

Trabajo de revisión

Mecanismos de la progresión tumoral y la evolución de la diversidad fenotípica de las neoplasias malignas

GARTH L. NICOLSON¹ y JORGE V. GAVILONDO COWLEY^{2*}

1) Departamento de Biología Tumoral, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute
6723 Bertner Ave., Houston, Texas 77030, EE.UU.

2) Departamento de Biología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

Recibido el 13 de septiembre de 1985

LA PROGRESION TUMORAL

Hace aproximadamente 30 años, Foulds (1954), acuñó con el término *progresión tumoral* la hipótesis de que el cáncer probablemente se desarrolla como una serie de cambios secuenciales y heredables. Según su concepción, la progresión tumoral era el proceso de evolución gradual mediante el cual un tumor iba hacia la autonomía incrementada, mediante una serie de cambios escalonados y bloques, o unidades, de características múltiples tales como velocidad de crecimiento, invasividad, metástasis, dependencia hormonal, etcétera, que conforman "etapas" en este proceso. Uno de los elementos fundamentales de esta concepción es la postulación de la existencia de progresión independiente para las diferentes unidades de características, es decir, la posibilidad de rearrreglos en combinaciones distintas, según las cuales cada forma de neoplasia autónoma puede evolucionar a lo largo de una variedad de alternativas (tabla 1, Foulds, 1969).

Tabla 1

PRINCIPIOS DE LA PROGRESION TUMORAL (según Foulds 1969)

1. La progresión ocurre independientemente en diferentes tumores de un mismo animal.
2. La progresión ocurre independientemente para diferentes caracteres del mismo tumor.
3. La progresión es independiente del crecimiento del tumor, es decir, en su primera manifestación clínica el tumor puede estar en cualquiera de los estadios de la progresión y esta es independiente del tamaño del tumor o de su duración clínica.
4. La progresión es continua o discontinua y ocurre por cambios graduales o saltos abruptos.
5. La progresión puede seguir una o varias vías alternativas de desarrollo.
6. La progresión no siempre llega a un punto final en el marco de la vida del hospedero.

*A quien deben solicitarse las copias.

Pese a que Foulds se basó esencialmente en evidencias experimentales indicativas de la existencia de estadios histológicamente distintos en el desarrollo de cánceres de la piel, el tracto urinario, las glándulas mamarias, el tracto respiratorio y el hígado (1975) y, por tanto, sus definiciones de "unidades" de características reflejan su perfil de trabajo en la patología, los resultados de un conjunto de estudios subsecuentes, de índole experimental, clínica y epidemiológica, han ido reafirmando la idea de que todos los tumores pudieran pasar por un proceso secuencial de progresión, quizás de manera muy condensada en algunos casos, y que probablemente la malignidad no resulte de un único cambio "universal" en las células.

Entre estos se encuentran:

- a) La existencia de al menos dos etapas discretas para la carcinogénesis química *in vivo* (Beremblum, 1978; Farber y Cameron, 1980; Farber, 1982, 1984).
- b) La adquisición progresiva y secuencial de propiedades que caracteriza la transformación celular *in vitro*, inducida o espontánea (Mondal *et al.*, 1976, 1977; Barret *et al.*, 1981; Borek, 1982; Pérez-Rodríguez *et al.*, 1981, 1982; Evans y DiPaolo, 1975; Thomassen *et al.*, 1985).
- c) Las evidencias de malignización por etapas derivadas de modelos experimentales *in vivo-in vitro*, en los cuales algunos pasos se inducen en el animal, y otros después de la manipulación *in vitro* del órgano, tejido, o las células (Hard *et al.*, 1980; Laerum y Rajewsky, 1975; Nettesheim *et al.*, 1981; Gavidondo *et al.*, 1982, 1982a).
- d) La existencia de cambios múltiples para el desarrollo de tumores humanos, que ocurren a una alta frecuencia en individuos con predisposición genética (Ashley, 1969; Knudson, 1977).
- e) La consistencia de los resultados del análisis matemático en la incidencia de cáncer edad-específica, con la idea de la naturaleza multietapas del desarrollo neoplásico (Doll, 1978; Peto, 1977).
- f) Las recientes evidencias sugestivas de la necesidad de la activación de dos o más oncogenes para la transformación y su mantenimiento en sistemas celulares (Land *et al.*, 1983; Newbold y Overell, 1976; Ruley, 1983; Balmain, 1985; Klein y Klein, 1984).

Cambios celulares y selección en el hospedero como bases de la progresión

Luego de los procesos de "iniciación" y "promoción" que caracterizan en los modelos *in vivo* las etapas iniciales de la carcinogénesis (Prehn, 1976; Farber y Cameron, 1980; Farber, 1984); las lesiones persistentes progresan hacia un cáncer compuesto por subpoblaciones tumorales con características biológicas y bioquímicas diversas. La esencia de la progresión se basa en la postulación de la existencia de cambios en las propiedades de las células del tumor, y no necesariamente en un hospedero alterado (Prehn, 1976). La aparición de variantes celulares con propiedades nuevas y ventajosas con respecto al resto de las células del tumor y los tejidos normales, conduce a su "selección" en el ambiente tisular y el consecuente enriquecimiento progresivo del tumor en estas variantes gracias a su proliferación. No existe aún suficiente información para precisar cómo las lesiones proliferantes locales que persisten evolucionan hacia un cáncer, y cómo se genera, en términos temporales, la diversidad fenotípica que caracteriza a los tumores avanzados. Empero, estos pasos subsiguientes parecen estar regidos por cambios esporádicos, "al azar", y de naturaleza clonal, que conducen a la aparición de variantes celulares estables en la población tumoral, en el marco del microambiente específico, que en definitiva los selecciona como ventajosos (Farber y Cameron, 1980; Farber, 1984). Estos y otros elementos, derivados de evidencias experimentales, favorecen la idea de que

la progresión ocurre por un proceso selectivo y no por adaptación fenotípica rápida de toda la población tumoral, independientemente de si los cambios esporádicos ("eventos raros") tienen base genética o epigenética, de lo que se discutirá más adelante. Esencialmente, puede considerarse que cualquier propiedad de las células tumorales puede estar sujeta a cambios fenotípicos y selección en el hospedero.

Aun así, existen ejemplos en los cuales el mecanismo de selección de variantes preexistentes de ocurrencia esporádica no se adecuan a las observaciones.

Prehn (1976), ha discutido recientemente el fenómeno llamado de Barret-Deringer que consiste en la existencia de un cambio en la capacidad de un tumor trasplantable para crecer a pesar de una barrera de histocompatibilidad moderada: la proporción de ratones en los cuales crece el tumor, originados por un retrocruce de una cepa parental resistente y 2 cepas de ratones, una permisiva y otra no permisiva a un tumor, se incrementa con respecto a lo esperado si el tumor se pasa primero por la F₁ en lugar de ser trasplantado directamente del hospedero isogénico permisivo. Esta alteración es estable y no se recuperan las características originales del trasplante; el cambio no es explicable sobre la base de la selección de variantes celulares tumorales preexistentes de ocurrencia esporádica, y más bien su naturaleza parece ser una rápida adaptación de la mayoría de la población.

En ocasiones, la manipulación experimental de líneas y clones celulares durante procesos de selección de variantes con propiedades metastásicas y malignas conduce a valorar el mecanismo de una rápida adaptación fenotípica. Bosslet y Schirmmacher (1982) encontraron que las células del linfoma ESb experimentaban rápidos cambios fenotípicos *in vivo*. Luego de la inyección subcutánea de clones de células de este linfoma en ratones isogénicos, estos autores recuperaron las metástasis esplénicas y aislaron las células ESb; se encontró que tenían resistencias significativamente superiores a células T citotóxicas que las células ESb obtenidas de forma similar a partir de los bazos de ratones desnudos. Las células ESb resistentes a células T no pudieron ser obtenidas de la población clonal original utilizando técnicas de subclonaje y parecían ser generadas muy rápido *in vivo* bajo las presiones inmunológicas del hospedero. Bosslet y Schirmmacher calcularon que las células ESb resistentes aparecían con una frecuencia de 10^{-3} /célula/generación en los animales inmunocompetentes. Como que las variantes resistentes a células T aparecían a estas altas frecuencias, se estimó que era poco probable que estuvieran implicados mecanismos de selección secuencial progresiva.

Gavilondo *et al.* (1982), al comparar los resultados de la selección de variantes tumorigénicas de fibroblastos L929 mediante el pase alterno *in vivo-in vitro*, o el trasplante seriado *in vivo* en ratones C3HA, encontraron que la dosis tumoral 50 por ciento (DT50) exhibida por las poblaciones resultantes en solo tres selecciones sucesivas por la vía alterna, era de un orden de magnitud menor (DT50 = 10^3 células) que aquella obtenida por el trasplante seriado *in vivo* del tumor durante unas 60 generaciones (DT50 = 10^4 células). Este rápido incremento en la tumorigenicidad no podía ser explicado aduciendo únicamente a una selección de variantes preexistentes, más aún cuando el clonaje de población parental solo generó poblaciones exhibiendo DT50 del orden de 10^4 .

Todo ello conduce a analizar que, aun cuando la gran mayoría de las evidencias experimentales favorecen la teoría de la selección de variantes generadas al azar, es posible que en las poblaciones tumorales ocurran adaptaciones estables de gran parte de la población tumoral inducidas por el microambiente específico.

La heterogeneidad fenotípica de los tumores malignos

Aun cuando está bien establecido que las neoplasias espontáneas e inducidas se desarrollan a partir de células únicas (origen clonal; Fialkow, 1979), lo cierto es que los tumores avanzados están compuestos por poblaciones celulares que manifiestan una diversidad fenotípica para una variedad de características que incluyen morfología, antígenos de superficie celular, glicolípidos y glicoproteínas, componentes relacionados con la adhesividad y el reconocimiento celulares, enzimas hidrolíticas y sintéticas, locomoción, invasividad y capacidad de metastización. La variabilidad célula-célula también ocurre en su sensibilidad a agentes terapéuticos tales como drogas, radiación e hipertemia, y en los mecanismos de la respuesta del hospedero (Fidler y Hart, 1982; Hart y Fidler, 1981; Nicolson, 1982; Nicolson *et al.*, 1982a; Nicolson y Poste, 1983; Poste, 1982).

Tal diversidad poblacional de propiedades también ocurre en las células y tejidos normales, aunque usualmente no al mismo grado. Los tejidos normales mantienen fenotipos celulares relativamente estables, pero pueden manifestar heterogeneidad en la expresión de componentes particulares (Griffin *et al.*, 1981; Peterson *et al.*, 1981). Aún así, la heterogeneidad fenotípica es más pronunciada en las neoplasias malignas que en sus contrapartidas celulares normales.

Según los principios de la progresión tumoral, las frecuencias en las cuales puede ocurrir la diversificación fenotípica para las células tumorales es también variable, esperándose que algunas neoplasias malignas ganen heterogeneidad temprano, después de la transformación, para proceder luego más lentamente, y otras diversifiquen tardíamente en la historia natural del tumor. Las alteraciones externas, tales como aquellas producto del tratamiento y a las que seguirán nuevas interacciones celulares, pueden provocar cambios en las frecuencias de diversificación fenotípica de los tumores (Kerbel y Davis, 1982; Woodruff, 1982, 1983; Nicolson, 1984a).

No obstante, algunos de los cambios encontrados en los tumores malignos no parecen estar relacionados con sus estados de progresión y malignidad. Algunas propiedades poco esenciales para la supervivencia de las células tumorales pueden perderse en los estadios finales de la progresión tumoral, lo que ha sido interpretado en ocasiones como una "pérdida de diferenciación"; aun así, la relación entre tales cambios y la diferenciación, la progresión y la malignidad es aún poco clara (Nicolson, 1984).

Los elementos anteriormente expuestos indican que el estudio de los mecanismos de la diversificación fenotípica y heterogeneidad poblacional de los tumores constituye un elemento esencial para la comprensión de la biología del cáncer y para enfrentar su tratamiento.

LA INESTABILIDAD DE LAS CELULAS TUMORALES

La progresión tumoral, tal como ha sido propuesta por Foulds (1975) y Nowell (1976), destaca el importante concepto de que el incremento en las alteraciones genéticas es generado por eventos mutacionales somáticos azarosos que permiten la eventual progresión de aquellas subpoblaciones celulares tumorales que emergen con alteraciones en su malignidad y otras propiedades fenotípicas (Nowell, 1976). La rápida diversificación está representada por subpoblaciones con inestabilidad genética incrementada y la posibilidad de adquisición de propiedades más favorables para su sobrevida, crecimiento y malignidad, frente a las presiones selectivas del hospedero (figura 1).

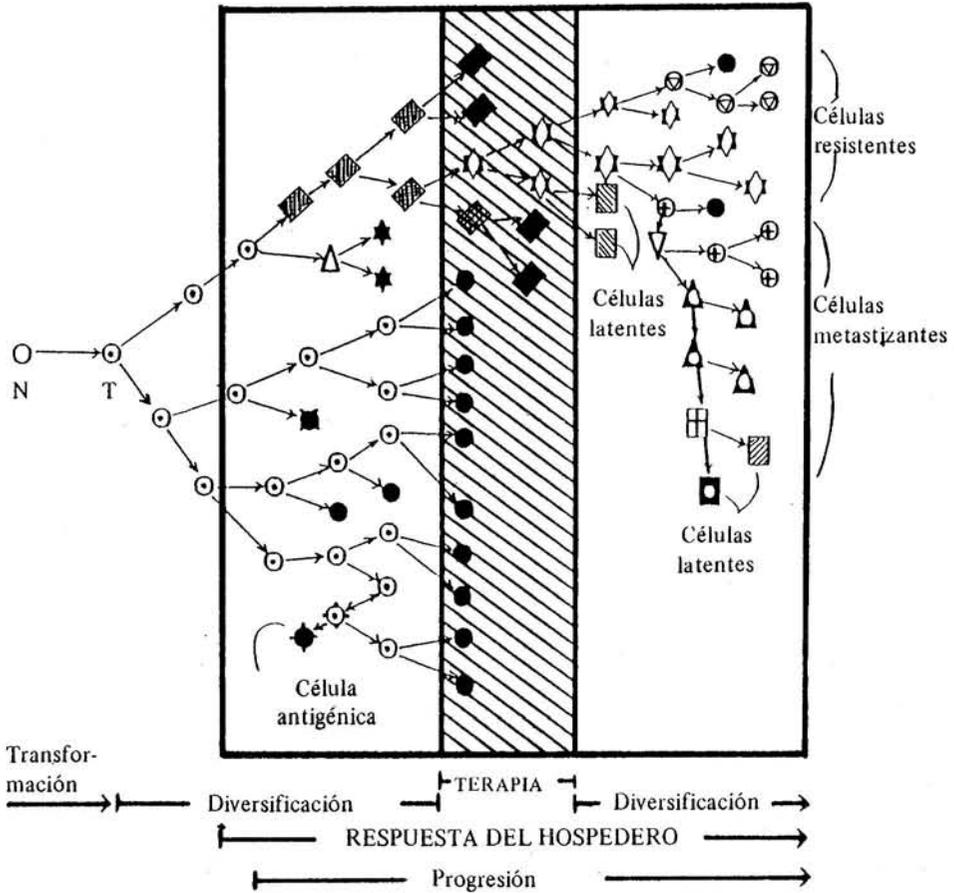


FIG. 1. Diversificación del fenotipo tumoral, progresión y efectos de la terapia antitumoral. La transformación de una célula normal (N) a una célula tumoral (T) puede llevar a la diversificación celular en las neoplasias malignas. Algunas de estas células tumorales variantes mueren (símbolos sólidos), debido a mutaciones letales o la respuesta del hospedero. Otras devienen latentes y son incapaces de proliferar, mientras que las restantes células resultan competitivas y más malignas a medida que experimentan la diversificación fenotípica. La terapia citotóxica resulta en la muerte de la mayoría de las células tumorales (símbolos sólidos) y en la restricción de la diversidad fenotípica. Aun así, algunas de las células malignas escapan al azar o debido a resistencia y continúan el proceso de diversificación. Eventualmente surgen subpoblaciones malignas que poseen las propiedades fenotípicas correctas para la metástasis.

Inestabilidad genotípica

La hipótesis de que los tumores malignos que exhiben crecimiento progresivo, invasión y metástasis poseen inestabilidad genética incrementada, se apoya fundamentalmente en datos genéticos y citogenéticos. La comparación entre células altamente malignas y sus contrapartidas normales o aquellas de baja malignidad, para la presencia de alteraciones cromosómicas groseras,

errores mitóticos y frecuencias espontáneas de mutación, indica que las primeras son genéticamente menos estables, y que a medida que estas evolucionan, las alteraciones cromosómicas pueden incrementar progresivamente en frecuencia (Nowell, 1983; Poste, 1982; Rowley, 1973; Rowley, 1975; Wolman, 1983).

Durante la progresión de los tumores malignos experimentales también se detectan cambios cromosómicos; estos han sido reportados para clones de tumores mamarios malignos de rata (Pearce *et al.*, 1984) y en la progresión de fibroblastos transformados por el virus del Sarcoma de Rous (Mitelman, 1974).

En los cánceres humanos, los incrementos en la ploidía celular se relacionan frecuentemente a estados de marcada progresión y pobre pronóstico (Wolman, 1983; Barlogie *et al.*, 1982), por ejemplo la enfermedad metastásica se presenta más frecuentemente asociada con hiperploidía que las neoplasias primarias (Barlogie *et al.*, 1982; Kusyk *et al.*, 1981; Testa *et al.*, 1979). Todo ello sugiere que algunos cambios cromosómicos específicos podrán tener una mayor importancia en la determinación de propiedades de la diversidad fenotípica y la malignidad (Nicolson, 1984a; Wolman, 1983).

Alteraciones de genes reguladores y oncogenes

Nowell (1983), ha recopilado un conjunto de mecanismos posibles para la generación de inestabilidad genética incrementada; estos incluyen: a) defectos hereditarios en la reparación de ADN o en genes de "mantenimiento"; b) defectos adquiridos en genes especializados, tales como genes "mutadores" o aquellos implicados en la síntesis de ADN; c) alteraciones cromosómicas tales como aneuploidía, translocaciones, intercambios anormales de cromátidas hermanas, regiones de amplificaciones cromosómicas (conocidas como "de tinción homogénea" o HSR) y cromosomas "diminutos dobles" (DM); d) integración de secuencias virales u oncogenes; e) efectos de agentes mutagénicos tales como radiación o drogas quimioterapéuticas; f) alteraciones microambientales relacionadas con diferencias nutricionales. Puede predecirse que cada uno de estos mecanismos pudiera generar resultados finales diferentes.

Uno de los mecanismos más interesantes y actuales por los cuales puede ser generada la inestabilidad genética es aquel relacionado con la incorporación de genes reguladores virales (oncogenes o *v-onc*) o sus prototipos celulares (protooncogenes o *c-onc*) (Cooper, 1982). Aun cuando se conoce que la inserción de oncogenes en genomas hospederos puede llevar a la transformación neoplásica o su mantenimiento (Blair *et al.*, 1981; DeFeo *et al.*, 1981; Klein y Klein, 1984; Weinberg, 1984), las relaciones de tales alteraciones a la diversificación/progresión del fenotipo tumoral no es clara. En algunos estudios, la ligazón de genes *c-onc* a secuencias promotoras transcripcionales de origen viral induce la transformación neoplásica, mediante su activación (Hayward *et al.*, 1981). También puede afirmarse que cambios cromosómicos groseros pudieran estar relacionados a alteraciones genéticas inducidas por la inserción o activación de oncogenes (Schwab *et al.*, 1983). Sin embargo, el que la progresión tumoral esté asociada al incremento de la expresión de los oncogenes, todavía no ha sido demostrado; recientemente Rotter *et al.* (1984), al comparar la expresión de los productos del *onc abl* en líneas celulares de alto y bajo potencial metastásico de un linfoma murino, no encontraron diferencias. No obstante, existe la posibilidad de que la inserción de oncogenes en lugares apropiados del ADN pudiera activar genes previamente crípticos (Hayday *et al.*, 1984) e iniciar el proceso de progresión.

Inestabilidad fenotípica

La inestabilidad genotípica, por sí sola, ciertamente no explica las extremadamente altas frecuencias de variación fenotípica de las células tumorales. Una de las formas de demostrar la inestabilidad genética de los tumores más malignos ha sido la de determinar las frecuencias espontáneas de mutación génica; Cifone y Fidler (1981), estudiaron la frecuencia de mutación a la resistencia de drogas utilizando líneas celulares y clones de melanoma y fibrosarcomas murinos, y encontraron que las células más metastásicas poseen frecuencias incrementadas (6-7 veces) de mutación espontánea. Aun así, las mayores frecuencias de mutación génica espontánea halladas por Cifone y Fidler (1981) son menores en órdenes de magnitud comparadas con las frecuencias de variación fenotípica calculadas. Ello pudiera quizás ser explicado aduciendo que la mutación génica ocurriera en sitios reguladores, generándose de esta forma una rápida heterogeneidad fenotípica celular. El hecho de que la mayoría de los cambios en los productos de los genes asociados con el fenotipo maligno parecen ser cuantitativos, más que cualitativos, apoya esta idea (Nicolson, 1982; Nicolson, 1983).

Otros autores, como Peterson *et al.* (1983), Chow y Greenberg (1980), Stackpole (1983), Talmadge *et al.* (1979), Nicolson *et al.* (1983), Bosslet y Schirmacher (1982), Harris *et al.* (1982) y Raz (1982), han reportado altas frecuencias de diversificación fenotípica en sistemas tumorales para propiedades que van desde la capacidad de metástasis hasta la sensibilidad a drogas.

La inestabilidad fenotípica para una variedad de propiedades celulares ha sido examinada en el laboratorio de uno de los autores empleando clones del adenocarcinoma mamario de rata 13762NF (Neri y Nicolson, 1981; Neri *et al.*, 1982). Los cambios experimentados por estas células durante su crecimiento *in vitro* para propiedades metastásicas (Welch *et al.*, 1983) se producen en paralelo con cambios en una variedad de otras características, entre las que están las glicoproteínas de superficie (Neri *et al.*, 1981; Steck y Nicolson, 1983), morfología celular y tisular (Neri y Nicolson, 1981; Neri *et al.*, 1982), marcadores cromosómicos (Pearce *et al.*, 1984) y sensibilidad a agentes terapéuticos (Tomasovic *et al.*, 1982; Welch *et al.*, 1983; Welch y Nicolson, 1983). Uno de los elementos más importantes demostrados es que el cambio fenotípico ocurría para algunas, pero no para todas las propiedades, a un número predecible de pases en cultivo, indicando que las variaciones fenotípicas pueden ser no azarosas y reproducibles, y pueden ocurrir a frecuencias específicas.

La existencia de altas frecuencias de cambio fenotípico en subpoblaciones celulares tumorales puede resultar en la generación de células que ganen o pierdan propiedades metastásicas (Fidler y Nicolson, 1981; Kerbel, 1979; Neri y Nicolson, 1981; Nicolson *et al.*, 1982; Poste *et al.*, 1981; Welch y Nicolson, 1983). Pero, por otro lado, Dennis *et al.* (1981) y Lagarde (1983), utilizando variantes celulares del tumor MDAY resistentes a lectinas, demostraron que las células malignas que revierten a un fenotipo más benigno son más susceptibles al microambiente del hospedero y a la vigilancia inmunológica y no inmunológica; así, estos clones disminuyen con el tiempo en la población celular tumoral a causa de la dominancia de fenotipos más malignos.

Modulación de la inestabilidad fenotípica

Las frecuencias de cambio fenotípico observados en sublíneas, clones y subclones tumorales sugiere que la presencia de diversas poblaciones celulares tumorales puede resultar eventualmente en la estabilización de propiedades fenotípicas. Ello ha sido demostrado en diferentes

sistemas. En el melanoma B16, los clones individuales generan rápidamente subpoblaciones celulares con diferentes propiedades metastásicas (Poste *et al.*, 1981; Fidler y Nicolson, 1981; Miner *et al.*, 1982; Nicolson, 1983) y es posible estabilizar el fenotipo con mezclas de clones, a diferencia de cuando estos se crecen individualmente (Poste *et al.*, 1981).

La modulación de la estabilidad fenotípica puede también ser alcanzada mediante la fusión de células neoplásicas y normales (Goldenberg *et al.*, 1974; De Baetselier *et al.*, 1981; Lagarde *et al.*, 1983). El rol de la fusión celular en las modificaciones del genoma *in vivo* está solo ahora comenzando a apreciarse y pudiera constituir un importante mecanismo para la generación de ploidía incrementada y progresión.

DIVERSIFICACION DEL FENOTIPO CELULAR TUMORAL

A medida que ocurre *in vivo* la diversificación fenotípica tumoral, la capacidad de la terapia antitumoral disminuye al no poder eliminar completamente las subpoblaciones celulares altamente malignas que existen, o que aparecen rápidamente en un tumor o en sus lesiones metastásicas. Esta capacidad de las células a cambios fenotípicos rápidos puede tener entonces importantes implicaciones para la terapia anticancerosa y ser la responsable de una fracción importante de fracasos terapéuticos (Goldin y Johnson, 1977). Se conoce que los tumores malignos poseen sensibilidades heterogéneas a la radiación (Revesz y Norman, 1960; Welch *et al.*, 1983), drogas citotóxicas (Dexter *et al.*, 1978; Heppner *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1981; Tsuruo y Fidler, 1981; Welch y Nicolson, 1983) y citostáticas (Lotan, 1979; Lotan y Nicolson, 1979; Nicolson, 1982) y a la hipertermia (Tomasovic *et al.*, 1982), lo que puede resultar en la emergencia de subpoblaciones resistentes, luego del tratamiento. Esta heterogeneidad existe también con respecto a las cantidades de receptores hormonales (Baylin *et al.*, 1978; Brennan *et al.*, 1979; Sluysen y VanNie, 1974), inmunogenicidades (Gavilondo *et al.*, 1984; Fidler *et al.*, 1979; Kim *et al.*, 1975; Olsson y Ebbeson, 1979) y sensibilidades a la citólisis o citostasis por células asesinas naturales (Gorelik *et al.*, 1982; Gorelik *et al.*, 1979; Hanna y Fidler, 1981); células T citotóxicas (Gorelik *et al.*, 1979; Miller y Heppner, 1979; Schirmacher y Bosslet, 1982) y macrófagos (Miner *et al.*, 1983; Miner y Nicolson, 1983).

Interacciones entre subpoblaciones celulares tumorales

Se conoce que la presencia de ciertas subpoblaciones celulares tumorales en una población tumoral policlonal puede llevar a la modulación de la diversificación fenotípica y restringir la emergencia de variantes celulares (Poste *et al.*, 1981; Poste *et al.*, 1982). En el sistema de tumor mamario desarrollado por Heppner *et al.* (1978) las interacciones entre las subpoblaciones celulares tumorales han sido estudiadas con respecto a la regulación del crecimiento celular. Algunas subpoblaciones celulares del tumor mamario también pueden influir en la sensibilidad a las drogas (Miller *et al.*, 1981), así como las propiedades metastásicas (Miller, 1983) de otras subpoblaciones.

El tratamiento de los tumores malignos mediante cualquier tipo de terapia puede resultar en la diversificación de las subpoblaciones celulares tumorales sobrevivientes (Poste, 1982). En una serie de experimentos, Poste *et al.* (1981) examinaron los efectos de las drogas citotóxicas sobre la diversificación fenotípica de los clones celulares sobrevivientes del melanoma B16. Estos autores demostraron que las drogas citotóxicas pueden depletar a las poblaciones celulares B16 policlonales de células sensibles a drogas, originando clones que son resistentes, pero

altamente inestables en sus propiedades biológicas. Estos subclones inestables generaron rápidamente un nuevo panel de subpoblaciones celulares con propiedades metastásicas y fenotípicas diferentes. Así, la modulación de la diversificación fenotípica por la terapia antitumoral puede resultar en una población celular más restringida que subsecuentemente es capaz de diversificación fenotípica ulterior. Estos resultados sugieren que las subpoblaciones celulares tumorales que sobreviven en los tumores tratados pueden no experimentar los mismos tipos de interacciones celulares policlonales. Ello pudiera resultar en la diversificación fenotípica durante la expansión de las células tumorales sobrevivientes.

El éxito de las terapias antitumorales pudiera bien depender de las capacidades de diferentes tratamientos para eliminar las escasas células altamente metastásicas y para controlar las subpoblaciones celulares tumorales altamente inestables que poseen el potencial para llevar a cabo la diversificación fenotípica y resultar en una progenie altamente metastásica (Nicolson y Poste, 1982; Nicolson y Poste, 1983; Nicolson y Poste, 1983a; Poste, 1982).

Efectos de los mecanismos epigenéticos

La rápida diversificación fenotípica celular de los tumores malignos no puede ser explicada exclusivamente por mecanismos de mutación genética y selección del hospedero. Esto ha llevado a propuestas adicionales que implican modificaciones en los genes reguladores, alteraciones en los arreglos de genes o cromosomas (recombinación), o la integración de secuencias virales (oncogenes). Estos cambios pudieran, colectiva o individualmente, modular o afectar la inestabilidad fenotípica. Un mecanismo adicional de generación de inestabilidad fenotípica es la posibilidad de que los mecanismos epigenéticos puedan resultar en modificaciones no mutacionales del ADN (Foulds, 1975; Kerbel *et al.*, 1984).

Estas modificaciones epigenéticas alteran la expresión génica sin alterar las secuencias génicas de ADN y pueden persistir por algunas generaciones antes de la regresión (Frost y Kerbel, 1983). Se ha demostrado que modificaciones en la metilación del ADN (metilación de residuos de citidina, hipometilación), pueden resultar en la activación de genes específicos y la modulación epigenética del fenotipo tumoral, de manera transiente (Frost y Kerbel, 1983; Christman *et al.*, 1977; Jones y Taylor, 1980; Razin y Riggs, 1980). Utilizando clones celulares no metastásicos del carcinoma mamario TA3, Kerbel *et al.* (1984) pudieron obtener variantes metastásicas a altas frecuencias, luego de la hipometilación con el nucleósido análogo 5-aza-citidina. Estas alteraciones fueron inestables y las células revirtieron finalmente a sus fenotipos originales, concomitantemente con la restauración de los niveles normales de metilación del ADN.

Una variedad de otros mecanismos pueden estar implicados en la expresión génica y la actividad de los productos génicos, sin que ello lleve a modificaciones permanentes del ADN; aun así, el rol de estos procesos postgenéticos en la regulación de la diversificación fenotípica permanente desconocido (Nicolson, 1984).

Efectos del microambiente del hospedero

El microambiente de las células tumorales proliferantes parece ser importante en la generación de esta diversidad fenotípica, así como en la selección de las variantes celulares tumorales con ventajas de supervivencia y crecimiento.

Las células individuales en el marco de un tumor experimentan ambientes únicos debido a la variabilidad de concentraciones de nutrientes, oxígeno, hormonas, enzimas, iones, inductores y otras moléculas regulatorias (figura 2). La acción de estos agentes sobre las células tumorales

puede determinar en parte su susceptibilidad a modulaciones genéticas o epigenéticas, y por tanto, su estabilidad fenotípica (Milas, 1984).

Las interacciones de las células tumorales con la matriz extracelular o los componentes del estroma, pueden resultar en la activación diferencial de genes específicos, similar a las experimentadas por las células normales con su matriz extracelular (Bissell *et al.*, 1983). La matriz extracelular o los componentes del estroma incluyen la lámina basal o membranas basales y la matriz del tejido, así como el estroma extracelular sintetizado por fibroblastos, células mesoteliales y otras capaces de ejecutar "reacciones del hospedero" de carácter no inmune. Las interacciones normales de la matriz extracelular son importantes en el mantenimiento de los estados de activación y diferenciación de las células y tejidos normales (Bissell *et al.*, 1983). Las células tumorales pueden ser también capaces de responder a sus microambientes de estromas en variado grado, aun cuando estas interacciones no tienen que ser necesariamente normales (figura 2).

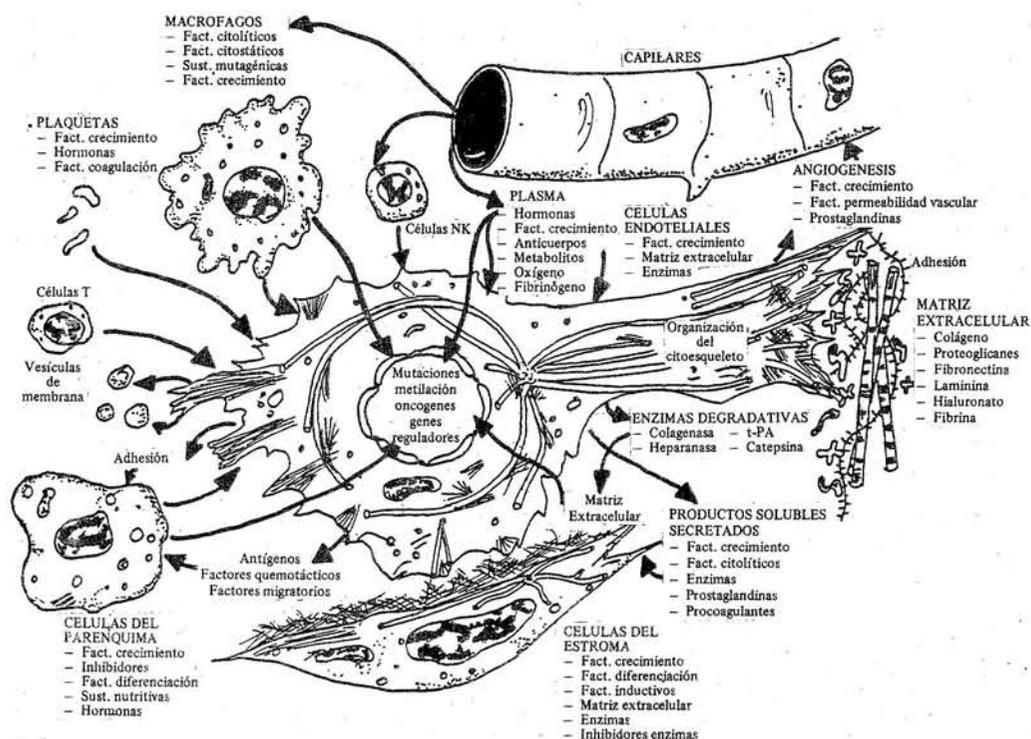


FIG. 2. Influencias microambientales sobre las células tumorales malignas. Las células tumorales son afectadas diferentemente por componentes solubles, la matriz extracelular, diversos factores y las propias células del hospedero.

Las células y los tejidos están sometidos a una variedad de microambientes que controlan la diferenciación celular normal. En algunos casos, la modulación del fenotipo maligno pudiera estar mediado por tales señales, resultando en la reversión de este a un fenotipo más "normal" o benigno. Sachs (1980), ha propuesto que a medida de que los tumores progresan, cambian de vías de diferenciación "inducibles" en la expresión génica a vías "constitutivas" de esta

expresión. En apoyo a esta posibilidad, algunas células de leucemia mieloide han sido moduladas a fenotipos más "normales" con factores inductores de granulocitos y macrófagos o factores estimuladores de colonias (Landau y Sachs, 1971; Metcalf, 1969). En el sistema del teratocarcinoma, las células pueden ser insertadas en blastocistos normales, y después de la implantación de estos, ellas pueden desarrollarse a células fenotípicamente normales (Mintz e Illmensee, 1975; Pierce *et al.*, 1979). Se piensa que el microambiente del blastocisto normal modula el proceso maligno; aun así debe tenerse en cuenta que no todas las células malignas implantadas en blastocistos normales se desenvuelven normalmente (Pierce *et al.*, 1979), indicando que las células tumorales pueden variar dramáticamente en sus capacidades de respuesta a las señales microambientales.

Los tumores presentan frecuentemente una infiltración extensiva por células normales del hospedero tales como linfocitos, granulocitos y macrófagos. Estas células, en proximidad a las células tumorales, pueden ejercer profundos efectos sobre el crecimiento tumoral y otras propiedades (Heppner *et al.*, 1984). Los macrófagos pueden liberar sustancias mutagénicas capaces de modular las frecuencias de mutación espontánea (Heppner *et al.*, 1984). Así, la proximidad de ciertas células normales a las células tumorales puede resultar la modulación de las propiedades del fenotipo celular tumoral.

Finalmente, en sitios secundarios específicos, las células tumorales metastásicas pueden experimentar cambios fenotípicos en algunas propiedades que no están necesariamente relacionadas a la adaptación de estas células a estos sitios secundarios (Harlos y Weiss, 1983; Nicolson y Custead, 1982; Schirmacher, 1980).

La generación de la diversificación del fenotipo celular maligno

No es de esperar que un modelo único pueda explicar todas las ramificaciones de la generación de diversificación fenotípica de las neoplasias malignas. Aun así puede ser provechoso especular y promover modelos para estimular el trabajo experimental ulterior de esta área (Nicolson, 1984a). Por ejemplo, existen algunas similitudes entre la diversificación fenotípica de las células malignas y la generación somática de la diversidad molecular en los linfocitos normales. En este último caso, la diversificación somática de las células progenitoras linfocitarias puede resultar en 10^7 - 10^8 células B maduras diferentes, cada una de ellas sintetizando moléculas únicas de inmunoglobulinas compuestas de dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (Hood *et al.*, 1977; Wood *et al.*, 1977a).

Las moléculas de inmunoglobulinas producidas por los linfocitos contienen una región variable (*V*) de diversidad extensa en secuencias de aminoácidos (la porción aminoterminal de la molécula), y una región constante (*C*) de mucha mayor limitación en la diversidad de secuencia (porción carboxiterninal de la molécula).

La generación de la diversidad molecular de las inmunoglobulinas ocurre a dos niveles: a nivel genético, existen regiones génicas *V* que son hipermutables y resultan en la diversificación en las frecuencias de ADN. En combinación con los genes *V* hipermutables, existe diversidad combinatorial; esta es generada por los diferentes mecanismos de unión que ponen juntos a los genes de varias unidades de homología de inmunoglobulinas. Así, cada gen puede unirse con el mismo gen *C* o con diferentes genes *C*. Esto permite que se amplifique la diversificación genética, o alternativamente, la mutación génica puede ser amplificada a través de diversidad combinatorial para cambiar rápidamente la estructura de las moléculas de inmunoglobulinas (Tonegawa, 1983).

Hood y sus colaboradores (1977a), han especulado que la generación de diversidad en la estructura, función y regulación de las moléculas de superficie celular (llamadas moléculas de "código por área") relacionadas con el desarrollo y el reconocimiento, puede ser explicado también por este modelo. Como que muchas de las propiedades de las células malignas están también determinadas por las moléculas de superficie celular (Nicolson, 1982; Nicolson, 1984; Nicolson y Poste, 1983; Nicolson y Poste, 1983a) y posiblemente por ciertas moléculas de "código por área", la diversificación de los fenotipos celulares tumorales pudiera estar mediada por mecanismos similares a aquellos que controlan la diversificación de las inmunoglobulinas.

Los oncogenes y la diversificación del fenotipo celular tumoral

El uso de rearrreglos génicos, regulados durante la diferenciación, para originar conjuntos diversos de genes completos a partir de un número limitado de segmentos génicos heredados, es un modelo atractivo para la generación de diversificación para el fenotipo tumoral. Durante la diversificación de las células B secretoras de inmunoglobulinas, la activación de segmentos específicos de genes *V* ocurre cuando ellos son reubicados en la vecindad de elementos aumentadores de la transcripción (*enhancers*) que estén localizados *upstream* a los segmentos de la región del gen *C*. La evidencia indica que los segmentos del gen *V* son insertados entre los segmentos de unión y la región de interruptor (*switch*) en la familia de genes de inmunoglobulina (Gillies *et al.*, 1983; Tonegawa, 1983). Esto sugiere una posible relación entre los rearrreglos génicos de la inmunoglobulina, elementos *enhancer* y la diversificación fenotípica.

Estos cambios pueden también estar relacionados con la tumorigénesis. Estudios relativos a la leucemogénesis del pollo, inducida por el virus de la leucosis aviaria (ALV), indican que la integración de tan poco como el promotor transcripcional del ALV o elemento *enhancer*, adyacente al oncogene celular *c-myc* pueden llevar a la transcripción incrementada de este (Hayward *et al.*, 1981; Payne *et al.*, 1982).

De hecho, los oncogenes celulares han sido implicados en la inducción y/o mantenimiento de la transformación neoplásica en una variedad de neoplasias animales y humanas (Blair *et al.*, 1981; Cooper, 1982; DeFeo *et al.*, 1981; Klein, 1983; Perri, 1983; Schwab *et al.*, 1983) y la inserción de un oncogen celular cercano a un elemento *enhancer* en el genoma del hospedero puede tener profundos efectos. Ha sido recientemente demostrado que el gen *c-myc* es trasladado a un *locus* de inmunoglobulina en muchos tumores linfoides animales y humanos (Adams *et al.*, 1983; Crews *et al.*, 1982; Dalla-Favera *et al.*, 1983; Taub *et al.*, 1982; Hayday *et al.*, 1984). Este tipo de translocación ha sido implicada en la activación de otros oncogenes celulares (Klein, 1983; Perry, 1983; Rowley, 1982).

En otros tumores, genes *c-onc* "silentes", pudieran ser trasladados cercanos a elementos celulares *enhancer* resultando en su activación. Otra forma en la cual la activación de la transcripción de los genes *c-onc* pudiera ocurrir es por la acumulación de mutaciones en regiones regulatorias no necesariamente asociadas con los genes de inmunoglobulinas (Pincus *et al.*, 1983). Finalmente, los genes *c-onc* pudieran, al menos en algunos sistemas tumorales, regular su propia transcripción luego de la translocación, mediante el escape a los mecanismos de represión (Hishikura *et al.*, 1983).

El uso inadecuado de elementos *enhancer* celulares (Corcoran, 1985), regulados por el desarrollo, que resulte definitivamente en la activación de oncogenes celulares, pudiera ocurrir en otras familias multigenes con mecanismos de diversificación similares a la familia génica de las inmunoglobulinas. La acción de genes normales hipermutables y sistemas génicos de

diversificación combinacional pudiera poner en movimiento la generación de alteraciones cuantitativas y cualitativas en genes regulatorios o sus promotores, que resulten en la activación diferencial de un número de genes. De esta forma, la inserción de promotores derivados de oncogenes o del hospedero en sitios específicos de tales regiones del genoma pudiera estimular la rápida diversificación fenotípica (Nicolson, 1984).

Los productos génicos de las células malignas parecen tener una cercana similitud con aquellos que están implicados en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular normal. Probablemente no es un accidente que los genes que programan estos procesos celulares normales puedan ser activados, amplificados o modificados junto con los genes que codifican los constituyentes necesarios para el comportamiento maligno celular. Muchas de las propiedades asociadas a la malignidad, si no todas, son probablemente importantes también durante ciertos estadios normales del desarrollo, sugiriendo que eventualmente todos los cambios celulares característicos de las neoplasias malignas son codificados por genes normales y no cancerosos.

¿Es que el incremento en la transcripción de los genes *c-onc* y sus productos se correlacionan con la diversificación fenotípica y la progresión tumoral? La respuesta a esta pregunta no es conocida. Según las evidencias actuales (Rotter *et al.*, 1984), la inserción de oncogenes en sitios críticos del ADN puede desempeñar un rol más importante en la *iniciación* y *mantenimiento* de la transformación neoplásica que en el grado de malignidad. Aun así existe la posibilidad de que otros genes regulatorios normalmente "silentes" sean afectados con la inserción o activación de promotores en ciertos sitios del genoma y estos, a su vez, pudieran iniciar el proceso de diversificación fenotípica. Una vez que la diversificación ha sido iniciada en las células transformadas, cambios groseros ulteriores en el genoma pudieran ser innecesarios para la producción eventual de variantes celulares con fenotipos metastásicos.

AGRADECIMIENTOS

La asistencia de T. Wong en la preparación de este manuscrito fue esencial. Los estudios de uno de los autores (G.L.N.) fueron apoyados por las subvenciones USPHS, RO1 CA-28844 y RO1-29571, del Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU.

REFERENCIAS

- ADAMS, J. M.; S. GERONDAKIS; E. WEBB; L. M. CORCORAN y S. CORY (1983). *Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas*. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 80: 1982-1986.
- ASHLEY, D. J. B. (1969). *The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis*. Brit. J. Cancer 23: 313-328.
- BALMAIN, A. (1985). *Transforming RAS oncogenes and multistage carcinogenesis*. Br. J. Cancer 51: 1-7.
- BARLOGIE, B.; D. A. JOHNSTON y L. SMALLWOOD (1982). *Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in human solid tumors*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 6: 17-28.
- BARRET, J. C.; B. D. CRAWFORD y P. O. P. T'SO (1981). *The role of somatic mutation in a multistage model of carcinogenesis*. En: V. C. Dunkel y R. A. Mishra (eds). Mammalian Cell Transformation by Chemical Carcinogens, pp. 467-501. Princeton Junction, N.J. Senate Press, Inc.
- BAYLIN, S. G.; W. R. WEISBURGER; J. C. EGGLESTON; G. MENDELSON; M. A. BEARNEN; M. D. ABELHOFF y D. S. ETTINGER (1978). *Variable content of histaminase L-dopa decarboxylase and calcitonin in small-carcinoma of the lung*. New England Journal of Medicine, 299: 105-110.

- BEREMBLUM, I. (1978). *Historical Perspective*. En: Carcinogenesis, Vol. 2 Eds. T. J. Slaga, A. Sivak, R. K. Boutwell. Academic Press. New York.
- BISSELL, M. J.; H. G. HALL y G. PARRY (1983). *How does the extracellular matrix direct gene expression?* Journal of Theoretical Biology, 99: 31-68.
- BLAIR, D. G.; M. OSKARSSON; T. G. WOOD; W. L. McCLEMENTS; P. J. FISCHINGER y G. VAN DE WOUDE (1981). *Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: A molecular model for oncogenesis*. Science (Washington), 212: 941-943.
- BOREK, C. (1982). *Radiation carcinogenesis in cell culture*. Adv. Cancer Res, 37: 159-232.
- BOSSLET, K. y V. SCHIRRMACHER (1982). *High-frequency generation of new immunoresistant tumor variants during metastasis of a clone murine tumor line (ESb)*. International Journal of Cancer, 29: 195-202.
- BRENNAN, M. J.; W. L. DONEGAN y D. E. APPLEBY (1979). *The variability of estrogen receptors in metastatic breast cancer*. American Journal of Surgery, 137: 260-262.
- CHOW, D. A. y A. H. GREENBERG (1980). *The generation of tumor heterogeneity in vivo*. International Journal of Cancer, 25: 261-265.
- CHRISTMAN, J. K.; P. PRICE; L. PEDAINAN y G. ASC (1977). *Correlation between hypomethylation of DNA and expression of globin genes in Friend erythroleukemia cells*. European Journal of Biochemistry, 81: 53-59.
- CIFONE, M. A. e I. J. FIDLER (1981). *Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 78: 6949-6952.
- COOPER, G. M. (1982). *Cellular transforming genes*. Science (Washington), 218: 801-806.
- CORCORAN, L. M.; S. CORY y J. M. ADAMS (1985). *Transposition of the immunoglobulin heavy chain enhancer to the myc oncogene in a murine plasmacytoma*. Cell 40: 71-79.
- CREWS, S.; R. BARTH; L. HOOD; J. PREHN y K. CALAME (1982). *Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas*. Science (Washington), 218: 1319-1321.
- DALLA-FAVERA, R.; S. MARTINOTTI; R. C. GALLO; J. ERIKSON y C. M. CROCE (1983). *Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas*. Science (Washington), 219: 963-967.
- DE BAETSELIER, P.; E. GORELIK; Z. ESHHAR; Y. RON; S. KATZAV; M. FELDMAN y S. SEGAL (1981). *Metastatic properties conferred on nonmetastatic tumors by hybridization of spleen β -lymphocytes with plasmacytoma cells*. Journal of the National Cancer Institute, 67: 1079-1087.
- DEFEO, D.; M. A. GONDA; H. A. YOUNG; E. H. CHANG; D. R. LOWY; E. L. M. SCOLNICK y R. W. ELLIS (1981). *Analysis of divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A. 78: 3328-3332.
- DENNIS, J. W.; T. P. DONAGHUE y R. S. KERBEL (1981). *An examination of tumor antigen loss in spontaneous metastasis*. Invasion and Metastasis, 1: 111-125.
- DEXTER, D. L.; H. M. KOWALSKI; B. A. BLAZAR; Z. FLIGIEL; R. VOGEL y G. H. HEPPNER (1978). *Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor*. Cancer Research, 38: 3174-3181.
- DOLL, R. (1978). *An epidemiological perspective of the biology of cancer*. Cancer Res. 38: 3573-3583.
- EVANS, C. H. y J. A. DIPAOLO (1975). *Neoplastic transformation of guinea pig fetal cells in culture induced by chemical carcinogens*. Cancer Res, 35: 1035-1044.
- FARBER, E. (1982). *Chemical carcinogenesis-A biologic perspective*. Am. J. Pathol. 106: 271-296.
- FARBER, E. (1984). *The multistep nature of cancer development*. Cancer Res. 44: 4217-4223.
- FARBER, E. y R. CAMERON (1980). *The sequential analysis of cancer development*. Adv. Cancer Res. 31: 125-226.
- FIALKOW, P. J. (1979). *Clonal origin of human tumors*. Annual Reviews of Medicine, 30: 135-176.
- FIDLER, I. J. e I. R. HART (1982). *Biological diversity in metastatic neoplasms. Origin and implications*. Science (Washington) 217: 998-1003.
- FIDLER, I. J. y G. L. NICOLSON (1981). *Immunobiology of experimental metastatic melanoma*. Cancer Biology Reviews, 2: 171-234.
- FIDLER, I. J.; D. M. GERSTEN y M. L. KRIPKE (1979). *The influence of immunity on the metastasis of three murine fibrosarcomas of differing immunogenicity*. Cancer Research, 39: 3816-3821.
- FROST, P. y R. S. KERBEL (1983). *On the possible epigenetic mechanism(s) of tumor cell heterogeneity*. Cancer Metastasis Reviews, 2: 375-378.

- FOULDS, L. (1954). *The experimental study of tumor progression: A review*. Cancer Res. 14: 327-339.
- FOULDS, L. (1969). *Neoplastic Development*. Vol. 1, Academic Press, London.
- FOULDS, L. (1975). *Neoplastic Development*. Vol. 2, Academic Press, New York.
- GAVILONDO, J.; A. FERNANDEZ; R. CASTILLO y A. LAGE (1982). *Neoplastic progression evidenced in the L929 cell system. I. Selection of tumorigenic and metastasizing cell variants*. Neoplasma 29 (3): 269-279.
- GAVILONDO, J.; A. LAGE; R. PEREZ; B. TORMO y S. HERNANDEZ (1982). *Neoplastic Progression evidenced in the L929 cell system. II. In Vitro growth properties and biochemical characteristics of cell variants with different malignant behaviour*. Neoplasma 29 (3): 281-293.
- GAVILONDO, J.; A. FERNANDEZ y J. F. AMAÑOR (1984). *Pattern of organ colonization of mouse metastasizing L929-MM4 cells and the stimulation of lung tumor formation by Cyclophosphamide*. Clin. Exptl. Metast. 2 (3): 241-250.
- GILLIES, S. D.; S. L. MORRISON; V. T. OI y S. TONEGAWA (1983). *A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene*. Cell, 33: 717-728.
- GOLDENBERG, D. M.; R. A. PAVIA y M. C. TSAO (1974). *In vivo hybridization of human tumour and normal hamster cells*. Nature (London) 250: 649-651.
- GOLDIN, A. y R. K. JOHNSON (1977). *Resistance to antitumor agents*. Recent Advances in Cancer Treatment, edited by H. J. Tagnon and M. J. Staquet (New York: Raven Press), pp. 155-169.
- GORELIK, R.; M. FELDMAN y S. SEGAL (1982). *Selection of a 3LL tumor subline resistant to natural effector cells concomitantly selected for increase metastatic potency*. Cancer Immunology and Immunotherapy, 12: 105-109.
- GORELIK, R.; M. FOGEL; M. FELDMAN y S. SEGAL (1979). *Differences in resistance of metastatic tumor cells and cells from local tumor growth to cytotoxicity of natural killer cells*. Journal of the National Cancer Institute, 63: 1397-1404.
- GRIFFIN, J. E.; D. R. ALLMAN; J. L. K. DURRANT y J. D. WILSON (1981). *Variation in steroid 5- α -reductase activity in cloned skin fibroblasts*. Journal of Biological Chemistry, 256: 3662-3666.
- HANNA, N. e I. J. FIDLER (1981). *Relationship between metastatic potential and resistance to NK cell-mediated cytotoxicity in three murine tumor systems*. Journal of the National Cancer Institute, 66: 1183-1190.
- HARD, G. C.; C. BROWN y H. KING (1980). *Isolation of a morphologically transformed epithelial cell-line from rat kidney following an in vivo dose of dimethylnitrosourea*. Cancer Lett. 10: 277-283.
- HARLOS, J. P. y L. WEISS (1983). *Differences in the peripheries of Lewis lung tumor cells growing in different sites in the mouse*. International Journal of Cancer, 32: 745-750.
- HARRIS, J. F.; A. F. CHAMBERS; R. P. HILL y V. LING (1982). *Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 79: 5547-5551.
- HART, I. R. e I. J. FIDLER (1981). *The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis*. Biochimica et Biophysica Acta, 651: 37-50.
- HAYDAY, A. C.; S. D. GILLIES; H. SAITO; C. WOOD; K. WIMAN; W. S. HAYWARD y S. TONEGAWA (1984). *Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus*. Nature (London), 307: 334-340.
- HAYWARD, W. S.; B. G. NEEL y S. M. ASTRIN (1981). *Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis*. Nature (London), 290: 475-480.
- HEPPNER, G. H.; D. L. DEXTER; T. DE NUCCI; F. R. MILLER y P. CALABRESI (1978). *Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor*. Cancer Research, 38: 3758-3763.
- HEPPNER, G. H.; S. E. LOVELESS; M. F. MILLER; K. H. MAHONEY y A. M. FULTON (1984). *Mammary tumor heterogeneity*. Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects, Edited by G. L. Nicolson and L. Milas (New York: Raven Press), pp. 209-221.
- HOOD, L.; H. V. HUANG y W. J. DREYER (1977). *The area-code hypothesis: The immune system provides clues to understanding the genetic and molecular basis of cell recognition during development*. Journal of Supramolecular Structure, 7: 531-559.

- HOOD, L.; E. LOH; J. HUBERT; P. BARSTAD; B. EATON; P. EARLY; J. FUHRMAN; N. JOHNSON; M. KRONENBERG y J. SCHILLINGS (1977a). *The structure and genetics of mouse immunoglobulins: An analysis of NZB myeloma proteins and sets of BALB/c myeloma proteins binding particular haptens*. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, **41**: 817-836.
- JONES, P. D. y S. M. TAYLOR (1980). *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell **2**: 85-93.
- KERBEL, R. S. (1979). *Immunologic studies of membrane mutants of a highly metastatic murine tumor*. American Journal of Pathology, **97**: 609-622.
- KERBEL, R. S. y A. J. S. DAVIS (1982). *Facilitation of tumor progression by cancer therapy*. Lancet, october 30, 977-978.
- KERBEL, R. S.; P. FROST; R. LITEPLO; D. CARLOW y B. E. ELLIOTT (1984). *Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: Induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment*. Journal of Cellular Physiology (en prensa).
- KIM, U.; A. BAUMLER; C. CARRUTHERS y K. BIELAT (1975). *Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., **72**: 1012-1016.
- KLEIN, G. (1983). *Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and man*. Cell **32**: 311-315.
- KLEIN, G. y E. KLEIN (1984). *Oncogene activation and tumor progression*. Carcinogenesis **5**: 429-435.
- KNUDSON, A. G. (1977). *Genetic and enviromental interactions in the origin of human cancer*. En: Genetics of Human Cancer. Eds. J. J. Mulvihill, R. W. Moller, J. F. Fraumeni. Raven Press, New York, pp. 391-399.
- KUSYK, J.; J. C. SESKI; V. MEDLIN y R. S. KERBEL (1983). *Genotypic and phenotypic evolution of a murine tumor during its progression in vivo toward metastasis*. Journal of the National Cancer Institute, **71**: 183-191.
- LAERUM, O. D. y M. F. RAJEWSKY (1975). *Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo*. JNCI **55**: 1177-1188.
- LAGARDE, A. F. (1983). *A fluctuation analysis of the rate of reexpression of the metastatic potential in a nonmetastatic mutant of the MDAY-D2 murine tumor*. Invasion and Metastasis, **3**: 52-64.
- LAND, H.; L. F. PARADA y R. A. WEINBERG (1983). *Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes*. Nature (Lond.) **304**: 596-602.
- LANDAU, T. y L. SACHS (1971). *Characterization of the inducer required for the development of macrophage and granulocyte colonies*. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., **68**: 2540-2544.
- LOTAN, R. (1979). *Different susceptibilities of human melanoma and breast carcinoma cell lines to retinoic acid-induced growth inhibition*. Cancer Research, **39**: 1014-1019.
- LOTAN, R. y G. L. NICOLSON (1979). *Heterogeneity in growth inhibition by β -transretinoic acid of metastatic B16 melanoma clones and in vivo-selected cell variant lines*. Cancer Research, **39**: 4767-4771.
- METCALF, D. (1969). *Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies*. Journal of Cellular Physiology, **74**: 323-332.
- MILAS, L. (1984). *Tumor metastasis: Achievements, dilemmas and future, a summary of the conference*. Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects, edited by G. L. Nicolson and L. Milas (New York: Raven Press), pp. 457-467.
- MILLER, F. R. (1983). *Tumor subpopulation interactions in metastasis*. Invasion and Metastasis, **3**: 234-242.
- MILLER, B. E.; F. R. MILLER y G. H. HEPPNER (1981). *Interactions between tumor subpopulations affecting their sensitivity to the antineoplastic agents cyclophosphamide and methotrexate*. Cancer Research, **41**: 4378-4381.
- MILLER, F. R. y G. H. HEPPNER (1979). *Immunologic heterogeneity of tumor cell subpopulations from a single mouse mammary tumor*. Journal of National Cancer Institute, **63**: 1457-1463.
- MINER, K. M.; T. KAWAGUCHI; G. W. UBA y G. L. NICOLSON (1982). *Clonal drift of cell surface, melanogenic and experimental metastatic properties of in vivo-selected, brain meninges-colonizing murine B16 melanoma*. Cancer Research, **42**: 4631-4638.
- MINER, K. M.; J. KLOSTERGAARD; G. A. GRANGER y G. L. NICOLSON (1983). *Differences in the cytotoxic effects of activated peritoneal macrophages and J774 monocytic cells on metastatic variants of B16 melanoma*. Journal of the National Cancer Institute, **70**: 717-724.

- MINER, K. M. y G. L. NICOLSON (1983). *Differences in the sensitivities of murine metastatic lymphoma/lymphosarcoma cells to macrophage-mediated cytolysis and/or cytostatics*. *Cancer Research*, **43**: 2063-2071.
- MINTZ, B. y K. ILLMENSEE (1975). *Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **72**: 3585-3589.
- MITELMAN, F. (1974). *The Rous sarcoma virus story: Cytogenetics of tumor induced by RSV*. *Chromosomes and Cancer*, edited by J. German (New York: John Wiley and Sons), pp. 675-693.
- MONDAL, S.; D. W. BRANKOW y C. HEIDELBERGER (1976). *Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10T^{1/2} cells*. *Cancer Res.* **36**: 2254-2260.
- MONDAL, S. y C. HEIDELBERGER (1977). *Transformations of C3H/10T^{1/2} C18 mouse embryos fibroblasts by ultraviolet radiation and a phorbol ester*. *Nature* **260**: 710-711.
- NERI, A. y G. L. NICOLSON (1981). *Phenotype drift of metastatic and cell surface properties of mammary adenocarcinoma cell clones during growth in vitro*. *International Journal of Cancer*, **28**: 731-738.
- NERI, A.; E. ROUSLAHTI y G. L. NICOLSON (1981). *Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at primary and metastatic sites*. *Cancer Research*, **41**: 5082-5095.
- NERI, A.; D. WELCH; T. KAWAGUCHI y G. L. NICOLSON (1982). *The development and biologic properties of malignant cell sublines and clones of a spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma*. *Journal of the National Cancer Institute*, **68**: 507-517.
- NETTESHEIM, P.; A. P. J. KLEIN-SZANTO; A. C. MARCHOK; V. E. STEELE; M. TERZAGUI y D. C. TOPPING (1981). *Studies of neoplastic development in respiratory tract epithelium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **105**: 1-10.
- NEWBOLD, R. F. y R. N. OVERELL (1983). *Fibroblast immortality is a prerequisite for transformations by EJC-Ha-ras oncogenes*. *Nature (Lond.)* **304**: 648-651.
- NICOLSON, G. L. (1982). *Cancer metastasis: Organ colonization and cell surface properties of malignant cells*. *Biochemica and Biophysica Acta*, **695**: 113-176.
- NICOLSON, G. L. (1983). *Stability and phenotypic heterogeneity of metastatic tumor cells*. *Cellular Oncology. New Approaches in Biology, Diagnosis and Treatment*, edited by P. J. Moloy and G. L. Nicolson (New York: Praeger Press), pp. 3-27.
- NICOLSON, G. L. (1984). *Cell surface molecules and tumor metastasis. Regulation of metastatic diversity*. *Experimental Cell Research*, **150**: 3-22.
- NICOLSON, G. L. (1984a). *Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumors*. *Cancer Metastasis Reviews* (en prensa).
- NICOLSON, G. L. y S. E. CUSTEAD (1982). *Tumor metastasis is not due to adaptation of cells to a new organ environment*. *Science (Washington)*, **215**: 176-178.
- NICOLSON, G. L.; J. J. MASCALL y E. J. MCGUIRE (1982a). *Metastatic RAW17 lymphosarcoma as a model for malignant-normal cell interactions. Possible roles for cell surface antigens in determining the quantity and location of secondary tumors*. *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **4**: 149-159.
- NICOLSON, G. L. y L. MILAS editors (1984). *Cancer Invasion and Metastasis Biologic and Therapeutic Aspects*. (New York: Raven Press).
- NICOLSON, G. L. y G. POSTE (1982). *Tumor cell diversity and host responses cancer metastasis. I. Properties of metastatic cells*. *Current Problems in Cancer*, **7**: 1-83.
- NICOLSON, G. L. y G. POSTE (1983). *Tumor cell diversity and host responses cancer metastasis. II. Host immune responses and therapy of metastases*. *Current Problems in Cancer*, **7** (7): 1-43.
- NICOLSON, G. L. y G. POSTE (1983a). *Tumor implantation and invasion at metastatic sites*. *International Reviews in Experimental Pathology*, **25**: 77-181.
- NICOLSON, G. L.; P. A. STECK; D. R. WELCH y T. LEMBO (1983). *Heterogeneity and instability of phenotypic and metastatic properties of local tumor-and metastasis derived clones of a mammary adenocarcinoma*. *Understanding Breast Cancer: Clinical and Laboratory Concepts*, edited by M. Rich, J. Hager, and P. Furmanski (New York, Marcel Dekker, Incorporated), pp. 145-166.
- NISHIKURA, K.; A. AR-RUSHDI; J. FRIKSON; R. WATT; G. ROVERA y C. M. CROCE (1983). *Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B-cells*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **80**: 4822-4826.
- NOWELL, P. C. (1976). *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science (Washington)*, **194**: 23-28.
- NOWELL, P. C. (1983). *Tumor progression and clonal evolution: The role of genetic instability*. *Chromosome Mutation and Neoplasia*, edited by J. German (New York: Alain R. Liss, Incorporated), pp. 413-432.

- OLSSON, L. y P. EBBESON (1979). *Natural polyclonality of spontaneous AKR leukemia and its consequences for so-called specific immunotherapy*. Journal of the National Cancer Institute, 62: 623-627.
- PAYNE, G. S.; J. M. BISHOP y H. E. VARMUS (1982). *Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas*. Nature (London), 295: 209-214.
- PEARCE, V.; S. PATHAK; D. MELLARD; D. R. WELCH y G. L. NICOLSON (1984). *Chromosome and DNA analysis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma cells lines and clones of different metastatic potentials*. Cancer Research (en prensa).
- PEREZ-RODRIGUEZ, R.; J. C. CHAMBARD; E. VAN OBERGHEN-SHILLING; A. FRANCHI y J. POUYSSEGUR (1981). *Emergence of hamster fibroblast tumors in nude mice—Evidence for in vivo selection leading to loss of Growth Factor Requirement*. J. Cellular Physiol, 109: 387-396.
- PEREZ-RODRIGUEZ, R.; A. FRANCHI; B. F. DEYS y J. POUYSSEGUR (1982). *Evidence that hamster fibroblast tumor emerge in nude mice through process of two in vivo selections leading to growth factor "relaxation" and to immune resistance*. Int. J. Cancer 29: 309-314.
- PERRY, R. P. (1983). *Consequence of myc invasion of immunoglobulin loci: facts and speculation*. Cell 33: 647-649.
- PETERSON, J. A.; J. C. BARTHOLOMEW; M. STAMPFER y R. L. CERIANI (1981). *Analysis of expression of human mammary epithelial antigens in normal and malignant breast cells at the single cell level by flow cytometry*. Experimental Cell Biology, 49: 1-14.
- PETO, R. (1977). *Epidemiology, multistage models and short-term mutagenicity tests*. En: Origins of Human Cancer. Eds. H. Hiatt, J. D. Watson, J. A. Winsten. Cold Spring Harbour Lab. Press, New York, pp. 1403-1428.
- PIERCE, G. B.; S. H. LEWIS; G. J. MILLER; E. MOTITZ y P. MILLER (1979). *Tumorigenicity of embryonal carcinoma as an assay to study control of malignancy blastocyst*. Proceeding of the National Academy of Science, U.S.A., 76: 6649-6655.
- PINCUS, M. R.; J. VAN RENSWOUDE; J. B. HARFORD; E. H. CHANG; R. P. CARTY y R. D. KLAUSNER (1983). *Prediction of the three-dimensional structure of the transforming region of the EJ/T24 human bladder oncogene product and its normal cellular homologue*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 80: 5253-5257.
- POSTE, G. (1982). *Experimental systems for analysis of the malignant phenotype*. Cancer Metastasis Reviews, 1: 141-199.
- POSTE, G.; J. DOLL e I. J. FIDLER (1981). *Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 78: 6226-6230.
- POSTE, G.; J. TZENG; J. DOLL; R. GREIG; D. RIEMAN e I. ZEIDMAN (1982). *Evolution of tumor cell heterogeneity during progressive growth of individual lung metastases*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 79: 6574-6578.
- PREHN, R. T. (1976). *Tumor Progression and Homeostasis*. Adv. Cancer Res., 23: 203-236.
- RAZ, A. (1982). *Clonal emergence of metastatic heterogeneity in a growing tumor*. Cancer Letters, 17: 153-160.
- RAZIN, A. y A. RIGGS (1980). *DNA methylation and gene function*. Science (Washington), 210: 604-610.
- REVESZ, L. y L. NORMAN (1960). *Relationship between chromosome ploidy and radiosensitivity in selected tumor sublines of common origin*. Journal of the National Cancer Institute, 25: 1041-1063.
- ROTTER, V.; D. WOLF y G. L. NICOLSON (1984). *Expression of the abl oncogene is independent of metastatic potential in malignant murine lymphoma cells* (en prensa).
- ROWLEY, J. D. (1975). *Nonrandom chromosomal abnormalities in hematologic disorders of man*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 72: 152-156.
- ROWLEY, J. D. (1982). *Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease*. Science (Washington), 216: 749-751.
- RULEY, H. E. (1983). *Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture*. Nature (Lond.) 304: 602-606.
- SACHS, L. (1980). *Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia: A model for the origin and progression of malignancy*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 77: 6152-6156.
- SCHIRRMACHER, V. (1980). *Shifts in tumor cell phenotypes induced by signals from the microenvironment. Relevance for the immunobiology of cancer metastasis*. Immunobiology, 157: 89-98.

- SHIRRMACHER, V. y K. BOSSLET (1982). *Clonal analysis of expression of tumor associated transplantation antigens and metastatic capacity*. Cancer Immunology and Immunotherapy, **13**: 62-68.
- SCHWAB, M.; L. ALITALO; K. H. KLEMPNAUER; H. VARMUS; J. M. BISHOP; F. GILBERT; G. BRODEUR; M. GOLSTEIN y J. TRENT (1983). *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines, and a neuroblastoma tumor*. Nature (London), **305**: 245-248.
- SLUYER, M. y R. VAN NIE (1974). *Estrogen receptor content and hormone-responsive growth of mouse mammary metastasis*. Cancer Research, **34**: 3253-3257.
- STACKPOLE, C. W. (1983). *Generation of phenotypic diversity in the B16 mouse melanoma relative to spontaneous metastasis*. Cancer Research, **43**: 3057-3065.
- STECK, P. A. y G. L. NICOLSON (1983). *Cell surface glycoproteins of 13762NF mammary adenocarcinoma clones of differing metastatic potentials*. Experimental Cell Research, **147**: 255-267.
- TALMADGE, J. E.; J. R. STARKEY; W. C. DAVIS y A. L. COHEN (1979). *Introductions of metastatic heterogeneity by short-term in vivo passage of a cloned transformed cell line*. Journal of Supramolecular Structure, **12**: 227-243.
- TAUB, R.; J. FIRSCH; C. MORTON; G. LENOIR; D. SWAN; S. TRONICK; S. AARONSON y P. LEDER (1982). *Translocation of the c-myc into immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., **79**: 7837-7841.
- TESTA, J. R.; U. MINTZ; J. E. ROWLEY; J. W. VARDIMAN y H. M. GOLOMB (1979). *Evolution of karyotypes in active nonlymphocytic leukemia*. Cancer Research, **39**: 3619-3627.
- THOMASSEN, D. G.; T. M. GILMERM; L. A. ANNAB y J. C. BARRETT (1985). *Evidence for multiple steps in neoplastic transformation of normal and preneoplastic syrian hamster cells following transfection with Harvey murine sarcoma virus oncogene (V-HA-ras)*. Cancer Res., **45**: 726-732.
- TOMASOVIC, SP. P.; H. D. R. JR. THAMES y G. L. NICOLSON (1982). *Heterogeneity in hyperthermic sensitivities of rat 13762NF mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials*. Radiation Research, **91**: 555-563.
- TONEGAWA, S. (1983). *Somatic generation of antibody diversity*. Nature (London), **302**: 575-581.
- TSURUO, T. e I. J. FIDLER (1981). *Differences in drug sensitivity among tumor cells from parental tumors, selected variants and spontaneous metastases*. Cancer Research, **41**: 3058-3064.
- WEINBERG, R. A. (1984). *Cellular oncogenes the pathogenesis of cancer*. En: Notkins, A. L. Oldstone, M. B. A. (eds.). Concepts in viral pathogenesis. New York, Springer-Verlag, pp. 178-86.
- WELCH, D. R.; L. MILAS; S. P. TOMASOVIC y G. L. NICOLSON (1983). *Heterogeneous response and clonal drift of sensitivities of metastatic 13762NF mammary adenocarcinoma clones to gamma radiation in vitro*. Cancer Research, **43**: 6-10.
- WELCH, D. R. y G. L. NICOLSON (1983). *Phenotypic drift and heterogeneity in response of metastatic mammary adenocarcinoma cell clones to adriamycin, 5-fluoro-2'-deoxyuridine and methotrexate treatment in vitro*. Clinical and Experimental Metastasis, **1**: 317-325.
- WOLMAN, S. R. (1983). *Karyotypic progression in human tumors*. Cancer Metastasis Reviews, **2**: 257-293.
- WOODRUFF, M. F. A. (1982). *Interaction of cancer and host*. Br. J. Cancer **46**: 313-322.
- WOODRUFF, M. F. A. (1983). *Cellular heterogeneity in tumors*. Br. J. Cancer **47**: 589-594.