

## ROL DEL TEJIDO CONECTIVO EN LA RELACION TUMOR-HUESPED

OSCAR D. BUSTUOABAD\*, PEDRO D. di GIANNI\*\*, JORGE A. GENOVESE, RICARDO FALCO,  
 MARCELA FRANCO\*\*, RAUL A. RUGGIERO\*

*División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

**Resumen** El mesodermo es la hoja germinativa involucrada en la regulación de los fenómenos de diferenciación y organización temporo-espacial del embrión. El tejido conectivo expresa alguna de estas funciones durante los fenómenos de reparación y regeneración de tejidos u órganos. El desarrollo normal de estos procesos depende de la interrelación epitelio-mesénquima y de la formación de una cantidad adecuada de estroma y de un tipo de colágeno o proteoglicano. Nuestra hipótesis sugiere que el cáncer sería un proceso regenerativo que fracasa como consecuencia de la alteración del tejido conectivo. El objetivo del presente trabajo ha sido conocer si el tejido conjuntivo y la sustancia fundamental amorfa (SFA) son capaces de regular la proliferación y muerte de células normales y tumorales, y de ser así, de discriminar entre los factores que puedan interferir. Los resultados de los experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* revelaron que: 1) la SFA ejerce un efecto citotóxico directo y selectivo sobre las células tumorales; 2) la SFA reduce la capacidad proliferativa de células normales y tumorales; 3) el efecto citotóxico y antiproliferativo de la SFA no depende de la respuesta inmune celular o humoral, pero sí de la integridad química de sus componentes, ya que su desnaturalización reduce su capacidad antitumoral; 4) las células tumorales modulan las funciones reguladoras de la SFA mediante enzimas endocelulares liberadas al producirse la muerte celular inducida por la acción citotóxica de la misma SFA. Estos resultados sugieren que las células tumorales que permanecen viables pueden proliferar activamente dado que sobre ellas no se ejerce más el efecto inhibitorio de la SFA, al mismo tiempo que son estimuladas por las enzimas. En consecuencia existiría una función reguladora del tejido conectivo sobre la proliferación y viabilidad de células tumorales, actividad que parece residir en la constitución molecular de la SFA del tejido conectivo.

Durante el desarrollo embrionario, el mesodermo es uno de los principales componentes implicados en los fenómenos de determinación y organización témporo-espacial de las diferentes partes del embrión<sup>1-3</sup>. En vertebrados superiores se observó que, aún en una fase avanzada del

ciclo ontogenético, estos procesos morfogenéticos vuelven a manifestarse a continuación de la destrucción parcial de tejidos o de la extirpación de órganos o miembros. En efecto, en los procesos de reparación-regeneración se verifican fenómenos de migración, proliferación, diferenciación, desdiferenciación y muerte celular que son regulados por la interacción entre el epitelio y el mesénquima<sup>4-7</sup>. Para su desarrollo normal, este fenómeno requiere no sólo la formación de una adecuada cantidad de estroma sino también la participación de un tipo determinado de colágeno<sup>8</sup>. En base a que en su conjunto las trans-

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

\*\* Becario del CONICET

Dirección postal: Dr. Oscar D. Bustuobad, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, P. Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

formaciones que ocurren en los fenómenos reparativos-regenerativos se asemejan a los del desarrollo tumoral, numerosos autores sugieren que el cáncer podría ser considerado como resultado de una falla en la interacción epitelio-mesénquima<sup>9, 10</sup>. Para otros sería un equivalente de un intento abortivo de regeneración como respuesta inadecuada a una injuria por falla de los mecanismos homeostáticos<sup>11, 12</sup>.

Nuestra hipótesis sugiere que siendo la formación de la sustancia colágena y su adecuada función indispensables para que los fenómenos de reparación-regeneración se completen normalmente, es probable que en el cáncer ambos parámetros puedan encontrarse alterados.

El objetivo del presente trabajo ha sido conocer si algunas de las propiedades y funciones del mesodermo embrionario se expresan en el tejido conjuntivo del animal adulto, y cuáles son los factores que en el cáncer lo alterarían impidiendo que pueda ejercer sus funciones reguladoras. Con tal propósito hemos estudiado *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* la capacidad de la sustancia fundamental amorfa (SFA) del tejido conjuntivo de modular la proliferación, diferenciación y muerte de células normales y tumorales.

### **Acción del tejido conectivo sobre células tumorales *in vivo***

Se inocularon 10<sup>6</sup> células LB (linfoma T, no inmunogénico y de origen espontáneo en BALB/c, obtenido de fluido ascítico con 100% de viabilidad) en el tejido conectivo de la dermis del flanco de ratones singéicos. El sitio del inóculo era removido a diferentes tiempos y se extendía entre porta y cubreobjeto, previa tinción con azul trypan para determinar la viabilidad de las células LB. A las 6 horas, el examen microscópico del preparado fresco permitía observar células LB refringentes (viables) y un número menor de células LB que incorporaban el colorante (muertas). Muestras procesadas en forma similar a las 12 horas revelaban un incremento significativo del número de células LB muertas, que a las 24 horas llegaba casi al 60%. Este resultado *in vivo* contrastaba con el obtenido al mantener las células LB *in vitro* en medio de cultivo, en donde la muerte de estas células llegaba sólo al 21%. Cabe señalar que 12 horas después del inóculo, en pre-

parados teñidos con azul de toluidina y rojo neutro, en un área subyacente al inóculo tumoral se podía observar un escaso infiltrado constituido por neutrófilos y células mononucleares. A las 24 horas y en la periferia del tumor predominaban macrófagos y fibroblastos.

### **Acción del tejido conectivo sobre células tumorales *ex vivo***

Ratones BALB/c fueron inoculados por vía intradérmica en el flanco derecho con 10<sup>6</sup> LB, 100% viables, en 1 ml de RPMI. Inmediatamente después los animales eran sacrificados y se les practicaba una incisión medioventral con el propósito de exponer la dermis profunda. Los habones dérmicos, que contenían las células LB, eran explantados y se mantenían en tubos de Kahn a 37° C. Después de 6, 12 o 24 horas se disgregaban y coloreaban con azul trypan para evaluar la vitalidad de las células LB. Se comprobó que el número de células LB vivas se reducía en forma similar a lo descrito en el experimento *in vivo*, es decir que las células muertas alcanzaban un 60% a las 24 horas.

### **Acción de la sustancia fundamental amorfa (SFA) sobre la viabilidad de las células tumorales LB *in vitro***

A ratones BALB/c, sacrificados con éter, se les practicaba una incisión en la piel de cada flanco para exponer la dermis. Bajo lupa estereoscópica se inoculaba en ella 1 ml de medio RPMI; debido a la hidrofilia de la SFA se obtuvo un nódulo de tejido conectivo de casi 1 cm<sup>3</sup>. Por su consistencia gelatinosa se podía aislar y filtrar con facilidad a través de una malla metálica para luego separar por centrifugación (1000 rpm/3min) las fibras y las células residentes del resto de los componentes del tejido conectivo. De este modo, quedaban en el sobrenadante las moléculas que constituyen la SFA<sup>13</sup>. Para realizar los experimentos se utilizaron distintos tipos de células, que eran mantenidas en SFA o RPMI a una concentración de 10<sup>7</sup>/ml. Las células LB provenían de líquido ascítico con 100% de viabilidad, los linfocitos se aislaban a partir del bazo, los macrófagos se obtenían por lavado del peritoneo de ratones BALB/c con RPMI a 4° C y los fibro-

Acción de la sustancia fundamental amorfa (SFA) sobre la viabilidad de distintos tipos celulares

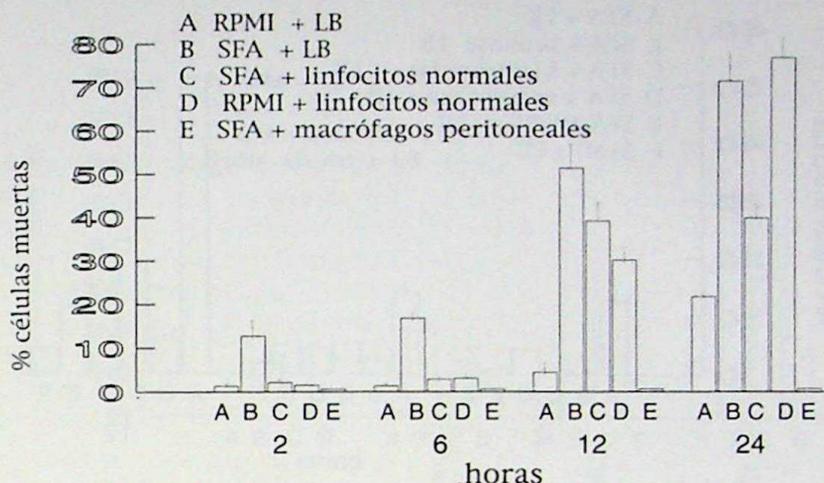


Figura 1.

blastos embrionarios eran de cultivo primario de 14 días. Se formaron 5 grupos experimentales (Fig. 1).

Los datos indican que las células LB en los Grupos A y B mueren en forma progresiva, pero la pérdida de la viabilidad ocurre con un ritmo significativamente mayor en las LB cultivadas en SFA. En efecto, a las 2 horas la muerte celular en el Grupo B es del 12,7% y se incrementa rápidamente a partir de la 6ta hora, siendo del 51,3% y 71,5% a las 12 y 24 horas, respectivamente. En cambio, en el Grupo control (A) la muerte de las células LB es significativamente menor siendo del 1,3%, 4,4% y 21% a las 2, 12 y 24 horas, respectivamente. Hasta las 12 horas de cultivo el porcentaje de viabilidad de los linfocitos en SFA y en RPMI es similar; en cambio a las 24 horas en el Grupo C el número de linfocitos no viables alcanza el 39,8% versus el 76,2% en el Grupo D. El porcentaje de macrófagos y fibro-blastos muertos en SFA (Grupo E) oscila entre el 0,1% y el 1% al fin del experimento.

Acción de la SFA sobre la proliferación de las células LB *in vitro*

Para su estudio se empleó el ensayo de incorporación de timidina tritiada en células LB mantenidas en cultivo con SFA durante 24 horas. Se sembraron 10<sup>5</sup> células LB por cavidad de placa en

TABLA 1.- Efecto de la sustancia fundamental amorfa (SFA) sobre la proliferación de células tumorales LB *in vitro*

Dilución SFA	% Inhibición de la proliferación respecto del control en RPMI
puro	49,7 ± 7,3*
al 1/2	25,5 ± 8,1**

\* p < 0,01, \*\* p < 0,05 test \*t\* Student  
 Los datos se expresan como  $\bar{X} \pm SD$ , promedio de 4 experimentos

0,1 ml de RPMI y luego se agregaba SFA pura o diluida al medio. Se realizaron 4 experimentos con cada dilución por quintuplicado. Respecto del control, en RPMI los datos indican una significativa inhibición de la incorporación del radionucleótido en las células LB mantenidas en SFA pura y al medio (Tabla 1).

Efecto de la desnaturalización física y enzimática de la SFA sobre su acción citotóxica *in vitro*

La SFA fue sometida a la acción de un agente físico (calor a 100°C) y a la de distintas enzimas (pronasa, hialuronidasa, colagenasa) en concentraciones que despolimerizan a la sustancia

Desnaturalización de la sustancia fundamental amorfa (SFA)  
Inhibición de su efecto citotóxico sobre células tumorales LB

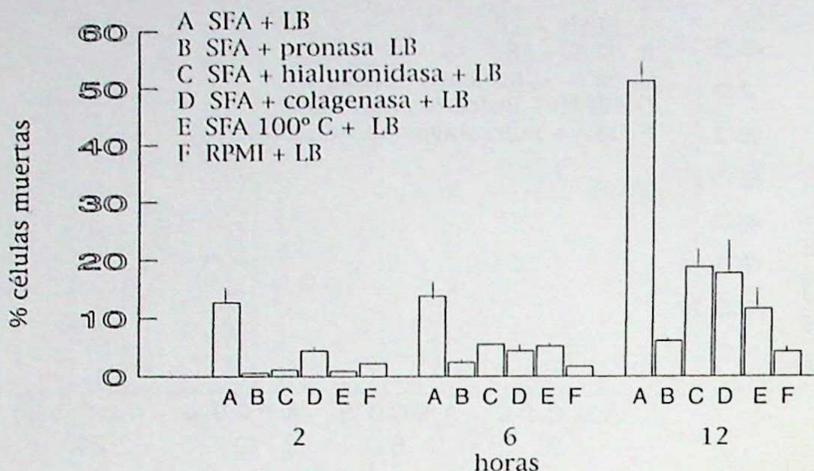


Figura 2.

Efecto citotóxico de la sustancia fundamental amorfa (SFA) sobre  
diferentes concentraciones de células tumorales LB

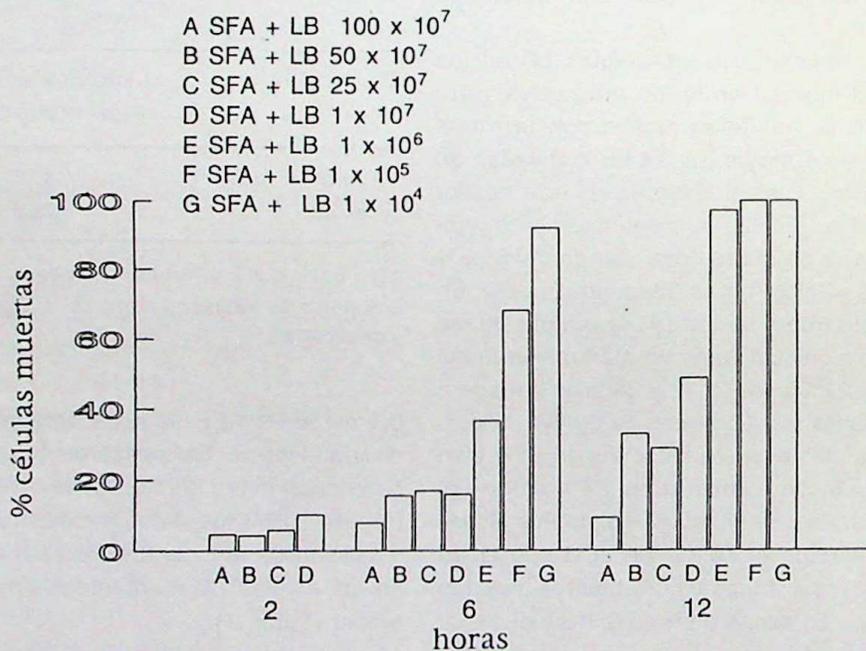


Figura 3.

---

*Fe de errata*

En los 2000 números de la primera tirada se deslizaron dos errores no advertidos:

1. Faltó el último autor; Raúl A. Ruggiero.
2. En lugar de Figura 2, que no salió, se repitieron los datos de la Tabla 1 y las Figuras 3 y 4 fueron invertidas.

Efecto del sobrenadante de células tumorales LB en muerte progresiva (Sbr LB mp) sobre la acción citotóxica de la sustancia fundamental amorfa (SFA)

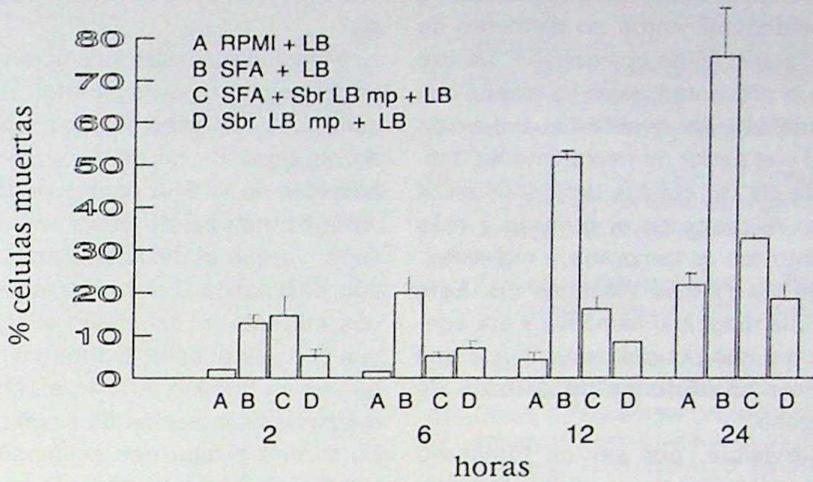


Figura 4.

colágena pero que no afectan a las células LB. Con la SFA así pretratada se formaron distintos grupos experimentales, cada uno de los cuales recibía  $10^7$ /ml células LB (Fig. 2).

A las 2 horas de cultivo, en SFA no tratada, el número de células LB muertas alcanzaba al 12,7% contra 0,5%, 1,1% y 4,4% en las mantenidas en SFA pretratada con pronasa, hialuronidasa y colagenasa, respectivamente. Después de 12 horas en SFA normal, el porcentaje de LB muertas era de 51,3% contra 6,1%, 18,8% y 17,7% de las cultivadas en SFA tratadas con las mismas enzimas. Valores similares fueron obtenidos al desnaturalizar la SFA con calor.

#### Efecto de la concentración de células tumorales sobre la actividad citotóxica de la SFA *in vitro*

Se emplearon 7 grupos experimentales en donde a 1 ml de SFA se le agregaba un diferente número de células LB hasta obtener concentraciones que variaban entre  $100 \times 10^7$  y  $1 \times 10^4$  (Fig. 3). Los resultados de 12 horas de cultivo en las concentraciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  muestran que el número de LB muertas oscilaba entre el 97,2% y el 100%, mientras que en la concentración  $10^9$  era de 9,2%. En los diferentes períodos estudiados,

siempre se verificó un número significativamente mayor de células muertas en los grupos con menor concentración de células LB.

#### Efecto de factores producidos por las células tumorales LB en muerte progresiva sobre la actividad citotóxica de la SFA *in vitro*

La muerte progresiva de las células LB se lograba cultivando  $4 \times 10^7$  cel/ml durante 6-8 horas en RPMI a 45°C. El sobrenadante se obtenía centrifugando el cultivo a 1500 rpm por 10 min a 4° C, y era utilizado para tratar a la SFA durante 1 hora antes de agregar  $10^7$  células LB viables. Los resultados mostrados en la Fig. 4 indican que el sobrenadante de LB en muerte progresiva (Grupo C), reduce significativamente la actividad citotóxica de la SFA sobre las células LB.

#### Discusión

Se conoce que el tejido conectivo desempeña un rol fundamental en el mantenimiento del equilibrio homeostático del organismo, siendo el sitio en el que se producen las respuestas del huésped frente a noxas endógenas o exógenas. Es-

tas últimas, provocan una inflamación en la cual participan tanto el colágeno como los fluidos y células de todo el organismo<sup>14, 15</sup>. Desde este punto de vista, las células tumorales implantadas podrían ser consideradas como un elemento de injuria exógena para el tejido conjuntivo<sup>16</sup>. Dentro de este contexto el presente trabajo se diseñó con el objetivo de analizar los eventos que ocurren entre el huésped y el tumor, inmediatamente después del implante de las células tumorales en el tejido conectivo. Al respecto el primero y más conspicuo hallazgo fue la temprana y significativa mortalidad de las células blásticas LB. Este fenómeno tenía una magnitud llamativa y era además inesperado, ya que ocurría en un tejido que aporta las mejores condiciones de difusión de nutrientes y oxígeno.

Como era previsible, por ser un tumor no inmunogénico en un huésped singénetico, la muerte de las células LB ocurría en ausencia de respuesta celular inflamatoria. A pesar de ello y con el propósito de deslindar el posible rol de una respuesta sérica inmediata, se realizaron experimentos *ex vivo* comprobándose que el número de LB vivas se reducía con un ritmo similar a lo observado *in vivo*. Ninguno de estos experimentos descartaba la participación de las células que normalmente residen en el tejido conjuntivo como responsables del efecto citotóxico. Fue para contestar a este interrogante que se aisló la SFA para evaluar *in vitro* su acción deletérea y antiproliferativa sobre LB. En estas condiciones, la SFA del tejido conectivo demostró tener similar capacidad citotóxica a la del tejido conjuntivo, que fue analizada en los experimentos *in vivo* y *ex vivo*. El efecto citotóxico de la SFA parece tener cierta especificidad sobre las LB, dado que los macrófagos y fibroblastos mantenidos en esta sustancia no revelan porcentajes de muerte celular diferentes a los controles mantenidos en RPMI, en tanto que los linfocitos en SFA tienen una mayor sobrevivencia que los controles en RPMI. Este resultado no es sorprendente, dado que son células que normalmente residen en el tejido conectivo y por tanto encontrarían en la SFA las mejores condiciones de cultivo. Si bien en su conjunto los datos sugieren un efecto específico de la SFA sobre los blastos LB, no permiten extraer conclusiones acerca del o de los mecanismos responsables de la acción citotóxica. Al respecto, numerosos trabajos describen la interacción epi-

telio-mesénquima como fenómeno fundamental en el mantenimiento y regulación de la proliferación y diferenciación celular<sup>17-22</sup> y a la alteración de la misma como predisponente de la carcinogénesis<sup>9</sup>.

Estudios recientes involucran a los glucosaminoglicanos y proteoglicanos de la SFA como moléculas con capacidad de regular la expresión de oncogenes y la diferenciación celular<sup>23-25</sup>. La actividad de la SFA parece depender de la particular estructura de sus componentes moleculares, ya que al desnaturalizarla mediante digestión enzimática o por calentamiento resultó menos eficiente en su efecto citotóxico. En consecuencia, es aceptable presumir que las células tumorales puedan regular la actividad de la SFA mediante la liberación de enzimas endocelulares. La muerte celular que acompaña al crecimiento tumoral, y que en nuestro modelo es inducida por el tejido conectivo, al favorecer la salida de enzimas afectaría al tejido conectivo y en consecuencia al mecanismo de regulación negativa que éste ejerce sobre las células LB. Esta presunción fue confirmada por el aumento de la viabilidad que muestran las LB cuando son cultivadas en SFA pretratada con sobrenadante de LB en muerte progresiva. Por otra parte, demostramos la existencia de una correlación inversa entre la concentración de LB en SFA y su muerte. Esto puede interpretarse como que la viabilidad de las células LB responde a un fenómeno de dosis-dependencia en función de factores, que liberados por las células tumorales, afectan la SFA o bien son propios de la SFA que afecta a las LB. En el primer caso se postula la necesidad de inocular un número mínimo de células de modo que al morir, por efecto de la SFA, puedan liberar enzimas en cantidad suficiente como para desnaturalizar el colágeno y posibilitar el crecimiento de las células remanentes. En el segundo caso, el tumor se desarrollaría toda vez que una alta concentración de células lograra superar el control de los factores inhibitorios propios de la SFA.

En conclusión, el conjunto de los resultados sugiere un rol regulador de la SFA del tejido conjuntivo sobre la proliferación y viabilidad de un implante de células tumorales, actividad que parece residir en la constitución molecular de la SFA. Estas evidencias nos remiten a la actividad reguladora temprana que el mesénquima cumple en el desarrollo embrionario.

**Summary**

*Role of the connective tissue in the tumor-host relationship*

In the embryo, both differentiation and temporospatial organization are regulated by the mesoderm. Some of these functions are expressed by the connective tissue during wound or organ repair and regeneration. The normal development of the latter depends on the epithelium-mesenchyme interrelationship and the formation of an adequate amount of stroma and a certain type of collagen or proteoglycans. Our hypothesis proposes that cancer is a regenerative process which has failed as a consequence of alterations in the connective tissue. The object of this paper was to investigate whether the connective tissue and the amorphous fundamental substance (SFA) are capable of regulating the proliferation and death of normal and tumor cells and to dilucidate the mechanisms involved. The results obtained in *in vivo*, *ex-vivo* and *in vitro* experiments indicate the following: 1) SFA exerts a direct and selective cytotoxic effect on tumor cells; 2) SFA reduces the proliferative capacity of normal and tumor cells; 3) both the cytotoxic and antiproliferative effects of SFA are independent of cellular and humoral immune responses but are dependent on the chemical integrity of its components since its denaturalization reduces its antitumoral activity; 4) the tumor cells modulate the regulatory effects of SFA through endocellular enzymes liberated by cell death induced by the cytotoxic action of SFA itself. These results suggest that in the absence of the inhibitory effect of SFA, the tumor cells which remain viable can now proliferate actively due to enzyme stimulation. In conclusion, the regulatory function of the connective tissue on the proliferation and viability of tumor cells would depend on the molecular constitution of SFA.

**Bibliografía**

1. Spemann H. Die Entwicklung seitlicher und dorso-ventraler Keimhälften bei verzögerter Kernversorgung. *Z Wiss Zool* 1928; 132: 105-34.
2. Spemann H. Embryonic development and induction. New Haven: Yale University Press, 1938.
3. Machemer H. Differenzierungsfähigkeit der uriniereanlage von Triton alpestris. *Roux Arch* 1929; 118: 200-51.
4. Bandier J. Histologische Untersuchungen über die Regeneration von Landplanarien. *Roux Arch* 1937;

- 135: 316-48.
5. Butler EG. Studies on limb regeneration in x-rayed Amblystoma larvae. *Anat Rec* 1935; 62: 295-307.
6. Litwiller R. Mitotic index and size in regenerating amphibian limbs. *J Exp Zool* 1939; 82: 273-86.
7. Rose SM. A method of inducing limb regeneration in adult Anura. *Proc Soc Exp Biol* 1942; 49: 408-10.
8. Boyd WA. A Text-Book of Pathology: Philadelphia Lea y Febiger, 1958.
9. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; 347: 1377-81.
10. Clark WH. The nature of cancer morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncol* 1995; 34: 3-21.
11. Faber E, Rubin H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2751-61.
12. Needham J. Regeneration and wound-healing. London: Methuen, 1952.
13. Gross J, Highberger JH, Schmitt FO. Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 41: 1.
14. Asboe-Hansen G. Connective tissue in health and disease. Copenhagen: Munksgaard, 1954.
15. Metchnikoff E. The comparative pathology of inflammation, London 1893.
16. Rather LJ. The genesis of cancer. Baltimore: Johns Hopkins Univ Press, 1978.
17. Grobstein C. Analysis *in vitro* of the early organization of the rudiment of the sub-mandibular gland. *J Morph* 1953a; 93: 19-44.
18. Grobstein C. Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiments *in vitro*. *J Exp Zool* 1953b; 124: 383-413.
19. Grobstein C. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *J Exp Zool* 1955; 130: 310-39.
20. Borghese E. The development *in vitro* of the submandibular and sublingual glands of mus musculus. *J Anat* 1950; 84: 287-302.
21. Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Survey* 1995; 23: 33-42.
22. Thompson TC, Timme TL, Kadmon D, et al. Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras + myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. *Mol Carcinog* 1993; 3: 165-79.
23. Hauptmann S, Zardi L, Siri A, et al. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Lab Invest* 1995; 73: 172-82.
24. Takeuchi J. Structure and functions of extracellular matrix with special references to proteoglycan. *Rinsho Byori* 1995; 43: 979-87.
25. Strunk E., Hopert AC, Vollmer G. Basement membrane regulates gene expression in HECIB' endometrial adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 346-50.