron periódicamente para detección de micoplasmas por un kit de PCR (ATCC, USA).

Análisis histopatológico

Se inocularon lotes de 4 ratones BALB/c de un mes con 1 x 10⁶ células LB o LBL en forma sc. Luego de diez días se sacrificaron y sus órganos fueron extraídos y conservados en formol al 10% para luego ser embebidos en parafina. Se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina para su posterior observación. Los órganos de ratones normales y de ratones inoculados con solución fisiológica fueron utilizados como controles.

Tiempo de duplicación celular

El tiempo de duplicación celular fue calculado en la fase de crecimiento exponencial de acuerdo a lo descrito¹⁷, utilizando la fórmula $T_d = (0.693 \cdot t) : \ln(N/n)$, donde t = tiempo, n = concentración celular inicial y N = concentración celular final.

Proliferación celular

La respuesta a diferentes agentes moduladores del crecimiento fue evaluada mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada (³H-T) (Du Pont, NEN Products, Boston, MA, USA) según lo descrito previamente¹⁸. En una placa de 96 pocillos se incubaron 2.5 x 10⁴ células en RPMI-C en presencia o ausencia de 0.5 µg/ml ciclosporina A (CsA), 4 µg/ml Concanavalina (ConA) o con 20 ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA), durante 24 horas. Se agregó a cada pocillo 1 µCi de ³H-T y luego de 20 hs se determinó la proliferación celular en un contador β de centelleo líquido (Beckman, MD, USA).

Inducción de apoptosis por ciclosporina A

Las diferentes células fueron tratadas con 1, 0.5 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de CsA durante 20 horas, se realizó un control con etanol ya que éste se utilizó como diluyente de la CsA. Se determinó la inducción de apoptosis por análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN y por tinción celular con naranja de acridina y bromuro de etidio.

a. Análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN por electroforesis en geles de agarosa. Se llevó a cabo según la técnica descrita previamente¹⁸. Brevemente, las células se lisaron con buffer de lisis TTE (Tris-HCl/Tritón/EDTA), se incubó el sobrenadante con 5N NaCl e isopropanol durante 48 hs a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El pellet se lavó con etanol 70%, se agregó Buffer TE (Tris-HCl/EDTA) y se homogeneizó a temperatura ambiente durante 48 horas. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, con buffer TAE (tris-acetato/EDTA) y bromuro de etidio a voltaje constante (60 V). A cada muestra se le agregó 1 μl de RNasa (1 mg/ml). Las bandas se visualizaron en un transiluminador de UV (Cole Parmer, Chicago, USA).

b. Coloración con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. Se utilizó la técnica empleada previamente¹⁸. 2.5×10^5 células se resuspendieron en solución de naranja de acridina (100 $\mu\text{g/ml}$) y bromuro de etidio (100 $\mu\text{g/ml}$) y fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Alemania). En cada tratamiento se contaron 200 células discriminando las viables de las apoptóticas.

Expresión de CD44 y unión a AH

Se llevó a cabo por citometría de flujo utilizando 1×10^6 células en PBS sobre las que se agregó 1 μg de anticuerpo monoclonal anti-CD44 de ratón con especificidad para todas las isoformas (IM7, Pharmigen, San Diego, USA) y se incubó 45 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se lavó y se añadió el conjugado (anti-Ig de rata marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Pharmigen) y se volvió a incubar 45 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Luego de lavar, se resuspendieron las células en PBS para realizar la lectura en un citómetro de flujo (Ortho Cytoron Absolute, Johnson). Como control de isotipo se utilizó IgG normal de rata (Santa Cruz Biotecnology, CA, USA).

Para determinar la capacidad de unión a ácido hialurónico (AH) las diferentes líneas tumorales (1×10^6 células en PBS), estimuladas o no con PMA (2 mg/ml), se incubaron durante 45 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de AH-FITC (donado por el Dr. D. Naor). El desplazamiento se realizó con un exceso del ligando frío (AH, SIGMA, San Luis, USA) o por el agregado de un anticuerpo anti-CD44 (IM7 o KM114 Pharmigen). Se analizaron 10.000 células por tubo y los datos fueron procesados utilizando el software WinMDI (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación corresponden a tres experimentos similares donde cada punto se realizó por cuadruplicado. Los análisis estadísticos se realizaron calculando en cada caso los intervalos de confianza con un $\alpha = 0.05$.

Resultados

Establecimiento de la línea celular

Inicialmente las células LB en cultivo sufrieron una fase de adaptación hasta aproximadamente el cuarto mes,

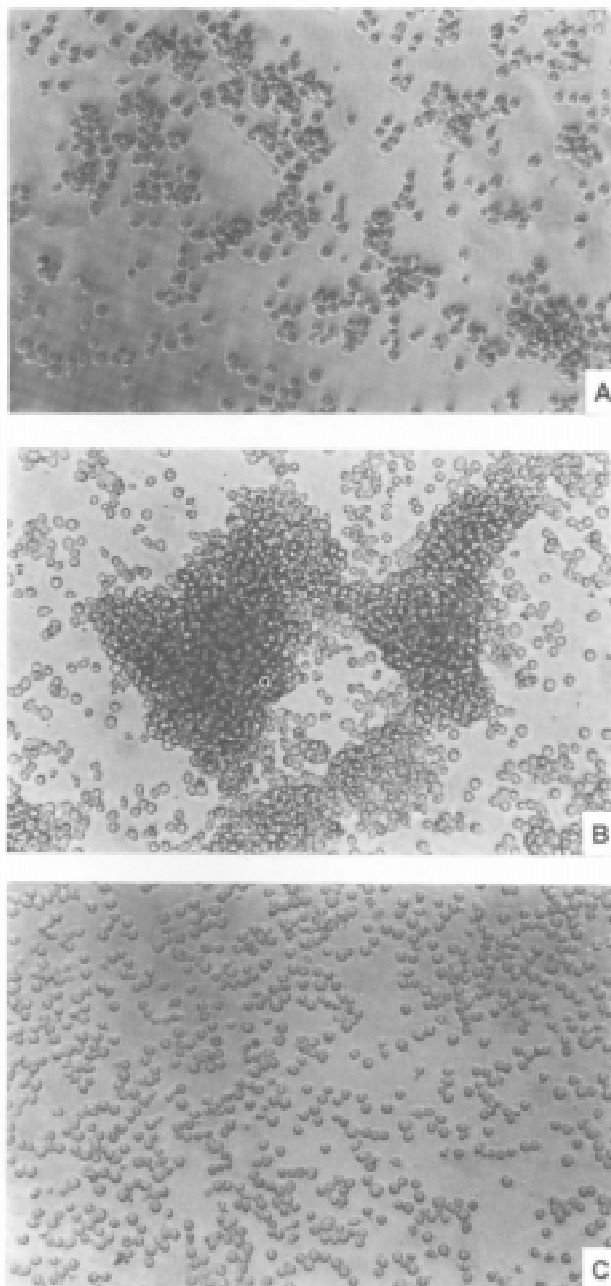


Fig. 1.— Microscopía de contraste de fases de la línea celular y las sublíneas establecidas. A) línea LBL: Se observan algunas células en suspensión formando grumos y otras adheridas al frasco, B) sublínea LBLc con células en suspensión formando grumos, C) sublínea LBLa: se observan las células adheridas al frasco de cultivo (x 200).

cuando el ritmo de crecimiento se estabilizó y la viabilidad se mantuvo por encima del 85%. Se observó que la línea celular LBL estaba formada por 2 subpoblaciones, una que crecía adherida al frasco de cultivo y otra en suspensión (Fig. 1-a). A partir del octavo mes de cultivo las células que crecían en suspensión comenzaron a

formar grumos constituyendo posteriormente la sublínea LBLc (Fig. 1-b) que se separó de las que crecían adheridas al frasco de cultivo LBLa (Fig. 1-c). Actualmente estas líneas llevan 140 pasajes y son repicadas 2 veces por semana con un requerimiento de 5% de SFB.

Cuando se determinó el tiempo de duplicación celular se encontró que en la fase proliferativa las células LBL se duplicaron en 20 horas, las LBLc lo hicieron en 24 horas y las células LBLa en 15 horas.

Análisis histopatológico

Los análisis histopatológicos revelaron que la línea LBL infiltró bazo, hígado, ganglios, timo y médula ósea mientras que el tumor LB lo hizo en estos órganos y también en pulmón. En la Fig. 2 se observa que el timo presentó un reemplazo total de los linfocitos normales por linfocitos tumorales, los ganglios linfáticos mostraron una infiltración leucémica en el área adyacente a la cápsula, el bazo

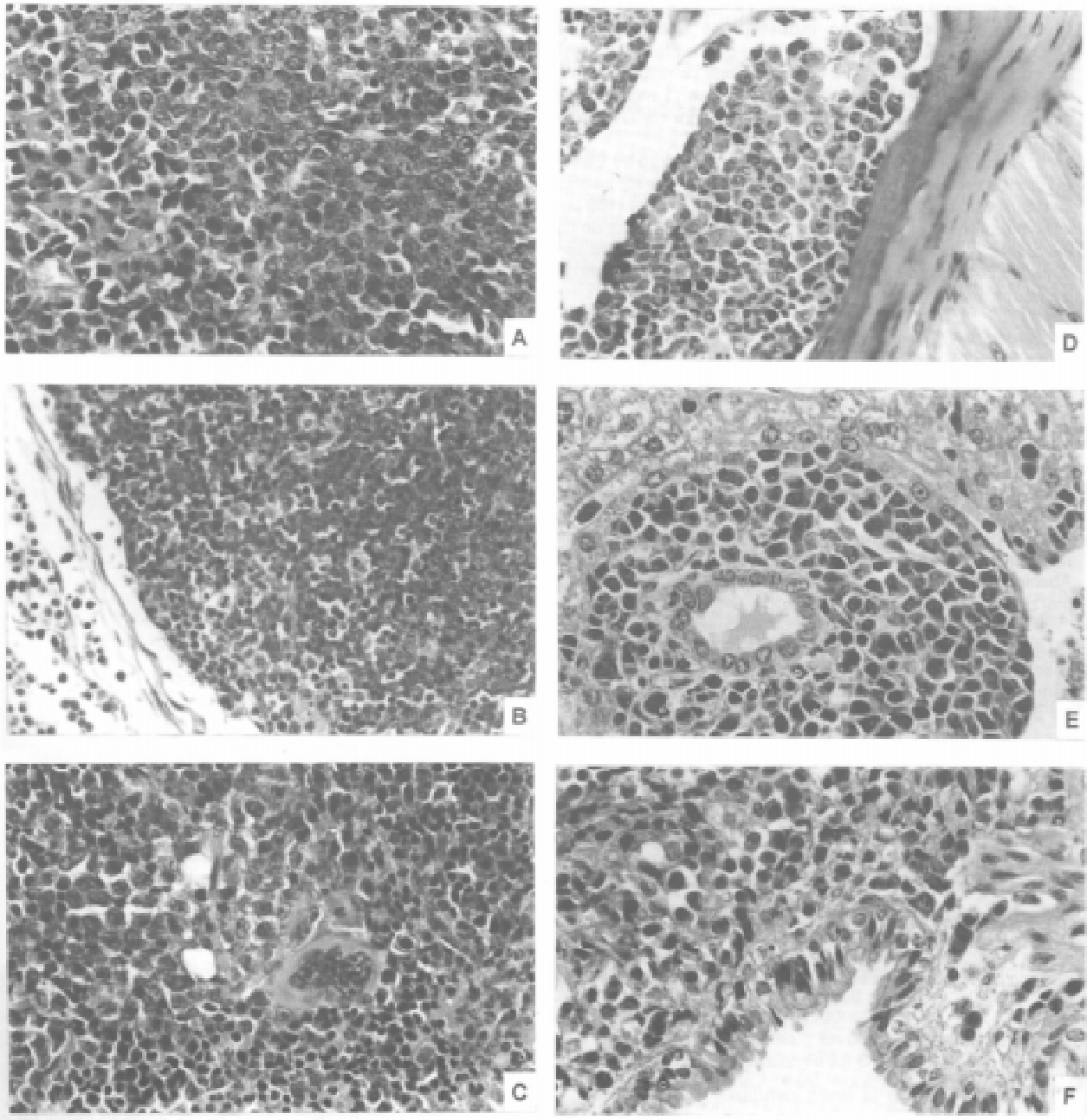


Fig. 2.— Análisis histopatológico. Puede observarse infiltración tumoral en A) Timo, B) Ganglios linfáticos, C) Bazo, D) Médula ósea (esternón), E) Hígado y F) Pulmón. H & E, (x 250).

TABLA 1.– Efecto de agentes moduladores sobre la proliferación celular. Se observan los promedios en CPM de los ensayos correspondientes a los ensayos de proliferación con sus respectivos intervalos de confianza calculados con un $\alpha = 0.05$

Tratamiento	LBL	LBLc	LBLa
Control	173 344.6 (19 334.6 ± 153 344.6)	185 121 (20 401 ± 183 241)	124 179.5 (125 091 ± 123 268)
CsA	12 668.5 (1 929 ± 12 408)	7 092.5 (8 444 ± 5 741)	3 386 (4 151 ± 2 621)
ConA	202 707 (206 020 ± 199 394)	190 230 (193 646 ± 186 814)	145 620 (148 350 ± 142 890)
PMA	285 360 (288 407 ± 282 313)	195 509 (196 676 ± 194 342)	359 414 (363 032 ± 355 796)

TABLA 2.– Inducción de apoptosis por CsA. Las células LBL, LBLc y LBLa fueron cultivadas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de CsA y luego teñidas con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio. Se contaron 200 células de cada tratamiento discriminando entre apoptóticas y viables y se calcularon los porcentajes mostrados. Este ensayo es representativo de 3 experimentos similares

Tratamientos	Porcentaje de células viables			Porcentaje de células apoptóticas		
	LBL	LBLc	LBLa	LBL	LBLc	LBLa
Control	88	92	81	12	8	19
CsA (1 µg/ml)	11	14	25	89	86	75
CsA (0.5 µg/ml)	18	58	55	82	42	45
CsA (0.1 µg/ml)	41	84	87	59	16	13

fue infiltrado por linfocitos tumorales, la médula ósea mostró infiltración de células leucémicas en la región intertrabecular (esternón) y el hígado presentó infiltración en el espacio porta. El tumor LB además invadió pulmón pudiendo observarse infiltración de la pared bronquial. Se observó que los ratones inoculados con la línea celular no mostraron compromiso respiratorio mientras que los portadores del tumor parental presentaron hiperventilación.

Influencia de agentes moduladores del crecimiento en la proliferación

Cuando se evaluó la respuesta proliferativa frente a diferentes agentes que modulan el crecimiento celular se observó que la CsA inhibió significativamente (> 90%, con un intervalo de confianza del 95%) la proliferación en más de un 90% tanto en la línea celular como en las sublíneas obtenidas a partir de ella. Como se observa en la Tabla 1, ConA y PMA estimularon la proliferación de LBL y LBLa mientras que no produjeron efecto en la sublínea LBLc.

Inducción de apoptosis por CsA

Para evaluar la capacidad de la CsA para inducir apoptosis en las células LBL, LBLc y LBLa se cultivaron

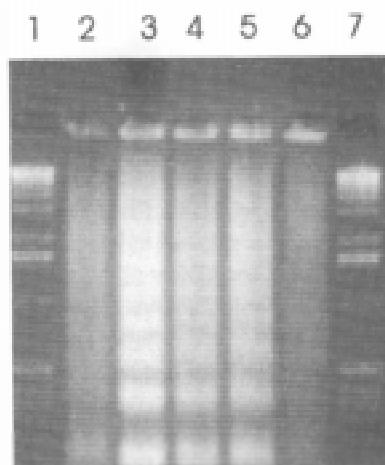


Fig. 3.– Fragmentación internucleosomal del ADN en las células LBL. En la calle 2) ADN de las células que no recibieron ningún tratamiento, 3) ADN de células tratadas con 1 µg/ml de CsA, 4) Idem 3) con 0.5 µg/ml, 5) Idem 3) con 0.1 µg/ml, 6) ADN de las células tratadas con una dilución de etanol equivalente al utilizado para diluir la CsA. 1) y 7) patrón de peso molecular 1 kB DNA-Ladder (Promega, MA, USA), Puede observarse la inducción de apoptosis por la presencia del ADN fragmentado en múltiplos de 200 pb en las calles 3-5. Para las células LBLc y LBLa los resultados fueron similares.

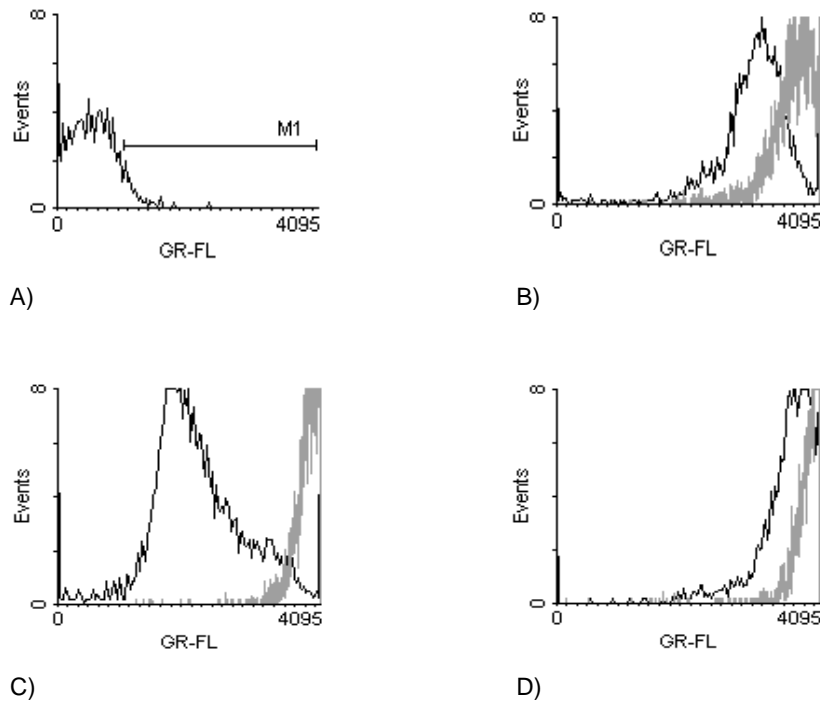


Fig. 4.- Expresión de CD44 en la superficie celular. Citometría de flujo realizada utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce el dominio extracelular constante de CD44. En los histogramas la línea oscura representa los eventos obtenidos con las células no estimuladas y la línea clara los eventos obtenidos con las células pre-tratadas con PMA. A) Control de isotipo (su valor fue similar para todas las células, se muestra un histograma representativo), B) LBL, C) LBLc y D) LBLa.

dichas células en presencia de diferentes concentraciones de este agente. Como puede observarse en la Tabla 2, la CsA (1 $\mu\text{g/ml}$) indujo apoptosis en todas las células analizadas, mientras que en presencia de 0.5 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ las sublíneas LBLc y LBLa fueron más resistentes que la línea original LBL. En la Fig. 3 se observa que todas las diluciones de CsA indujeron la fragmentación internucleosomal del ADN y no se observaron diferencias entre las diferentes células analizadas.

Expresión de CD44 y unión a ácido hialurónico (AH)

Teniendo en cuenta que las células del tumor original expresan la molécula CD44 se procedió a determinar su expresión en la línea celular así como en las dos subpoblaciones obtenidas a partir de ésta. Por citometría de flujo (FACS) se pudo comprobar que las células LBL y LBLa mostraron una alta intensidad de fluorescencia y prácticamente no aumentaron su expresión por estimulación con PMA. En las células LBLc se observó una baja expresión de CD44 que se incrementó cuando se las estimuló con PMA (Fig. 4).

En la Fig. 5 se observa que tanto las células LBL como las LBLc no unieron AH ni aun después de haber sido

estimuladas con PMA. Las células LB no se unieron en su estado natural pero sí después de ser estimuladas con PMA, en cambio las células LBLa unieron el ligando en forma constitutiva. En este último caso se demostró que la unión del AH a las células fue a través de CD44 ya que la unión del AH pudo ser desplazada con el anticuerpo anti-CD44 IM7 que reconoce un epítipo de unión a AH, mientras que el anti-CD44 KM114 no desplazó esta unión.

Discusión

Se sabe que los tumores están constituidos por un conjunto heterogéneo de células que pueden diferir en su morfología, crecimiento y respuesta frente a mitógenos o drogas con acción quimioterapéutica. Se ha comprobado que cuando se establece una línea celular pueden ocurrir cambios fenotípicos o de ciertas propiedades relacionadas con su potencial tumorigénico, su capacidad invasiva y metastásica o su sensibilidad frente a diferentes drogas. Esto puede ser consecuencia de una selección natural de determinados clones o estar relacionado con las condiciones de cultivo.

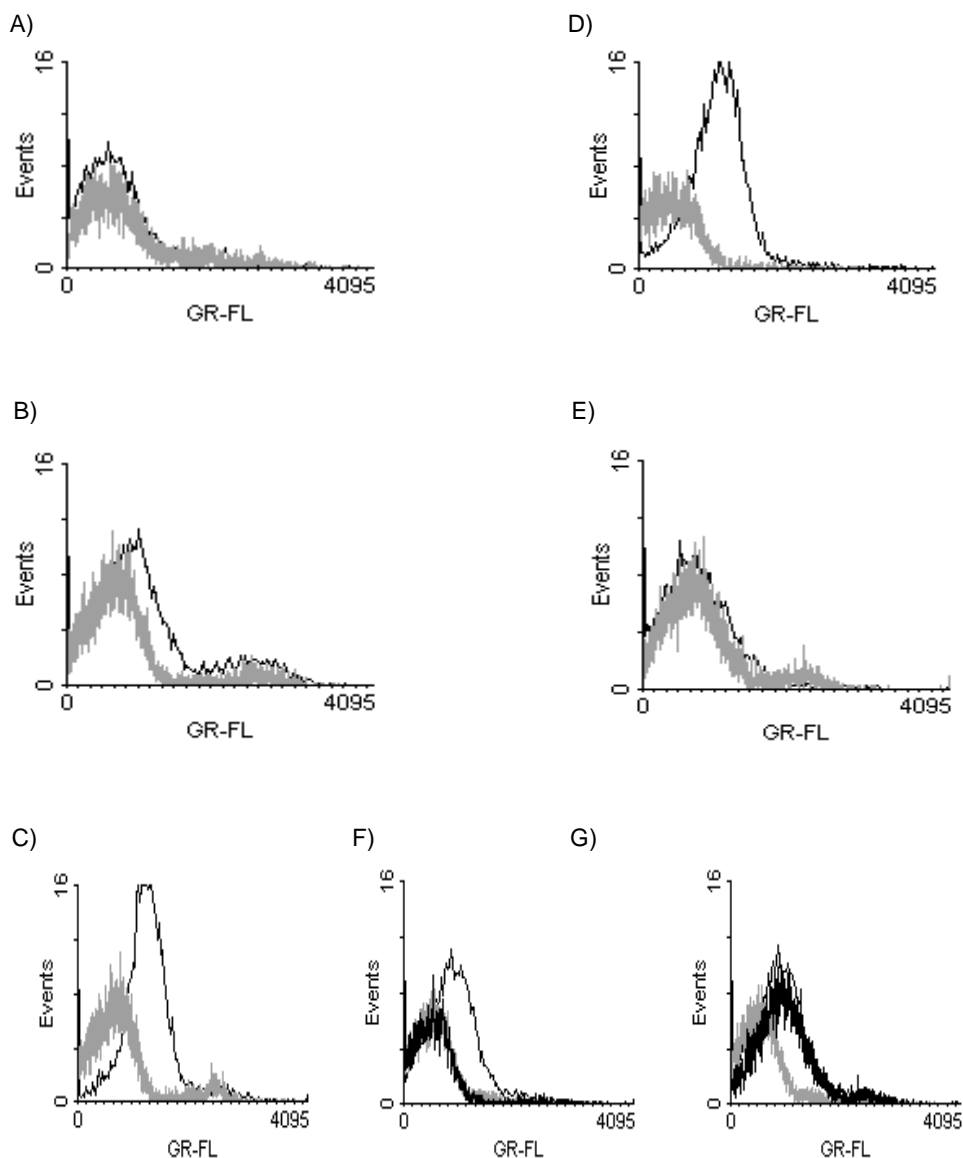


Fig. 5.— Unión de AH a la superficie celular. En los histogramas A-E la línea oscura representa la unión de AH y la línea clara representa el desplazamiento de la unión de AH-FITC por HA frío. A) LB, B) representa LBL y LBLc que mostraron perfiles similares, C) LBLa, D) LB + PMA, E) LBL, LBLc + PMA. En las figuras F-G la línea oscura fina representa la unión de AH, la línea oscura gruesa representa el desplazamiento de la unión específica de AH por anticuerpos anti-CD44 y la línea clara representa el desplazamiento por HA frío. F) LBLa + PMA donde se muestra el desplazamiento con anti-CD44 IM-7 y G) ídem F utilizando un anti-CCD44 KM114. Como puede observarse el anticuerpo KM114 no desplazó la unión.

En este trabajo procedimos al establecimiento y caracterización de una línea celular (LBL) obtenida en nuestro laboratorio, a partir de la cual se obtuvieron dos sublíneas con diferentes características de crecimiento en cultivo. Estas diferencias observadas no se deberían a alteraciones cromosómicas ya que ambas presentan un cariotipo similar (trabajo en redacción). Las líneas obtenidas ofrecen la posibilidad de contar con un mode-

lo de estudio de células tumorales en un medio definido y experimentalmente manejable.

Mediante estudios histopatológicos se encontró que el tumor original (LB) infiltró órganos que no habían sido descritos previamente¹³ como médula ósea, pulmón y timo. Se sospechaba de la infiltración en timo previo al análisis histopatológico, ya que timocitos provenientes de ratones portadores del tumor inoculados ip en rato-

nes singeneicos desarrollaron ascitis, mientras que timocitos provenientes de ratones normales no produjeron este efecto.

La línea LBL está constituida por dos subpoblaciones que se pudieron separar en dos sublíneas las cuales mostraron ritmos de crecimiento diferente *in vitro*. Además resultados preliminares indicaron que las células LBLc inoculadas en animales presentaron una velocidad de crecimiento menor que las células LBLa.

Una manera de caracterizar líneas celulares es a través de la respuesta proliferativa frente a diversos agentes que modulan el crecimiento celular. Las células de la línea LBL y de la sublínea LBLa mostraron una respuesta estimuladora significativa a PMA pero respondieron pobremente en presencia de Con A. Esto podría indicar que estas células presentan un crecimiento *in vitro* tan activo que las hace insensibles a la activación con ConA. Se analizó el efecto de la CsA sobre las células en estudio ya que fue descrito previamente que ésta inhibe la expresión del receptor de IL-2 y además induce apoptosis en las células LB¹⁸. A altas concentraciones de este agente no hubo diferencias en el comportamiento de la línea LBL y las sublíneas, pero sí a bajas concentraciones. Dado que los pasajes utilizados en estos ensayos corresponden a 50 repiques después de la separación entre la línea LBL y las sublíneas, y que en estos sucesivos pasajes cada sublínea ha evolucionado en forma independiente, podrían haber adquirido características propias que las diferencian de la línea madre.

Las moléculas de adhesión que participan en procesos fisiológicos normales, permiten la adhesión célula-célula o célula-ligando. Las células tumorales podrían utilizar estos procesos fisiológicos para desprenderse de su sitio de origen, migrar y colonizar diferentes tejidos generando metástasis^{20, 21}. Estudios *in vitro* avalan la participación de la molécula CD44 en la migración celular aunque actualmente se conoce que las quimocinas son las responsables de este proceso^{22, 23}. Recientemente demostramos que el tumor LB presenta una desregulación en la expresión de CD44 y que la expresión de determinadas isoformas permite sospechar infiltración del tumor en los órganos donde se produce metástasis (trabajo en redacción).

Estudios en líneas murinas y en células normales hematopoyéticas han demostrado que la expresión de CD44 en la superficie celular no garantiza la capacidad de unir AH, y que células que presentan baja expresión de esta molécula pueden ser competitivas para la unión a AH. Se ha demostrado que es posible inducir la unión a AH en células que normalmente no lo hacen mediante la utilización de anticuerpos o de ésteres de forbol. Utilizando anticuerpos monoclonales es posible inducir rápidamente esta unión (minutos o segundos) lo que podría estar asociado a un cambio conformacional de CD44 o con un *clustering* de esta molécula en la superficie celu-

lar. El tratamiento con ésteres de forbol involucra una sucesión de eventos celulares acompañados de una diferenciación celular y *up-regulation* de CD44 y probablemente también involucra la síntesis de novo de isoformas de CD44 capaces de unir AH²⁴. La interacción de CD44-AH está regulada y es dependiente del tipo de célula que expresa el receptor así como de su estado de activación⁹. En función de esta interacción se han descrito tres fenotipos diferentes: una forma inactiva que no une AH ni aun luego de la activación, una forma inducible como consecuencia de la activación y una forma activa que posee la capacidad de unión a HA en forma constitutiva⁷. Los resultados presentados en este trabajo revelan que las células LBLa expresan en forma constitutiva altos niveles de CD44 y que este receptor sería capaz de unir AH. Las células LBL (CD44^{hi}) y LBLc (CD44^{lo}) no unen AH ni aun luego de ser estimuladas con ésteres de forbol, por lo que sugerimos que estarían en un estado inactivo no inducible. Por el contrario las células del tumor LB expresan altos niveles de CD44 en su superficie y unen AH luego de ser tratadas con PMA, por lo que presentarían un estado inducible. Este resultado ha sido descrito²⁵ y es corroborado en este trabajo.

Teniendo en cuenta que las sublíneas LBLc y LBLa mostraron diferencias en la expresión de CD44, en la unión de AH y en la velocidad de crecimiento *in vitro* e *in vivo*, sugerimos que la mayor expresión de CD44 así como la capacidad de unión a AH en las células LBLa, podría estar asociada a la migración celular y anclaje selectivo, determinando así una mayor agresividad *in vivo*.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado con subsidios otorgados por la Universidad de Buenos Aires y el CONICET (Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica). Se agradece la colaboración de la bioterista Karina Arias.

Bibliografía

1. Picker JL, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 561-7.
2. Stauder R, Gunthert U. CD44 isoforms. Impact on lymphocyte activation and differentiation. *The Immunologist* 1995; 3: 78-83.
3. Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology* 1998; 93: 139-48.
4. Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* 1996; 132: 1199-228.
5. Ponta H, Sleeman J, Dall P, MOll J, Sherman L, Herrlich P. CD44 isoform in metastatic cancer. *Invasion metastasis* 1994; 14: 82-6.
6. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
7. Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in

- glycosylation. *J Exp Med* 1995; 182: 431-7.
8. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill B, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-10.
 9. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335.
 10. Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behaviour. *Cancer Res* 1995; 55: 428-33.
 11. van Muijen GN, Danen EH, Veerkamp JH, Ruher DJ, Lesley J, van den Heuvel LP. Glycoconjugate profile and CD44 expression on human melanoma cell lines with different metastatic capacity. *Int J Cancer* 1995; 61: 241-8.
 12. Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 1994; 180: 53-66.
 13. Ruggiero R, Bustuoabad O, Bonfil D, Mesiss R, Pasqualini CD. Concomitant immunity in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br J Cancer* 1984; 51: 1-10.
 14. Lugasi H, Hajos S, Murphy JR, et al. Murine spontaneous T-cell leukaemia constitutively expressing IL-2R. A model for human T cell malignancies expressing IL-2R. *Int J Cancer* 1990; 45: 163-7.
 15. Zahalka MA, Okon E, Gosslar U, Holzmann B, Naor D. Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44- and hyaluronate-dependent. *J Immunol* 1995; 154: 5345-55.
 16. Vogt Sionov R, Naor D. Hyaluronan-independent lodgment of CD44+ lymphoma cells in lymphoid organs. *Int J Cancer* 1997; 71: 462-9.
 17. Cupis de A, Pirani P, Fazzuoli L, Favoni RE. Responsivess to hormone, growth factor and drug treatment of a human breast cancer cell line: comparison between early and late cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 1998; 34: 836-43.
 18. Waldner C, Mongini C, Alvarez E, Roig I, Hajos SE. Inhibitory activity of soluble IL-2R in sera, ascites and culture supernatants from murine leukemics cells. *Scand J Immunol* 1994; 40: 308-16.
 19. Sgonc R, Wick G. Methods for detection of Apoptosis. *Int Arch Allergy* 1994; 105: 327-32.
 20. Weinber RA. The integration of molecular genetics into cancer management. *Cancer* 1991; 70: 1653-8.
 21. Gunthert U, Hoffman M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-9.
 22. Thomas L, Byers R, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on Hialuronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992; 118: 971-80.
 23. Malek T, Porter BO, Wen HE Y. Mutiples δ c-dependent cytokines regulate T-cell development. *Immunology Today* 1999; 20: 72-8.
 24. Borland G, Ross JA, Guy K. Formas and functions of CD44. *Immunology* 1998; 93: 139-48.
 25. Sionov RV, Naor D. Hyaluronan-independent lodgment of CD44+ Lymphoid organs. *Int J Cancer* 1997; 462-9.

Cita leída en el Museo de Ciencias de Londres (*Science Museum, Exhibition Road, London SW7 2DD*)

Emetics and Purges

An emetic is a drug, which causes vomiting; a purge is one which evacuates the bowels.

Both were freely prescribed in the 18th Century, when physicians favoured the more violent forms of therapy. Purgatives recommended were often salts of antimony or mercury, which in themselves are toxic. A strong advocate of such therapy was John Lettsom (1744-1813) who inaugurated a system of dispensaries in London which poorer patients attended. a contemporary verse, which describes the treatment he administered, reads:

When any sick to me apply

I physicks, bleeds and sweats' em

If after that they choose to die,

What's that to me, I Lettsom.

Eméticos y Purgas

Un emético es una droga que causa vómitos; una purga es aquella que provoca evacuación intestinal. Ambas eran de prescripción libre en el siglo XVIII, cuando los médicos privilegiaban las formas más violentas de terapia. Los purgantes recomendados eran a menudo sales de antimonio o mercurio, que de por sí son tóxicos. John Lettsom (1744-1813) fue un fuerte partidario de tales terapias, y quien inauguró en Londres un sistema de dispensarios, donde se asistía a los más pobres. Unos versos de la época, que describen el tratamiento que él administraba, dicen (con un juego de palabras, en inglés):

Cuando enfermos a mí vienen

Los purgo, sangro y hago sudar

Si después de esto deciden morir

Que es esto para mí, Yo Lettsom (~ los deajo).