

Autoanticuerpos contra receptores muscarínicos en cáncer de mama

Gabriel Fizman¹, Valentina Cattaneo¹, Eulalia de la Torre², Lucas Colombo¹, Cristina Middonno¹, Eugenia Sacerdote de Lustig¹, María Elena Sales^{2*}

¹Instituto de Oncología A.H. Roffo. Facultad de Medicina UBA. ²Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET). Facultad de Medicina, UBA.

e-mail: mesales@2vias.com.ar

Recibido: 11/11/05

Aceptado: 6/12/05

Resumen

Se ha investigado exhaustivamente, la capacidad de células transformadas para inducir una respuesta inmune eficaz en portadores de tumor. En particular, la detección y el papel de anticuerpos (Acs) específicos contra antígenos (Ags) tumorales en los pacientes con cáncer ha dado resultados contrapuestos. Previamente caracterizamos la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) en células LM3, derivadas de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo de la cepa BALB/c. Estas células presentan una mayor expresión de RCM en comparación con células normales de epitelio mamario murino, NMuMG. En este trabajo, investigamos la capacidad de las proteínas RCM sobre-expresadas para inducir una respuesta humoral autóloga en portadores del tumor LM3 y la función de los Acs formados en la progresión tumoral. Detectamos autoAcs contra RCM en la fracción IgG purificada del suero de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) formados 14 días y 28 días después de la inoculación subcutánea de células tumorales, respectivamente. La IgG proveniente del suero de portadores de Tp estimula significativamente la proliferación de células tumorales, mientras que la de portadores de TG la inhibe. Ambos efectos fueron reducidos por el pretratamiento de las células LM3 con el

antagonista muscarínico atropina (AT). La IgG purificada de animales normales estimuló la proliferación de células LM3 pero el efecto no fue modificado por AT. La IgG de portadores de tumor desplazó la unión del radioligando muscarínico tritiado, bencilato de quinuclidinilo ($[^3\text{H}]$ -QNB) a los RCM en células LM3 en forma dependiente de la concentración, lo que evidenció la interacción de los Acs con los receptores expresados en dichas células. Asimismo, la IgG de portadores de tumor reconoció, en ensayos de inmunomarcación de homogenatos de corazón murino, una proteína cuyo peso molecular coincide con la que reconoce un Ac monoclonal específico contra el receptor muscarínico de acetilcolina M_2 . Resultados análogos se obtuvieron en homogenatos de tumor y lisados de células LM3. Además observamos que la IgG purificada de portadores de TG estimula la respuesta neovascular inducida por células LM3 con participación de los RCM. Concluimos que los autoAcs presentes en el suero de portadores de tumor ejercen efectos protumorales diferentes por vía muscarínica mientras que en portadores de Tp estimulan la proliferación de células LM3 en portadores de TG, promueven la neovascularización.

Abstract

The presence and the role of antibodies (Abs) directed against tumor antigens in cancer patients has given off contradictory evidences. We had previously detected and characterized muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in mammary tumor LM3 cells from BALB/c mice. These cells over-expressed mAChR from the M_2 subtype, in comparison with normal mammary cells. Here we investigate the ability of up regulated mAChR to induce a humoral autoimmune response in LM3 tumor bearers and autoAbs function in tumor progression. IgG fraction purified from small (sT) (14 days LM3 tumor) stimulated tumor cells proliferation while IgG from big tumor (bT) bearers (28 days LM3 tumor) inhibited tumor cells growth. Both effects were reduced by atropine (AT). We also observed that IgG from tumor bearers displaced the binding of the tritiated muscarinic antagonist $[^3\text{H}]$ -QNB to LM3 cells in a concentration dependent manner, and recognized by immunoblotting a 70 kDa protein in tumor cells and murine heart membrane enriched fraction, that is also recognized by a monoclonal antibody against M_2 receptor, revealing IgG interaction with mAChR. In addition IgG from bT bearing mice potentated neovascular response induced in vivo by LM3 cells, effect that

was reduced by AT. In conclusion autoAbs against mAChR from LM3 tumor bearing mice exert different pro-tumor actions depending on the stage of tumor development: in sT bearing mice they stimulate tumor cells proliferation while in bT animals they potentate tumor neovascularization.

Introducción

Los conceptos sobre el papel del sistema inmune en la protección contra el cáncer se han enmarcado en dos posiciones extremas. Según la teoría de la inmunovigilancia, las células inmunocompetentes son las encargadas de detectar y eliminar células tumorales y desempeñan la función más importante para controlar el crecimiento tumoral. En oposición, la hipótesis de la estimulación inmune predice que bajos niveles de activación del sistema inmune producen una respuesta que potencia el crecimiento tumoral (1). En tumores humanos, se ha demostrado la presencia de un infiltrado de células inflamatorias, con predominio de linfocitos y macrófagos, aunque también pueden encontrarse células dendríticas, granulocitos y mastocitos. Se ha comprobado que estas células se encuentran activadas pues expresan receptores de interleuquina-2 o productos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Sin embargo no se le ha podido asignar a la presencia de células inmunocompetentes un valor pronóstico en relación con la progresión del tumor (2). Durante la década del '80, los inmunólogos sugirieron que los linfocitos B de pacientes con neoplasias eran incapaces de desarrollar una respuesta inmune contra el tumor. Más aún, afirmaban que los Acs producidos por estas células no desempeñaban ningún papel en la progresión tumoral (3). Sin embargo recientemente se han detectado anticuerpos (Acs) en el suero de pacientes oncológicos que reconocen proteínas propias sobreexpresadas como las del golpe de calor, neuronales y nucleares (4-6). En mujeres con cáncer de mama se identificaron autoAcs con diferentes especificidades y se sabe que las células B que infiltran los carcinomas medulares de mama producen Acs contra autoantígenos (autoAgs) de membrana expuestos durante la apoptosis de células tumorales (7). Previamente hemos informado que las células LM3, derivadas del adenocarcinoma mamario murino M3, expresan constitutivamente altas concentraciones de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) en comparación con células de epitelio mamario murino normal, NMuMG (8). Por ensayos de

inmunomarcación con Acs específicos contra todos los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 - M_5) demostramos una expresión mayoritaria del subtipo M_2 en las células LM3. En este trabajo nos proponemos investigar la presencia de Acs contra dichos RCM en el suero de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) (14 y 28 días de portación del tumor LM3, respectivamente). Asimismo estudiamos la capacidad de estos Acs para modular la proliferación celular y la angiogénesis tumoral.

Materiales y Métodos

Cultivos de líneas celulares

Se utilizaron células de la línea LM3, derivada del adenocarcinoma mamario murino M3, de aparición espontánea en hembras BALB/c en el bioterio del Instituto A.H. Roffo (9). Se obtuvieron suspensiones de las células, que crecen en monocapa, por tratamiento con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% en PBS libre de calcio y magnesio. Cada 2 días se reemplazó el medio de cultivo MEM con 5% de suero fetal bovino (SFB). La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión de azul Trypan y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor que el 90 %.

Obtención de sueros e IgG de portadores de tumor LM3

Hembras BALB/c se inocularon en un flanco con 4×10^5 células LM3 y se obtuvieron portadores de tumor pequeño (Tp) (masa tumoral: $0,260 \pm 0,068$ g de 14 días de portación) y tumor grande (TG) (masa tumoral: $1,354 \pm 0,330$ g de 28 días de portación). Los sueros de animales normales y portadores de Tp y TG se obtuvieron por sangrado retro-orbital y se incubaron a 37°C durante 1 hora para retraer el coágulo. Luego se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el complemento por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y se conservaron a -20°C hasta su uso. La fracción IgG de los sueros se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A-Sepharosa con un método de alta concentración salina. Las fracciones se eluyeron en buffer citrato pH 3, controlando la absorbancia del eluido a 280 nm. Las muestras se concentraron por evaporación, mediante centrifugación bajo vacío y se dializaron contra PBS a 4°C durante toda la noche. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (10).

Proliferación celular

Las células LM3 se sembraron en placas de 96 pocillos (10^4 cél./pocillo) en MEM con 5% de SFB, se incubaron por 24 horas a 37°C y se privaron de suero 24 horas antes del ensayo. Luego de tratar con atropina (AT) 10^{-5} M por 15 minutos, se incubaron con los sueros o IgG durante diferentes períodos de tiempo. Luego se reemplazó el medio por medio fresco y se agregaron 20 μl de medio que contenían 10.000 cpm de [^3H]-timidina a cada pocillo. Las células se cultivaron por 48 horas a 37°C , se lavaron con PBS y se lisaron en 200 μl de NaOH 0,2 M. El contenido de cada pocillo se agregó a 1 ml de solución de centelleo biodegradable. Los resultados se expresaron como porcentaje de estimulación o inhibición de la incorporación de [^3H]-timidina con respecto al control (células sin tratamiento).

Ensayos de desplazamiento de la unión de [^3H]-QNB

Se realizaron ensayos de desplazamiento de la unión del antagonista muscarínico tritiado [^3H]-QNB con distintas concentraciones de la IgG purificada del suero de portadores de T ρ , TG y como control se utilizó IgG normal. Las células se cultivaron en placas de 48 pocillos a 25°C durante 90 minutos en medio MEM con agitación en ausencia o en presencia de las fracciones IgG, AT o AF-DX116 (antagonista muscarínico M_2 selectivo), con [^3H]-QNB 1 nM. Los resultados se expresaron como % de [^3H]-QNB unido con respecto a la unión del radioligando a células sin tratamiento, que se consideró como el 100% de unión (11).

Ensayos de inmunomarcación post electrotransferencia (Immunoblotting)

Preparación de lisados celulares

Las células LM3 (2×10^7) se cultivaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,4; MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 1%, NaF 50 mM, e inhibidores de proteasas, durante 1 hora a 0°C . Luego de sonicar 30 segundos a 4°C , se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry (10) y los mismos se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Preparación de homogenatos de tumor y corazón

Los tumores se extirparon quirúrgicamente y se homogeneizaron en buffer: Tris 20mM, pH 7,4; EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10% v/v, ditiotreitól 1 mM, e inhibidores de proteasas, con un Ultraturrax a velocidad baja, media y alta, 30 segundos cada vez y se sonicaron durante 40 segundos.

Los homogenatos de corazón se obtuvieron en buffer RIPA modificado: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH: 7,4; EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Triton X100 1%, deoxicolato de sodio 1%, SDS 0,1%; aprotinina y leupeptina 5 ug/ml. Los homogenatos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Los lisados celulares y homogenatos tratados o no con AT 10^{-5} M, se diluyeron 1:4 en buffer muestra y se sembraron 30 ug de proteína por calle en minigeles de poliacrilamida con SDS al 7,5% y se sometieron a electroforesis (*SDS-PAGE*). Luego, las proteínas fueron transferidas por el método semiseco a una membrana de nitrocelulosa. La eficiencia de la transferencia se verificó por tinción de las membranas con rojo Ponceau. Después de lavar con agua bidestilada, las membranas se incubaron en buffer de bloqueo Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5% (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los sueros o IgG provenientes de animales normales o portadores de Tp o TG. Como control positivo se utilizó un Ac monoclonal contra el receptor M₂ murino (Abcam Co.). Luego de lavar con TBST, se incubaron con el segundo anticuerpo anti IgG murina hecho en conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 37° C. Las bandas se visualizaron con NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría. Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm²) (11).

Inmunofluorescencia indirecta

Se incubaron 5×10^5 células LM3 en PBS con 0,5% leche descremada en polvo y se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm. Se agregó al pellet suero o IgG de portadores de TG (1mg/ml o 0,7mg/ml respectivamente) y se incubaron por 1 hora a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS, 0,5% leche descremada en polvo y se incubaron con buffer PBS, 5% leche descremada en polvo por 45 minutos. Luego se agregó un anticuerpo anti IgG murina conjugado con fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology) (5 ug/ml) y se incubaron por 45 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se

observaron en microscopio de fluorescencia con un aumento de 100 veces y se fotografiaron con un cámara digital Nikon.

Angiogénesis inducida por células tumorales

Las células LM3 (2×10^6) se resuspendieron en 1 ml de MEM y se trataron durante 1 hora con IgG purificada de suero normal o de portadores de Tp o TG en ausencia o en presencia de AT (10^{-6} M). Luego se lavaron con medio fresco y se inyectaron (2×10^5 cél./0,1 ml) por vía intradérmica con azul Trypan, para visualizar el sitio de inoculación, en ambos flancos de ratones BALB/c normales. Los ratones receptores de las células se sacrificaron con éter cinco días después de la inoculación y la respuesta vascular se evaluó en la cara interior de la piel con lupa (aumento 6,4 X). El método utilizado para cuantificar la respuesta angiogénica se basó en la determinación de la densidad de vasos (δ) expresada como número de vasos por mm^2 de piel de ratón, según el criterio de Auerbach modificado (12).

Resultados

Modulación colinérgica de la proliferación de células LM3 por el suero y la IgG de portadores del tumor LM3

Teniendo en cuenta que las células LM3 sobreexpresan RCM, investigamos la capacidad de estas proteínas de actuar como Ags desencadenando una respuesta inmune humoral en portadores de tumor. Realizamos curvas concentración-respuesta con los sueros (0,5-10 mg/ml) o las IgG (0,0025-0,025 mg/ml) agregados al cultivo durante distintos periodos de tiempo. Las concentraciones efectivas máximas de los sueros e IgG fueron 2 mg/ml y 0,025 mg/ml respectivamente para un tiempo de tratamiento de 1 hora. Observamos que el suero de los portadores de Tp estimula significativamente la proliferación de células LM3 en un 163% con respecto al basal (células sin tratamiento). Este efecto fue reducido por el pretratamiento de las células con AT 10^{-5} M. (Fig.1A). El tratamiento de las células con la IgG purificada del suero de portadores de Tp produjo un estímulo de igual magnitud (164%) en la proliferación celular que también se redujo significativamente con la misma concentración de AT. El tratamiento de las células LM3 con el suero de TG produjo un efecto inhibitorio no significativo de la proliferación (-

12%) que fue revertido a estimulante por el pre-tratamiento de las células con AT, mientras que la IgG purificada del suero de TG inhibió significativamente (37%) la proliferación celular (Fig. 1B).

El tratamiento con suero o IgG proveniente de hembras BALB/c normales estimuló la proliferación celular aproximadamente en un 41% y 25% respectivamente. La AT no modificó significativamente ninguno de los dos efectos.

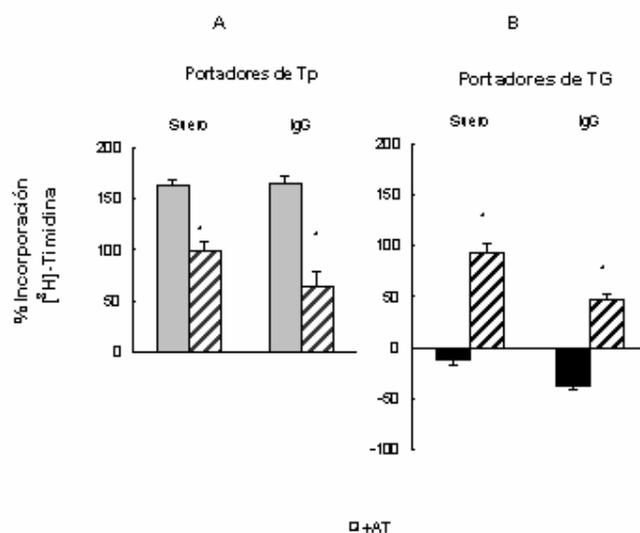


Figura 1 Efecto del tratamiento de células LM3 con suero e IgG de portadores de **(A)** tumor pequeño (Tp) y **(B)** tumor grande (TG). Las células LM3 se trataron durante 1 hora con los sueros (2 mg/ml) o IgG (0,025 mg/ml), luego el medio se reemplazó por medio fresco conteniendo timidina tritiada (^3H -Timidina) y se midió la proliferación después de 48 horas de cultivo como porcentaje de incorporación de ^3H -Timidina con respecto al control (células sin tratamiento). Los valores son promedios \pm E.S de 3 experimentos realizados por duplicado. *p<0.05

Desplazamiento de la unión del antagonista muscarínico ^3H -QNB por la IgG purificada del suero de portadores de tumor

Para confirmar la interacción de la IgG purificada del suero de portadores de Tp y TG con los RCM expresados en células LM3 realizamos ensayos de desplazamiento de la unión de ^3H -QNB. Como control positivo realizamos desplazamientos con concentraciones crecientes de AT y

AF-DX116, antagonista selectivo del receptor M_2 que se expresa mayoritariamente en las células LM3. En la Figura 2 A se muestra que tanto la IgG purificada de portadores de Tp como de TG desplaza en forma dependiente de la concentración la unión del radioligando muscarínico. La IgG normal no modificó la unión de [3 H]-QNB a células LM3. Los ensayos de desplazamiento con concentraciones crecientes de AT o AF-DX116 confirmaron la expresión mayoritaria del subtipo M_2 en estas células (Fig. 2B). Se observa que el efecto de la IgG de portadores de tumor es análogo al que produce una concentración 10^{-7} M de los antagonistas AT y AF-DX116.

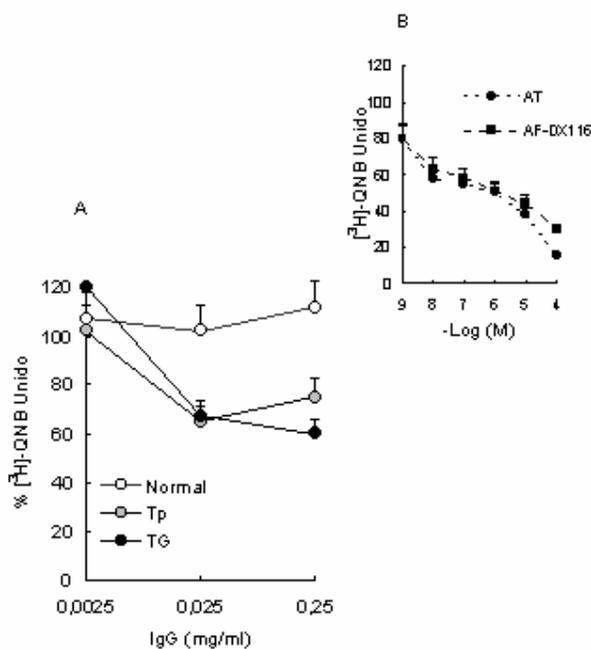


Figura 2. Ensayos de desplazamiento de la unión de [3 H]-QNB. Las células LM3 se incubaron con el radioligando en una concentración 1 nM en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de: **(A)** IgG purificada del suero normal, o de portadores de tumor pequeño (Tp) o grande (TG); **(B)** atropina (AT) y AF-DX116. Los valores son promedios \pm E.S. de 3 experimentos realizados por duplicado.

Inmunomarcación de los RCM por IgG de portadores de tumor

Realizamos ensayos de inmunomarcación (immunoblotting) utilizando como primer anticuerpo los sueros o IgG obtenidos de portadores de Tp y TG sobre homogenatos de tumor LM3 (Fig. 3A) y lisados de células LM3 (Fig. 3B) previamente tratados o no con AT 10^{-5} M. En la

Figura 3 A se observa que la IgG purificada del suero de portadores de Tp y TG reconoce una banda cuyo peso molecular es aproximadamente 70 kDa en homogenatos del tumor LM3, que se reduce por el pre-tratamiento con AT. En la Figura 3 B se muestra el resultado de un ensayo de inmunomarcación realizado sobre lisados de células LM3 que confirma que el suero e IgG obtenidos de portadores de TG detecta una proteína expresada por las células tumorales cuyo peso molecular coincide con el del receptor M_2 en dichas células. Asimismo, las IgG purificadas del suero de portadores de Tp y TG reconocen al receptor M_2 que se expresa mayoritariamente en corazón murino y también es reconocido por el Ac anti M_2 como control positivo (Fig. 3 C). Por inmunofluorescencia indirecta se observa que tanto el suero como la IgG purificada de portadores de TG dan una imagen positiva de fluorescencia con localización preponderante en la membrana de células LM3 (Fig. 4 A y B).

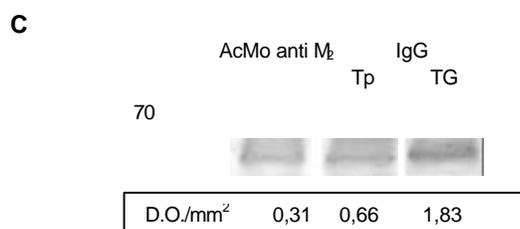
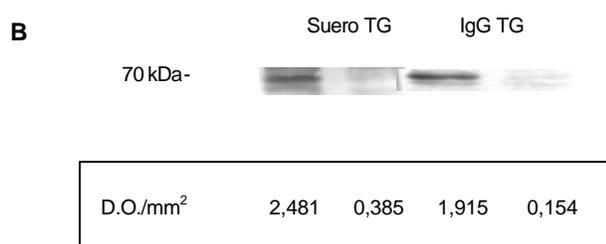
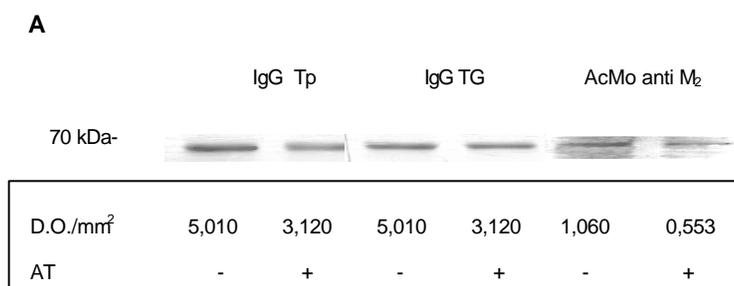


Figura 3. (A) Ensayo de Western blot sobre tumor LM3. Los homogenatos de tumor tratados o no con atropina (AT) 10^5 M, fueron inmunomarcados con IgG proveniente de sueros de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) o con un anticuerpo monoclonal anti M_2 . **(B)** Ensayo de Western blot sobre lisados de células LM3 que fueron tratados o no con atropina (AT) 10^5 M y fueron inmunomarcados con suero e IgG proveniente portadores de tumor grande (TG). **(C)** Ensayo de Western blot sobre homogenatos de corazón murino. La IgG purificada de portadores de Tp y TG inmunomarca una proteína de 70 kDa que también es reconocida por un anticuerpo monoclonal contra el receptor M_2 . El peso molecular de las bandas se indica a la izquierda. Las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm²). Se muestra un ensayo representativo de 3 realizados.

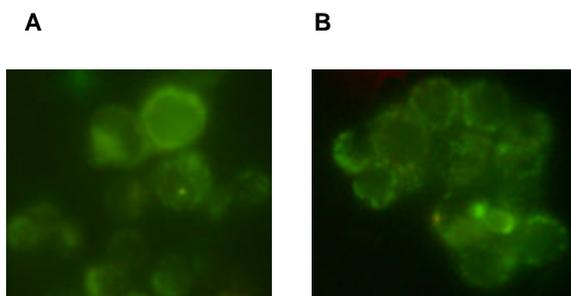


Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta en células LM3 en suspensión. **(A)** Suero de portadores de tumor grande (TG) (1mg/ml) y **(B)** IgG purificada del suero de portadores de TG (0,7 mg/ml). Se utilizó un segundo anticuerpo anti IgG murina conjugado con FITC. Aumento 100X.

Modulación de la angiogénesis tumoral por IgG de portadores de tumor LM3

Teniendo en cuenta que las fracciones IgG purificadas de los sueros de portadores de Tp y TG tienen efectos opuestos sobre la proliferación de células LM3, estudiamos la capacidad de dichos Acs para modular la angiogénesis, etapa fundamental en la progresión tumoral. En la Figura 5 A se observa que a pesar de que la IgG purificada de portadores de Tp y TG estimula la respuesta angiogénica (\bar{x}) (IgG Tp: $3,50 \pm 0,60$; IgG TG: $3,60 \pm 0,05$) (n=3) inducida por células LM3 sin tratamiento (basal: $2,01 \pm 0,64$) (n=3), los efectos no fueron significativamente distintos de los producidos por IgG normal ($3,72 \pm 0,50$) (n=3). La preincubación de las células LM3 con AT 10^5 M redujo significativamente sólo el efecto de la IgG proveniente de portadores de TG. En la Figura 5 B se muestra un control negativo de piel normal sin tratamiento ($1,65 \pm 0,14$; n=9), en 5 C la

respuesta positiva de células LM3 sin tratamiento y el efecto de células tratadas con IgG obtenida de portadores de TG en 5 D.

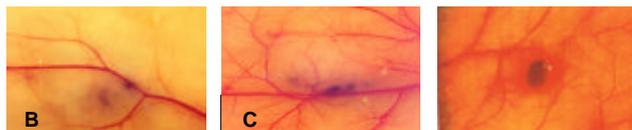
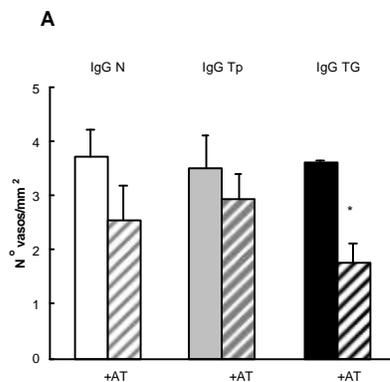


Figura 5. Ensayo de angiogénesis inducida por células tumorales. **(A)** Las células LM3 (2×10^5) se inocularon en forma subcutánea en hembras BALB/c, luego de ser tratadas con IgG (0,025 mg/ml) purificada de animales normales (IgG N) o de portadores de tumor pequeño (Tp) o tumor grande (TG) en ausencia o en presencia de atropina (AT) (10^{-5} M). Luego de 5 días se sacrificaron los animales y se cuantificó la densidad de vasos en la cara interna de la piel en el sitio de inoculación. * $p < 0,05$ **(B)** piel normal (sin tratamiento) **(C)** piel inoculada con células LM3 **(D)** piel inoculada con células LM3 tratadas con IgG TG. Magnificación 6,4X.

Discusión

Se han realizado varios intentos por demostrar la presencia de Acs específicos contra Ags tumorales en pacientes con cáncer, pero los resultados son aún contradictorios. Durante la década del '80 se sugirió que los linfocitos B de pacientes portadores de tumor no eran capaces de desarrollar una respuesta inmune humoral anti-tumor. Más aún se afirmaba que estas células no desempeñaban ningún rol en la progresión tumoral (3). Sin embargo, recientemente se describió la presencia de Acs en pacientes con distintos tipos de tumores que reconocen Ags tumorales y que pueden vincularse con síndromes paraneoplásicos, lo que indica una respuesta policlonal,

multifuncional en estos pacientes (13-15). Debe tenerse en cuenta que las proteínas sobre-expresadas en células tumorales, podrían estar actuando como Acs desencadenando una respuesta inmune humoral en portadores de tumor. Este podría ser el caso de los portadores del tumor LM3, cuyas células derivan del adenocarcinoma mamario murino M3 y sobre-expresan receptores M_2 en comparación con las células de mama murina normal NMuMG (8). Nosotros demostramos que tanto el suero, como la IgG de portadores murinos tempranos y tardíos de tumor modulan la proliferación de células LM3 por vía muscarínica pues el efecto se reduce significativamente por el pretratamiento con el antagonista muscarínico AT. Previamente demostramos que la estimulación de RCM con el agonista muscarínico carbacol (CARB), promueve la proliferación de células LM3, con aumento de la actividad de las enzimas fosfolipasa C y óxido nítrico sintasa neuronal (11). En este sentido los autoAcs estarían ejerciendo un efecto semejante al del agonista, promoviendo la proliferación y favoreciendo el crecimiento tumoral. *Wen y col.* investigaron el papel de Acs humanos en pacientes con cáncer de mama e informaron la presencia de fragmentos Fab que reaccionan con Acs expresados en tumores primarios de mama, estimulando la proliferación de células tumorales de igual estirpe MDA-MB-231 y MCF-7, con participación de la vía ERK2 (16). También se ha descrito la presencia de Acs anti-RCM en pacientes con otras patologías crónicas como miocardiopatías y exocrinopatías; estos Acs activan receptores M_2 y M_3 , desencadenando señales de transducción que ejercen efectos parasimpaticomiméticos, agravando las condiciones de los pacientes (17,18).

Por el contrario la IgG de portadores de TG inhibe la proliferación celular y el bloqueo muscarínico revierte el efecto inhibitorio en estimulante. Estos resultados indican la presencia de una fracción de Acs contra RCM con capacidad inhibitoria y otra fracción capaz de estimular la proliferación por una vía no colinérgica, cuyo efecto sea tal vez preponderante en portadores tardíos. Esta fracción estimulante estaría presente no sólo en portadores de Tp sino también en el suero de animales normales, puesto que tanto el suero como la IgG normal estimulan significativamente la proliferación.

Además demostramos la interacción de los Acs provenientes de portadores de Tp y TG con los RCM presentes en células LM3 pues estos desplazan significativamente la unión del

radioligando muscarínico [³H]-QNB. La IgG normal no fue capaz de desplazar la unión del radioligando en ninguna de las concentraciones ensayadas lo que confirmaría que la estimulación de la proliferación de células LM3 inducida por esta fracción es un efecto no colinérgico.

Previamente demostramos que la población de receptores M₂ es mayoritaria en las células LM3 (11). Por ensayos de Western blot observamos que tanto el suero como la IgG de portadores de tumor reconocen estos receptores expresados sobre células tumorales y corazón murino, pues las fracciones IgG inmunodetectan una proteína cuyo peso molecular coincide con la que reconoce un Ac monoclonal específico contra el receptor M₂.

A pesar de que la IgG purificada de portadores de TG inhibió la proliferación *in vitro* de células LM3, se observa que el tumor continúa creciendo *in vivo*, indicando que existen otros mecanismos que sostienen la progresión tumoral. Por esto investigamos la participación de los Acs anti RCM en la angiogénesis inducida por células tumorales. Observamos que si bien el efecto estimulante de la IgG de portadores de TG sobre la neovascularización no fue significativamente distinto del que producen la IgG normal o de portadores de Tp, el mismo fue inhibido por AT, indicando la participación de la vía muscarínica en el proceso angiogénico. Previamente demostramos que el tratamiento de células LM3 con CARB potencia la respuesta neovascular *in vivo* inducida por dichas células, efecto que se revierte en presencia de AT o metoctramina, antagonista M₂ (19). Es posible que exista un mayor título de Acs anti RCM en los portadores tardíos o que se modifique la especificidad por el subtipo M₂, aumentando la proporción de Acs contra este subtipo, involucrado principalmente en la angiogénesis inducida por células LM3. Estamos realizando nuevos experimentos para demostrar esta hipótesis.

Concluimos que los portadores del tumor LM3 poseen autoAcs contra RCM con distinta actividad biológica según el estadio del tumor. Los portadores tempranos presentan en el suero autoAcs que reconocen a los RCM y estimulan la proliferación celular; efecto que disminuye significativamente por el tratamiento con AT. Esta reacción autoinmune favorecería el crecimiento del tumor en esta etapa inicial. Los portadores tardíos también presentan autoAcs que reconocen a los RCM. A pesar de que esta fracción tiene actividad inhibitoria sobre la proliferación de células LM3, promovería el crecimiento tumoral al estimular la angiogénesis.

Referencias

1. Jakóbisiak M, Lasek W, Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Let* 2003; 90: 103-122.
2. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12: 337-66.
3. Manson L.A. Anti-tumor immune responses of the tumor bearing host: the case for antibody mediated immunologic enhancement. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72: 1-8.
4. Witkin, S.S. Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001; 22:249-56.
5. Karim AR, Hughes RG, Winer JB, Williams AC, Bradwell AR. Paraneoplastic neurological antibodies: a laboratory experience. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1050: 274-85.
6. Gautier F, Irminger-Finger I, Gregoire M, Meflah K, Harb J. Identification of apoptotic product of BARD1 as an autoantigen: a potential factor in the antitumoral response mediated by apoptotic bodies. *Cancer Res* 2000; 60: 6895-900.
7. Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ. The tumor infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12569-664.
8. Español A, Eiján AM, Mazzoni E, Davel L, Jasnis MA, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. *Int J Mol Med* 2002; 9: 651-7.
9. Urtreger AJ, Ladedá VE, Puricelli LI, Rivelli A, Vidal MC, Lustig ES, Bal de Kier Joffé E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary tumor cell lines. *Int J Oncol.* 1997; 11: 489-96.
10. Lowry O, Rosenbrough N, Randall R, Farr A. Protein measurement with Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 1971; 193: 265-68.
11. Español A, Sales ME. Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines. *Int J Mol Med*, 2004, 13:311-17.

12. Davel L, Español AJ, de la Torre E, Jasnias MA, Ribeiro ML, Gotoh T, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Different mechanisms lead to angiogenic process in three tumor cell lines. *Angiogenesis* 2004; 7:45-51.
13. Bazhin AV, Shifrina ON, Savchenko MS, Tikhomirova NK, Goncharskaia, MA, Gorbunova VA, Senin II, Chuchalin AG, Philippov PP. Low titre against recoverin in sera of patients with small cell lung cancer without a loss of vision. *Lung Cancer* 2001; 34: 99-104.
14. Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix, JM, de Brouker T, Vial C, Butler M, De Camilli P. Michel D. Antiampiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic syndromes and tumors. *Arch Neurol* 1999; 56: 151-152.
15. Fernandez Madrid F, Karvonen RL, Ensley J, Kraut, M, Granda JL, Alansari H, Tang N, Tomkiel JE. Spectra of antinuclear antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the lung and of the head and neck. *Cancer Detect Prev* 2005;29: 59-65.
16. Wen YJ, Mancino A, Pashov A, Whitehead T, Stanley J, Kieber-Emmons T. Antigen binding of human IgG Fabs mediate ERK-associated proliferation of human breast cancer cells. *DNA Cell Biol.* 2005; 24:73-84.
17. Wang W, Guo G, Tang J, Li J, Zhao R, Hjalmanson A, Michael Fu L.X. Stimulatory activity of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic receptors. *Chin Med J (Engl)*. 2000; 113:867-71.
18. Humphreys-Beher MG, Brayer J, Yamachika S, Peck, AB, Jonsson R. An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand J Immunol.* 1999; 49:7-10.
19. Español AJ, Davel L, Jasnias MA, Ribeiro ML, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. La proliferación, la angiogénesis y el crecimiento tumoral son modulados por el sistema nervioso autónomo parasimpático. *Medicina* 2002; 65:512-513.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad de Buenos Aires, subsidio UBACYT MO04, Programación Científica 2004-2007.

Correspondencia a:

Prof. Dra. María Elena Sales

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET

Paraguay 2155 Piso 16 Sector Derecho

Buenos Aires-Argentina

TE-FAX: 011-4508-3680

e-mail: mesales@2vias.com.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

*Revista **QuímicaViva***
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar